



UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“Estudio de capacidad alergénica de las proteínas del polen de
capim melao (*Melinis minutiflora*) en individuos venezolanos
con enfermedades alérgicas”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el bachiller
Jonathan Ojeda como requisito parcial
para optar por el título de Licenciado en
Biología

Tutores: Dr. Juan Carlos Jiménez (IDI)
Dr. Alexander Laurentin (IBE)

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL 2010

DEDICATORIA

A mis padres Nelfa Gámez y José Ojeda por su apoyo constante y su amor incondicional sencillamente los amo.

A mis hermanas Islamar Barreto, Islanel Barreto y Nivasky Ojeda por ser mis ángeles incansables, siempre apoyándome sin ninguna duda, siempre queriéndome. No hay un momento de mi vida que no lo recuerde así. Las amo.

A mis sobrinos Luis A. Velásquez, Luis E. Velásquez, Alayla Niño, Laura Castillo, José Niño y Alexandra Niño por ser parte de mi corazón. Hijo aunque estés lejos siempre estarás a mi lado.

A mi tía Sonia Ramírez a mi tío Orlando Gámez y a mi hermano Ronny Matos no tengo palabras para explicar cuanto los extraño...

A mi hija Isabella Ojeda porque mi sol sale y se esconde contigo, eres mi tesoro, mi razón de vida y nunca dejare de amarte.

A mi esposa Mariana Sánchez porque solo necesito verte a los ojos y saber que puedo realizar cualquier sueño, puedo alcanzar cualquier estrella e inclusive puedo ser licenciado en biología, lo que si no puedo es haberlo hecho sin ti... TE AMO.

Soy lo que soy por ustedes y por eso siempre les estaré agradecido...

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mi esposa e hija. A mi tía Nancy y mi tío Miguel. A mis primas Yemilet y Amelet siempre apoyándome. A mis primos Jhonander, Yuro y Orlando. A Pool, Jorge y José.

A mis sobrinos Luis A, Luis E, Alayla, Laura, José A, Alexandra, Carlos A, Daniela, Carlos E y Miguel E.

A mi familia Sánchez, Eduardo, Miguel, Ana, Carlos, Dahomey y Gladis "coco" gracias por su apoyo. A mis viejos Miguel y Carlota por ser unos padres para mi.

A mis tutores, Juan C Jiménez por tu apoyo, paciencia y enseñanza. A Valentina Salas "profe valen" porque mas que una profesora, eres una amiga y Alexander laurentin.

A mis Jurado Concepción Hernández y Jenny Garmendía por su apoyo y su buena disposición en todo momento.

A los profesores William Rodríguez, Lourdes Suárez, Alonso Ojeda, Jorge Perez, Cruz Salazar, Wilmer Tezara, Félix Toro y Guillermina Alonso.

A la Dra. Melida Bermúdez, al Dr. Norman Sinclair y al personal del laboratorio de productos naturales de la facultad de farmacia Dra. Alirica Suárez y Katiuska Chávez por su colaboración en este proyecto.

Al personal del IDI por su aporte. A Bety de la dirección de la escuela de biología por tu paciencia. A Beatriz Petit y José Daniel por su ayuda.

A mis compañeros de estudios, Edward Martínez, Lorian "costi" Bello, Anabel, Milagros, Yunmari, Sabrina, Verónica, Maria Jose, Josibel y Lenny.

A mis amigos de siempre "el plan b" Daniel, Jj, Edwin, Lourdes, Ramses, Cipriano Isabel, Vladimir, Irene, Juan, Cléver, y Doris Siempre juntos no importa la distancia. A Jose Juan, Ernesto, Yliane, Oswaldo, Jhonny, Elvin, Erick, Salim, Carlitos, Carlos P, Pedro Bustamante, Pedro Rivas, Daniel Lima, Kelly, Alfredo, y Al resto de mis compañeros del equipo de Softball.

A mis compañeros del IDI. Andrea, Maria de los Ángeles, Saibel, Adriana, Ana Pires, Ana Rengel, Irene, Maria Jhoana, Sonia, Juan y Delia. A todos mis amigos y conocidos que durante mi carrera, me apoyaron de alguna u otra manera. MUCHISIMAS GRACIAS....

INDICE DE CONTENIDO

Índice de contenido.....	4
Índice de figuras y tablas.....	9
Índice de abreviaturas.....	12
Resumen.....	13
1. Introducción.....	14
1.1. Respuesta inmunitaria.....	14
1.2. Linfocitos.....	15
1.3. Inmunoglobulina E.....	17
1.4. Regulación de síntesis de IgE por citoquinas	18
1.5. Métodos para determinar IgE específicas en sueros	19
1.6. La alergia: Generalidades.....	20
1.7. Mecanismos inmunológicos de la alergia.....	21
1.8. Alérgenos.....	23
1.9. Clasificación de alérgenos y algunas patologías asociadas.....	23
1.9.1. Alérgenos por ingestión.....	23
1.9.2. Alérgenos de contacto (Contactantes).....	24
1.9.3 .Alérgenos del aire (Aeroalérgenos).....	25
1.10. Los granos de polen como posibles alérgenos.....	26
1. 11. Gramíneas en Venezuela.....	28
1.12. Capim melao: Generalidades.....	30
1.13 .Capim melao, como factor inductor de alergias en Venezuela.....	30
2. Antecedentes.....	32
3. Objetivos.....	37

4. Materiales y Métodos.....	38
4.1. Población de estudio.....	38
4.2 .Criterios de inclusión.....	38
4.3 .Recolección y preparación del polen de capim melao.....	39
4.4. Extracción del material proteico del polen de capim melao.....	39
4.4.1. Ruptura física.....	39
4.4.2. Liofilización.....	40
4.5. Tubos del grupo número 1.....	41
4.6. Tubos del grupo número 2.....	41
4.7. Tubos de 50 mL (Granos de polen seco).....	41
4.8. Preparación de los extractos de capim melao no liofilizados.....	42
4.8.1. Extracto puro (EP).....	42
4.8.2. Extracto puro precipitado con etanol (EPE).....	42
4.8.3. Extracto puro activado con carbón activado (EPE acla)....	42
4.9. Preparación de los extractos de capim melao liofilizados.....	43
4.9.1. Extracto puro liofilizado 1 (EPL1).....	43
4.9.2. Extracto puro liofilizado 2 (EPL2).....	43
4.9.3. Extracto preparado con Tris HCl. pH 9.5 de materia seca (EPTMS).....	43
4.9.4. Extracto liofilizado de materia seca (ELMS).....	44
4.10. Preparación de la mezcla comercial de gramíneas IV.....	44
4.11. Determinación de concentración de proteínas.....	44

4.12 .Determinación del perfil proteico del polen de capim melao y de la mezcla de gramínea IV.....	45
4.13. Estimación de la masa molecular.....	46
4.14. Tinción de los geles.....	47
4.14.1. Azul de coomassie.....	47
4.14.2. Tinción de plata.....	47
4.15 Estudio inmunológico de los extractos de capim melao.....	48
4.15.1. Western blot.....	48
4.15.2. Transferencia de proteínas.....	49
4.15.3 .Inmunodetección.....	49
4.15.4. Dot blot.....	51
4.16. Reactividad cruzada.....	51
4.16.1. Inhibición de sueros reactivos a capim melao.....	52
4.16.2. Inhibición de sueros reactivos a gramíneas IV.....	52
4.17. Respuesta de anticuerpos de IgE específica de sueros reactivos al polen de capim melao por la técnica de ELISA.....	53
5. Resultados.....	54
5.1. Caracterización del perfil proteico del polen de capim melao y gramíneas IV.....	54
5.1.1. Perfil proteico del polen de capim melao de los extractos no liofilizados en geles teñidos con azul de coomassie.....	54

5.1.2. Perfil proteico del polen de capim melao de los extractos no liofilizados en geles teñidos con coloración de plata.....	55
5.1.3. Perfil proteico del polen de capim melao de extractos liofilizados teñidos con coloración de plata.....	57
5.1.4. Perfil proteico de la mezcla comercial polen de gramíneas IV teñido con coloración de plata.....	58
5.2. Determinación de la concentración de proteínas de los extractos de capim melao.....	59
5.3. Identificación de sueros reactivos para la respuesta IgE con el extracto de capim melao por dot-blot en membranas de nitrocelulosa.....	59
5.4. Pruebas de inmunodetección con sueros de los pacientes del estado Monagas utilizando el extracto (ELP1) como antígeno.....	61
5.4.1. Suero reactivo.....	62
5.5. Prueba de inmunodetección con sueros de los pacientes del estado Monagas y Caracas utilizando el extracto (ELMS) como antígeno.....	63
5.6. Prueba de inmunodetección con sueros de pacientes del estado Monagas y Caracas utilizando el extracto procesado de gramíneas IV como antígeno.....	65

5.7. Determinación de reactividad cruzada con prueba de inhibición de los sueros reactivos a gramíneas IV.....	67
5.7.1. Determinación de reactividad cruzada con prueba de inhibición de los sueros reactivos a capim melao.....	68
5.8. Respuesta de anticuerpos IgE específica de sueros reactivos al polen de capim melao mediante la técnica de ELISA.....	70
5.9. Cut- off.....	74
5.10. Coeficiente de correlación lineal de Pearson.....	75
6. Discusión.....	76
7. Conclusiones.....	86
8. Referencias bibliográficas.....	87
9. Anexos.....	94

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Tipos de linfocitos.....	16
Figura 2. Estructura de la inmunoglobulina de isotipo e (IgE).....	17
Figura 3. Mecanismo de producción de la alergia.....	22
Figura 4. Estructura básica de un grano de polen de gramínea.....	27
Figura 5. Capim melao espiga y grano de polen.....	31
Figura 6. Curva de regresión para estimar la masa molecular.....	46
Figura 7. Geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de coomassie.....	55
Figura 8. Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración de plata.....	56
Figura 9. Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración de plata	57
Figura 10. Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración de plata	58
Figura 11. Membranas de nitrocelulosa con los cuatro extractos que mayor cantidad de bandas se observaron en los geles de poliacrilamida.....	60
Figura 12. tiras de membrana con reconocimiento de proteínas por el suero del paciente.....	62

Figura 13. Reconocimiento de proteínas del extracto ELMS de capim melao en membranas de nitrocelulosa por los sueros de los pacientes.....	64
Figura 14. Tira de membrana de PVDF con reconocimiento de proteínas de gramíneas IV por los sueros de pacientes.....	66
Figura 15. Tiras de membrana con proteínas transferidas de gramíneas IV confrontadas con un pool de sueros de pacientes reactivos a la mezcla, incubados con diferentes diluciones de capim melao.....	68
Figura 16. Tiras de membrana con proteínas trasferidas de capim melao confrontadas con un pool de sueros de pacientes reactivos al capim melao, incubados con diferentes diluciones de gramíneas IV.....	69
Figura 17. Grafico de las absorbancias corregidas obtenidas por la técnica de ELISA de los tres grupos de pacientes clasificados por su nivel de IgE Total.....	72
Figura 18. Grafico del cut-off de las absorbancias obtenidas por la técnica de ELISA de los 25 sueros utilizados para medir la IgE especifica a capim melao.....	74
Figura 19. Gráfico del coeficiente de regresión lineal de Pearson	75
Tabla I. Concentración de proteínas de los extractos de	

capim melao.....	59
Tabla II. Veinticinco sueros de pacientes seleccionados del estado Monagas para la inmunodetección	61
Tabla III. Dieciocho sueros de pacientes seleccionados de Caracas para la inmunodetección	63
Tabla IV. Sueros de pacientes que mostraron reactividad a las proteínas de capim melao.....	65
Tabla V. Resumen de resultados del análisis de los sueros para medir la respuesta de IgE específica a capim melao mediante la técnica de ELISA.....	70
Tabla VI. Valores de los promedios de las absorbancias obtenidas por la técnica de ELISA de los sueros con diferentes niveles de IgE Total.....	71
Tabla VII. Valores de los promedios de las absorbancias y desviación estándar de los 25 sueros utilizados para medir la IgE específica a capim melao.....	73

INDICE DE ABREVIATURAS.

(BCIP/NBT)= Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium.

BSA= Albúmina de suero de bovino.

D.O.= Densidad óptica.

D.S. =Desviación estándar.

DTT=Ditiotreitol.

ELMS= Extracto liofilizado de materia seca.

ELP1 = Extracto liofilizado puro 1.

ELP2 = Extracto liofilizado puro 2.

EP acia = Extracto puro aclarado.

EP= Extracto puro.

EPE= Extracto precipitado con etanol.

EPTMS= Extracto precipitado con tris de materia seca.

ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay.

FA= Fosfatasa alcalina.

FAST= Fluorescent -allergosorbent test.

HRP= Peroxidasa de rabano.

MAST= múltiple chemiluminescent-allergosorbent test.

NK= Natural Killers

PBS = Phosphate buffered saline.

PVDF = Polivinildenedifloride.

RAST= Radioallergosorbent test.

SDS Page = Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis.

TBS = Tris buffer saline.

TMB= Tetrametilbenzidina.

RESUMEN

La alergia al polen es el prototipo de enfermedad alérgica a nivel de la población mundial. Cuando éste entra en contacto con la nariz, el ojo o la mucosa gastrointestinal, libera proteínas que se difunden a través del medio acuoso de las mucosas. Las personas alérgicas a éstas, presentan hipersensibilidad con incremento en la producción de anticuerpos IgE, así como la secreción de citocinas por los linfocitos del fenotipo Th2. En Venezuela se ha establecido una relación entre los períodos de floración de las gramíneas y la incidencia de crisis de rinitis y asma, se ha sugerido que el polen de capim melao (*Melinis minutiflora.*) podría ser un contaminante biológico del aire con posible implicación en la etiología de alergia respiratoria (Pinto, 1972). Los extractos procesados de polen de capim melao fueron analizados por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para separar las proteínas las cuales fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente se confrontaron con sueros de pacientes clasificados de acuerdo a sus niveles de IgE total mediante la técnica denominada western Blot. Se identificaron varias bandas entre 150 a 7 kDa y se reconocieron proteínas de 65, 44 y 33 kDa de masa molecular. Este trabajo nos permitió, por primera vez en nuestro país, identificar proteínas asociadas a la respuesta de tipo IgE específica contra el polen del capim melao (*Melinis minutiflora.*), determinar la existencia de reacción cruzada entre los pólenes de capim melao y el polen de la mezcla comercial gramíneas IV, así como una correspondencia entre los niveles de IgE total y los niveles de IgE específica de pacientes alérgicos que posiblemente podrían estar sensibilizados a esta gramínea.

1.- INTRODUCCIÓN.

La prevalencia de las enfermedades alérgicas está creciendo de manera constante y alarmante en los últimos años. En muchas ocasiones se consideran de carácter leve, sin embargo, hay un incremento significativo como para encender las alarmas sociales ante tal problema. El polen de gramíneas es la principal causa de alergias en los continentes americano y europeo (AAIC, 2007). En el mundo se han descrito alrededor de 4500 especies de gramíneas agrupadas en unos 600 géneros. En Venezuela mas de 700 especies se encuentran clasificadas (Pinto, 1972). La alergia a los pólenes es el prototipo de enfermedad alérgica a nivel de la población. Cuando el polen entra en contacto con la nariz, el ojo o la mucosa gastrointestinal, se liberan glicoproteínas que se difunden a través del medio acuoso de las mucosas. Las personas alérgicas a estas proteínas presentan hipersensibilidad implicadas en las crisis alérgicas, con incremento en la producción de anticuerpos IgE total y específicos, así como la secreción de citocinas por los linfocitos del fenotipo Th2. (AAIC, 2007).

1.1- Respuesta inmunitaria.

La respuesta inmunitaria (RI) puede ser definida como el conjunto de acciones humorales y celulares que se ponen en juego cuando un agente o antígeno (Ag) es detectado como señal de peligro o alarma. Se ha clasificado según las características de la reacción y los elementos que participan en dos tipos: Respuesta innata y Respuesta adaptativa.

La RI innata es el conjunto de eventos que ocurren inmediatamente después que un agente o antígeno es detectado (Corado y Mora, 2003). La interacción de los agentes invasores con los componentes de la RI innata, induce procesos de reclutamiento y maduración celular, así como la liberación de mensajeros químicos que crean las condiciones para que se inicie la RI adaptativa (Abbas y Lichtman, 2004).

La RI adaptativa se define como el conjunto de reacciones que conducen a la diferenciación, proliferación y activación de los linfocitos T y B como consecuencia de la presentación de los antígenos en un marco apropiado, mediada por células presentadoras de antígenos como las células dendríticas. La presencia del antígeno promueve el arranque de toda una maquinaria inmunológica, donde actúan diferentes células: NK (*Natural Killer*), linfocitos, macrófagos, mastocitos, etc. (Corado y Mora, 2003).

1.2- Linfocitos.

Los linfocitos son las células principales del sistema inmunitario, su tamaño es de aproximadamente 8 micras de diámetro. En base a sus características fenotípicas y funciones particulares se han descrito tres tipos de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y las células NK (figura 1). La proliferación tanto de los linfocitos T como de los linfocitos B y la interacción entre estos linfocitos desencadena señales que inducen la expresión de moléculas de superficie o incrementan la expresión de las ya existentes.

El linfocito T previamente sensibilizado que expresa CD28 interactúa con CD 80/86 del linfocito B y se desencadena la señal coestimuladora para el linfocito T. Esta célula se activa, expresa CD40L y comienza a sintetizar citocinas (Corado y Mora, 2003).

La proliferación del linfocito B conduce a la expresión del clon específico para el Ag. y al mismo tiempo, al inicio del proceso de conmutación isotópica mediante el cual el linfocito B bajo la influencia de las citocinas producidas por el linfocito T activado, comienza a secretar isotipos de Ig (inmonoglobulinas) diferentes a la IgM, producidas inicialmente. Los nuevos isotipos dependerán del Ag y del perfil de citocinas. En este sentido, cuando el Ag es una alérgeno o parásito helmíntico, el perfil de citocinas TH2 que incluye IL-4, IL-3, IL-5, IL-9 e IL-10, induce la producción de Acs (anticuerpos) de los isotipos IgG4 e IgE (Corado y Mora, 2003).

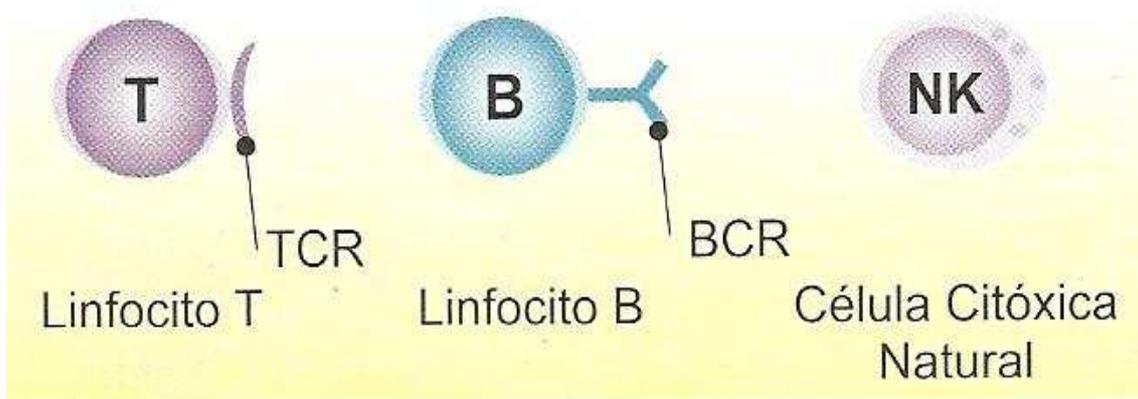


Figura 1.- Tipos de linfocitos. Tomado y modificado de Corado y Mora, 2003.

1.3- Inmunoglobulina E.

La inmunoglobulina está formada por dos cadenas polipeptídica idénticas, pesadas, unidas entre sí por puentes disulfuro y por dos cadenas ligeras también idénticas (figura 2). El anticuerpo IgE circula en forma bivalente encontrándose normalmente en el plasma en concentraciones menores a 50 $\mu\text{g/mL}$. En condiciones patológicas, como es el caso de presentar una enfermedad atópica, este nivel puede aumentar hasta 1 000 $\mu\text{g/mL}$ o más. Existe una diferencia crítica entre individuos normales y atópicos. La alta producción de niveles de IgE se debe a una respuesta hacia antígenos particulares. (Ponce, 2004).

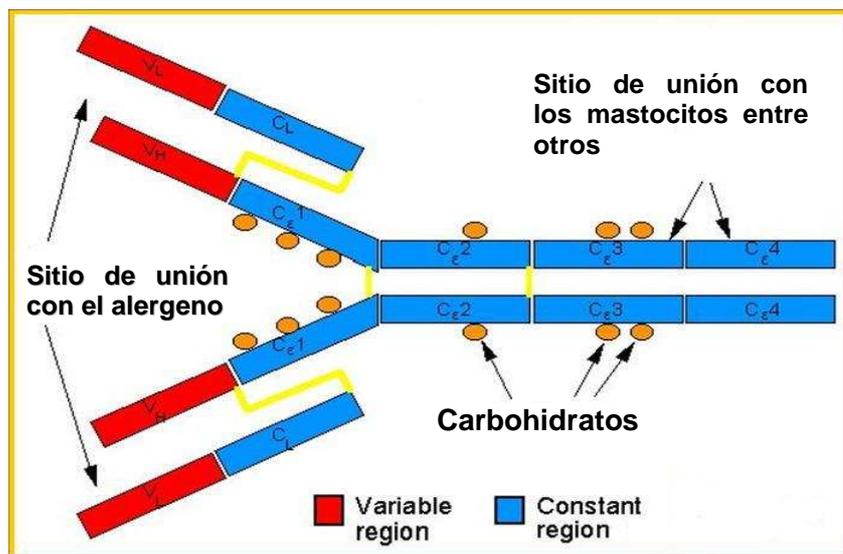


Figura 2.- Estructura de la Inmunoglobulina de isotipo E. (IgE)
http://1.bp.blogspot.com/_HqhQWVvHpw/ScfZWkFtvcl/AAAAAAAAAB0/6Amyo0MXBiw/s400/Imagen1ige.jpg [Consulta 18 de abril de 2009].

El anticuerpo IgE es el isotipo de inmunoglobulina que contiene la cadena pesada épsilon (e), provee un reconocimiento antigénico para los alérgenos que estimulan la reacción de hipersensibilidad inmediata. Al igual que otros anticuerpos, puede ser subdividido en dos regiones funcionales: una región Fc la cual se une a células efectoras y la porción Fab la cual es responsable de su interrelación con el alérgeno. Existen dos tipos de receptores específicos en la superficie celular. Los receptores denominados FcεRI, con alta afinidad por la IgE los cuales protegen a la IgE de la destrucción por proteasas séricas, se encuentran presentes en los mastocitos y basófilos, células de Langerhans, plaquetas, eosinófilos activados, monocitos y células del epitelio bronquial de pacientes asmáticos. Los segundos receptores FcεRII se encuentran en las células inflamatorias incluyendo las células NK, macrófagos, eosinófilos y plaquetas, células B y T (Williams, 2000).

La alta producción de niveles de IgE se debe a una respuesta hacia antígenos particulares. Es conocida la importancia de cuatro factores que interactúan, contribuyendo en la regulación de la síntesis de IgE: la herencia, la historia natural por exposición antigénica, la naturaleza del antígeno y las células T y sus respectivas citoquinas. (Ponce, 2004).

1.4- Regulación de síntesis de IgE por citoquinas.

Las citoquinas están formadas por un gran número de moléculas las cuales constituyen la base de una red compleja de señales célula – célula, manteniendo de esta forma la homeostasis y la fisiología de nuestro organismo.

Cada categoría de citoquinas ha sido estudiada en su secuencia de proteínas (aminoácidos) y la mayoría de esos genes de proteínas han sido clonados, permitiendo de esta forma una mejor comprensión diagnóstica y terapéutica de las enfermedades alérgicas (Ponce, 2004).

La presencia de citoquinas en el medio ambiente determina cuál grupo de células T es producida desde las células Th0, y así cuál de las vías tomarán las células B. Es así como la presencia de IL-4 e IL-13 favorece el desarrollo de Th2 y el paso de células B productoras de IgE. La formación de IL-10 por las células Th2 produce inhibición de la respuesta por las células Th1, lo cual afecta las CPAs, y mantiene un aumento en la respuesta Th2, promoviendo la producción del IgE hacia el alérgeno. De forma diferente, la respuesta Th1 hacia antígenos específicos (ejemplo del toxoide tetánico) es favorecida por la producción de IFN, IL-2 e IL-12, suprimiendo por esta vía el estímulo hacia células Th2 (Ponce, 2004).

1.5- Métodos para determinar IgE específica en sueros.

Existen varios métodos de determinación de IgE específica en suero, como el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), FAST (fluorescent - allergosorbent test), MAST (múltiple chemiluminescent-allergosorbent test), RAST (radioallergosorbent test). Todos ellos utilizan del principio del “allergosorbent”, o sea, alérgeno ligado a un soporte sólido. Si el suero del paciente contiene IgE inmunológicamente específica al alérgeno ligado al soporte sólido, ésta se liga al mismo.

Lo que varía en esos sistemas es la forma de reacción que permite revelar el resultado, siendo por ejemplo el ELISA un método enzimático colorimétrico y el RAST un método radioactivo (Arruda, 2004).

El método de ELISA reverso (rELISA) que utiliza anticuerpo monoclonal alérgeno-específico para medir IgE específica en suero, es más sensible que el ELISA convencional (70.8%) y comparable al RAST. Además tiene la ventaja de no utilizar material radioactivo, tornando su realización de menor riesgo y costo (Silva, 2001).

1.6- La alergia: Generalidades.

La alergia se puede definir como hipersensibilidad a alguna sustancia en el ambiente. Que se hace evidente en el asma, fiebre de heno erupciones cutáneas etc. Se origina hipersensibilidad cuando un antígeno (en nuestro caso un alérgeno) entra en el cuerpo y estimula la producción de anticuerpos específicos a él. Cuando se produce una reacción antígeno-anticuerpo en contacto con células, estas últimas pueden ser lesionadas y se hinchan. Se altera la membrana plasmática y liberan histamina y otras sustancias. La histamina puede afectar secundariamente a otros tejidos y dañarlos. Causa contracción de los músculos de las paredes de los bronquios provocando así el asma (Villey, 1974).

Las células involucradas en la reacción inflamatoria son mastocitos, basófilos, eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, y células epiteliales, que sin ser células blanco, son fuente importante de citoquinas, quimiocinas y endotelinas (Ponce, 2004).

Las personas alérgicas a una sustancia (alérgeno) presentan en la superficie de los mastocitos (unas células de los tejidos) múltiples moléculas de IgE capaces de reconocer la presencia de dicha sustancia. Esta IgE se formó en anteriores contactos con el alérgeno que provocó la sensibilización frente al mismo. Es decir, se formaron las células con memoria (linfocitos B memoria) que, al entrar en contacto de nuevo con dicho alérgeno, ordenarán la producción de grandes cantidades de IgE específica contra aquel alérgeno.

1.7- Mecanismos inmunológicos de la alergia.

Los alérgenos que se unen a la IgE específica sobre la superficie celular inducen la activación de la célula en sí, con liberación de mediadores preformados y recién formados, los cuales son considerados primordiales en la cascada inflamatoria. (Ponce 2004). La parte del alérgeno que es reconocida por la IgE específica se denomina epitopo, que es diferente al epitopo que reconocen las poblaciones de linfocitos T. Los alérgenos tienen epitopos comunes para diferentes clases de inmunoglobulinas (IgE, IgG, IgA, IgM), pero en otras ocasiones son selectivos para una sólo clase (Green, 1991).

La mayoría de los epitopos conocidos para la IgE son secuenciales; es decir, el orden de secuencia de aminoácidos da lugar al reconocimiento por parte de la IgE. Estos epitopos son muy resistentes al calor y a la acción enzimática, mientras que los epitopos que dependen de la estructura terciaria “conformacionales” son mas labiles a la temperatura y la digestión enzimática (Pascual, 1993).

Al efectuarse la unión de IgE con el alérgeno se provocará la liberación por parte del mastocito de un gran número de sustancias (histamina, serotonina, bradiquinina), conocidas como mediadores de la alergia, pues son las que determinarán las manifestaciones de la reacción alérgica en los diferentes órganos. En la figura 3 se puede observar el mecanismo de producción de la alergia.



Figura 3.- Mecanismo de producción de la alergia.
<http://www.deporteynutricion.net/Upload/alergia2.gif> [Consulta 11 de abril de 2010].

1.8- Alérgenos.

Un alérgeno es un antígeno que induce la producción de anticuerpos de tipo IgE y que, en algunos individuos induce reacciones alérgicas y puede ser clasificado dependiendo de la vía de contacto con el organismo (Mora y Corado 2003).

El reconocimiento por anticuerpos es una herramienta útil en el estudio de los alérgenos y se ha utilizado durante muchos años con este fin; en contraste, la respuesta celular pocas veces se usa con este propósito.

1.9- Clasificación de alérgenos y algunas patologías asociadas.

1.9.1- Alérgenos por ingestión.

Los alérgenos alimentarios son de origen animal o vegetal; muchos de ellos son compartidos por diferentes familias botánicas o zoológicas. Cada alimento contiene un número importante de proteínas potencialmente alérgicas; entre éstas existen antígenos mayores o principales y antígenos menores o secundarios, distinción que depende de la frecuencia con que estos antígenos sean los responsables de la sensibilización del alimento. Un alérgeno mayor se define como aquel que fija IgE específica en al menos el 50 % de los sueros de pacientes sensibilizados a un alimento.

Una vez identificados los alérgenos, la IUIS (Internacional Union of Immunology Society) ha dado unas normas de nomenclatura para que exista uniformidad en las denominaciones (Marsh, 1986). Who/iu list, es la lista oficial de alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología producida por el subcomité de nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (AAAIC, 2007).

1.9.2- Alérgenos de contacto (Contactantes).

La dermatitis de contacto es una reacción inflamatoria a alérgenos que penetran en la piel mediada por un mecanismo inmunológico. La sensibilización requiere un tiempo de contacto habitualmente prolongado, en general meses o años. Una vez que se ha producido la sensibilización, las lesiones suelen desencadenarse entre 24-48 horas tras nuevas exposiciones al alérgeno. El níquel es uno de los principales responsables de dermatitis alérgica por contacto. Las lesiones más características son las propias del eczema en su fase aguda, con presencia de vesículas o ampollas, exudación y costras (Fonseca, 2001).

En Estados Unidos la hiedra venenosa (*Toxicodendron genus*) causa más DCA que todos los demás alérgenos juntos. El alérgeno más sensibilizante de la hiedra venenosa es el urushiol, un derivado del catecol hallado en la savia de esta planta. Los efectos tóxicos de urushiol son indirectos, mediados por una respuesta autoinmune inducida. (Hogan, 2008).

1.9.3- Alérgenos del aire (Aeroalérgenos).

El polen, polvo y ácaros son diferentes tipos de aeroalérgenos, Los aeroalérgenos se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial, al igual que las proteínas alimentarias denominadas mayores o principales, y sólo < 1 a un 10 % de las poblaciones desarrollan enfermedad atópica alérgica aparente. Hoy día, la investigación se ha orientado hacia la identificación de los mecanismos que inducen y mantienen la respuesta de hipersensibilidad con su respectiva reactividad clínica. Por el contrario, la respuesta inmune en los individuos no alérgicos y sus características clínicas ha sido muy limitada (Ponce, 2004).

Desde 1986, los linfocitos Th1 y Th2 son el paradigma que ha dominado la comprensión de la inmunopatología del asma, la rinitis y la dermatitis atópica. Existen nuevas expectativas con otros grupos celulares que aparecen y explican los eventos inmunológicos. Un espectro de células CD4+, incluyendo Th1, Th3, linfocitos Treg, CD25+ y las células asesinas naturales juegan un papel crítico en la regulación de estas patologías.(Ponce, 2004).

La dermatitis atópica es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que con mucha frecuencia se asocia a enfermedades alérgicas respiratorias, pero continúa siendo discutida la participación de los aeroalérgenos en la patogenia de la enfermedad. A nivel clínico se han observado brotes de dermatitis tras la exposición ambiental a los alérgenos (Beck y Korsgaard, 1989).

El traslado de polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce con el nombre de polinización (Dreborg, 1989, citado por Guidos, 2005). En nuestras latitudes, los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, con el viento como medio de arrastre y diseminación de los granos de polen, y por entomofilia, cuando la polinización corre a cargo de los insectos.

1.10- Los granos de polen como posibles alérgenos.

Los granos de polen son las células sexuales masculinas de las plantas con semillas (espermatófito) que se forman en el interior de los estambres y son liberados. La difusión del polen depende del régimen y circulación de los vientos, por esta razón, el polen de gramíneas (*Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Melinis minutiflora*) es considerado un aeroalérgeno (partículas transportada por el aire). Generalmente suelen ser proteínas que en su mayoría son glicoproteínas, solubles sin características físico-químicas especiales, capaces de inducir la formación de anticuerpos anafilácticos, causantes de las enfermedades alérgicas (Martínez y col, 2000).

La mayoría de los granos de polen están identificados de manera genérica, sin embargo, por características genuinas se han podido identificar pólenes a nivel de familias como las gramíneas (Hurtado y Riegler, 1986).

Los pólenes poseen 2 capas, la capa externa o “exina”, muy resistente constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina (polímero oxidativo), poco afectado por las variaciones térmicas y la “intina” que posee las estructuras alergénicas (ver figura 4). Sin embargo, en el medio ambiente el polen se fragmenta; luego, dentro del cuerpo, se llena de líquido (agua y componentes salinos) ensanchándose hasta dejar al descubierto las proteínas alergénicas dentro de él. Estas proteínas alergénicas poseen un peso molecular entre 10.000 y 30.000 daltons, cuyas estructuras proteicas son bastante bien conocidas. (Subiza y col, 1995).

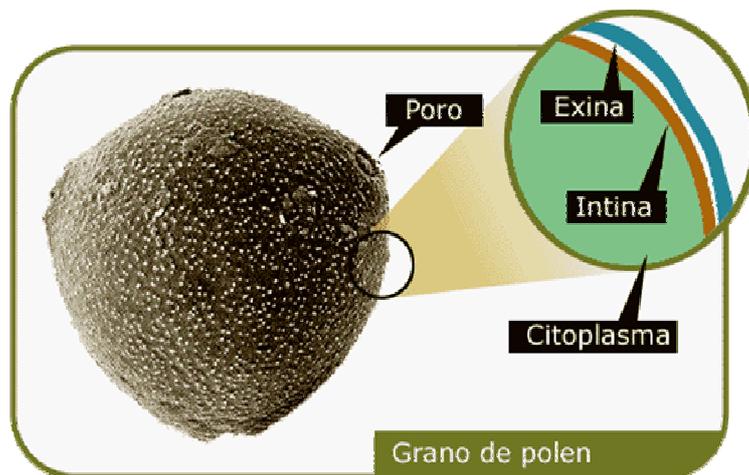


Figura. 4 Estructura básica de un grano de polen de gramíneas.
<http://www.alergiainfantillafe.org/images/poleny1.gif> [Consulta 18 de abril de 2009]

Las características que debe tener un polen para ser considerado como la causa de polinosis, fueron definidas por (Neumark, 1980) quien estableció una serie de postulados: (1) La planta debe producir grandes cantidades de polen; (2) debe estar distribuida de forma importante en el ambiente del paciente; (3) el polen debe ser ligero y transportado por el aire; y (4) debe tratarse de un polen alérgico.

En Venezuela, el diagnóstico y tratamiento de muchas de las enfermedades alérgicas respiratorias se basa en la piel y pruebas de laboratorio realizadas con extractos de polen importados de zonas templadas. La elección de los extractos de polen se basa también en encuestas sobre pólenes situados en áreas templadas. Esto sólo refleja la falta de información sobre el polen en el aire, no sólo en Venezuela, sino también en el resto de la América tropical, debido a que la flora local es tan abundante en términos de números de especie, que muchas de éstas no se han descrito todavía (Hurtado y Riegler, 1986).

1.11- Gramíneas en Venezuela.

Las gramíneas constituyen una familia muy extensa de hierbas anuales y perennes, cuya distribución es cosmopolita; crece no sólo en praderas y pastos, sino también en zonas de escombros, sobre suelos cultivados y abandonados (AAIC, 2007).

Huber, (1998), (citado por Pacheco y col, 2006), indica que en Venezuela las estimaciones más recientes señalan que la familia Gramineae o Poaceae se encuentra representada por cerca de 143 géneros y 755 especies. Esto convierte a este grupo en uno de los más importantes y diversos en el país, ocupando el cuarto lugar en la lista de las diez familias con mayor número de especies, precedidas por las *Orchidaceae*, *Leguminosae* y *Asteraceae*.

Las subfamilias más diversas en el estado resultaron ser en orden decreciente las Panicoideae con 36 géneros, Chloridoideae con 13 géneros, Bambusoideae con 8 géneros, Arundinoideae con 2 géneros y las Centothecoideae con 1 género. De la misma forma, los géneros más diversos de acuerdo al número de especies presentes (entre paréntesis), fueron: *Panicum* (16), *Paspalum* (15), *Eragrostis* (10), *Aristida* (9), *Urochloa* (9), *Axonopus* (8), *Digitaria* (7) y *Setaria* (6).

En un 5% del territorio Nacional, la parte norte de los estados Zulia, Monagas, Falcón, Lara, Sucre, Mérida y Nueva Esparta, lo que representa aproximadamente unos 41.000 Km. del territorio nacional, se observa la introducción exitosa de especies del género *Cynodon*, debido a la excelente adaptación de éstas a las condiciones agroclimáticas. Principalmente la especie *Cynodon dactylon* (Rincón, 2005).

1.12- Capim melao: Generalidades.

El capim melao, yaraguá o pasto de gordura (*Melinis minutiflora*) es una gramínea perenne de ciclo fotosintético tipo c4 originaria de África que fue introducida en Venezuela como forraje a través de Brasil y Colombia (Mondolfi, 1956). Sus hojas son pubescentes y secretan una sustancia aromática de olor rancio. Crece formando masas densas de vástagos entremezclados que alcanzan hasta 1m de espesor.

Este tipo de crecimiento cerrado excluye a otras especies resultando en asociaciones prácticamente monoespecíficas. Resistente a la sequía, con tallos de un metro o más de longitud, rastreros en su base y luego ascendentes que crece preferentemente a alturas entre los 800 y 1.500 m. En Venezuela, *M. minutiflora* se encuentra por encima de los 600 m y tiende a ocupar los hábitats con suelos marginalmente más fértiles y profundos en la cordillera de la costa es poco exigente en cuanto a fertilidad, su preferencia son los suelos arcillosos, rojos, los cuales son ácidos y pobres en materia orgánica. Esta gramínea es usada en pastoreo aunque por su olor el ganado lo acepta poco, pero cuando se acostumbra a comerlo lo hace con avidez. De igual forma es apropiada para la formación de potreros por su vigoroso crecimiento y por eliminar las malas hierbas debido a que cubre el suelo de buena forma. (Hernández y col, 1984).

1.13- Capim melao, como factor inductor de alergias en Venezuela.

Capim melao significa en portugués “hierba con olor a melaza”. Esta gramínea originaria de África fue introducida primero al Brasil y en 1860, a Venezuela.

Figura entre las 7 principales gramíneas que constituyen los pastizales naturales y cultivos del país. En el área metropolitana ha sido sembrada en las laderas del Ávila a fin de evitar erosión y es particularmente visible entre noviembre y marzo. Por observaciones preliminares se notó que las espigas sueltan abundante polen de color amarillo intenso cuyos gránulos tiene características muy parecidas al de las otras gramíneas alergógenas, en lo referente a tamaño y capacidad ascensional (Pinto, 1972).

Sus espigas cubren las laderas de las montañas proporcionando una coloración que va del rosa al púrpura (Figura 5), de acuerdo al grado de maduración de las espigas. Se ha establecido una relación entre los períodos de floración de las gramíneas y la incidencia de crisis de rinitis y asma, lo que sugiere que el polen de capim melao (*Melinis minutiflora*) es un contaminante biológico del aire con posible implicación en la etiología de alergia respiratoria, poniendo de manifiesto la alta incidencia de sensibilización alérgica a gramíneas (Pinto, 1972).



Figura 5.-Capim melao espigas y granos de polen. Modificado de http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Melinis_minutiflora.htm Consulta [18 de noviembre de 2009].

2.- ANTECEDENTES

El término “alergia” fue introducido por von Pirquet, en 1906 quien reconoció que tanto en la inmunidad protectora, como en las reacciones de hipersensibilidad, los antígenos de Hipersensibilidad tipo I, inducían cambios en la reactividad (Belin, 1972). Hasta el presente día se ha considerado muchos conceptos, sin embargo, podemos definir la alergia como una respuesta exagerada de nuestro organismo cuando entra en contacto con determinadas sustancias provenientes del exterior.

El estudio de los factores ambientales que participan en la causa de los problemas alérgicos ha avanzado ostensiblemente en los últimos años, lo que ha permitido identificar a los ácaros del polvo doméstico como los principales agentes causales. No por ello dejan de tener relevancia otros factores ambientales, como los pólenes, ampliamente investigados en diferentes partes del mundo (Rodríguez y Rodríguez 2001).

En estudios anteriores Singh y Singh, 1994 establecieron que los granos de polen son los primeros alérgenos conocidos componentes inductores de la respuesta alérgica y la principal fuente de morbilidad entre los sujetos atópicos.

Teniendo en cuenta que sólo las partículas menores de 10 μm son capaces de penetrar hasta lo más profundo de las vías respiratorias los granos de polen que son mayores a 10 μm quedan retenidas en las fosas nasales (Spieksma, 1993).

El componente alérgico de los pólenes de las gramíneas se atribuye a una cantidad reducida de proteínas que se liberan rápidamente del grano de polen al hidratarse por contacto con las mucosas.

Está demostrado que la sensibilización a pólenes está relacionada con el desarrollo de asma y rinitis alérgicas. Los más relevantes son los de gramíneas, seguidos de los de árboles y arbustos. Las gramíneas conforman una familia de plantas angiospermas, ampliamente distribuidas en áreas geográficas de clima templado. Su abundancia, alrededor del 50% del polen ambiental es de gramíneas, hace que sean las causantes de gran parte de las patologías alérgicas respiratorias (Barber, 2003).

Los géneros de gramíneas que se consideran como fuente más importante de polinosis pertenecen en su mayoría a la subfamilia *Pooideae*: *Phleum* (fleo), *Dactylis* (dáctilo), *Lolium* (ballico), *Trisetum* (triseteto), *Festuca* (cañuelas), *Poa* (poa), *Anthoxanthum* (grama de olor), *Holcus* (holco), *Agrostis* (agróstide) y *Alopecurus* L. (alopecuro). De la subfamilia *Chloridoideae* es importante *Cynodon* (Subiza y col, 2003).

De la familia de las gramíneas las especies *Lolium perenne* y *Phleum pratense* han sido las más estudiadas. Se han identificado hasta 12 subfamilias de alérgenos en el conjunto de las gramíneas (Subiza y col, 2003).

Estudios de Rodríguez y Rodríguez (2002) han encontrado prevalencias entre el 79 y 81% de sensibilización a polen de *Parthenium hysterophorus* (especie del género compuestas) y a *Cynodon dactylon* (especie de gramínea silvestre), ambas ampliamente distribuidas a todo lo largo y ancho de la isla de Cuba.

En Venezuela *Melinis minutiflora* es una de las gramíneas más agresivas desplazando por competencia a otras gramíneas. Un estudio de Zdrako y colaboradores (1989) postula que el desplazamiento de las gramíneas nativas por otras de origen africano es característico de algunas sabanas neotropicales de la cordillera de la costa en Venezuela. La especie *Melinis minutiflora* tiende a desplazar a las comunidades nativas dominadas por *Trachypogon plumosus*.

Los vastos sembradíos de *Melinis* y su existencia en el área Metropolitana representan una fuente natural de alérgenos que no se puede subestimar. La ausencia del carácter estacional de manifestaciones alérgicas respiratorias producidas por pólenes, podría explicarse por el enmascaramiento de la alergia por otras sensibilizaciones capaces de alterar completamente el cuadro clínico característico de la polinosis (Pinto, 1972).

Pruebas intradérmicas preliminares efectuadas con extractos de *Melinis Minutiflora* en pacientes con alergia respiratoria, han dado una incidencia muy alta de positividades, aún a diluciones 10 veces mayores que las habitualmente usadas con otras gramíneas. (Pinto, 1972).

La reacción alérgica, en un individuo hipersensible a una sustancia dada, surge ante un segundo encuentro con la fuente alérgica, después de un contacto inicial con ella. El primero de tales contactos sensibiliza al individuo frente a tal alérgeno, induciendo la síntesis de IgE específicas de dicho alérgeno y preparando así su organismo para responder con mayor eficacia a posteriores encuentros con él. En estos contactos, la población de anticuerpos sintetizados desencadena una respuesta inflamatoria diversa que da lugar a los síntomas clínicos característicos de la alergia tipo-I (Rodríguez y Villalba, 1997).

La cuantificación de IgE total se hace en suero, utilizándose diferentes métodos, enzimáticos o radioactivos. La técnica de determinación de IgE específica fue desarrollada por Wide en 1967, y sigue siendo utilizada como complemento diagnóstico en enfermedades alérgicas mediadas por IgE. La especificidad y sensibilidad varía según el alérgeno evaluado (Arruda, 2004).

Sin embargo, un individuo puede sufrir procesos de alergia frente a sustancias o materiales con los cuales nunca ha tenido contacto previo. Ello puede ser explicado por el hecho de que la fuente de alergia comparta una sustancia alérgica con otro material con el que el paciente sí haya tenido relación directa y que aportó el agente sensibilizante en aquel primer encuentro. Ante este tipo de acciones, se dice que existe reactividad cruzada entre ambos materiales: el individuo posee IgE responsables de esa actividad y será hipersensible indistintamente a una u otra fuente de alergia. (Rodríguez y Villalba, 1997).

La identificación de los alérgenos es un requisito para la estandarización de los extractos alérgicos y para el estudio del cruce antigénico (Rosas y García, 2008)

Estudios de reactividad cruzada serológica mediante ensayos de inhibición pueden llegar a revelar qué alérgeno presenta sensibilización (Galindo y col, 2007).

Hay varios métodos para estudiar la reactividad cruzada uno de ellos es la inhibición competitiva. Esta se realiza mediante un ensayo in vitro donde se comparan dos extractos alérgicos mediante la evaluación de la capacidad de un extracto para bloquear o reducir la fijación de IgE a otro extracto el cual se logra parcial o completa dependiendo del grado de similitud entre las dos extractos (Straumann, 2000).

Los estudios anteriores se realizaron para determinar las propiedades alérgicas de algunos antígenos donde se incluyen pólenes de diferentes gramíneas, la reactividad cruzada que puede existir entre diferentes alérgenos y la cuantificación de IgE tanto total como específica. Sin embargo solo el trabajo del Dr. Benaim Pinto refiere la alergia al polen de capim melao. Por esta razón cual consideramos importante evaluar la capacidad alérgica de este polen y el papel que puede jugar en el aumento de casos de alergia en nuestro país.

3.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar y caracterizar bioquímica e inmunológicamente las proteínas presentes en el polen de la gramínea capim melao (*Melinis minutiflora*) y asociar su capacidad alergénica con la prevalencia de enfermedades respiratorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Determinar el perfil proteico de un extracto de una mezcla de gramíneas y de capim melao (*Melinis minutiflora*) por electroforesis en geles de poliacrilamida.
- 2) Identificar y caracterizar las proteínas presentes en el polen de capim melao (*Melinis minutiflora*) asociadas a la respuesta de anticuerpos de tipo IgE específica en el suero de pacientes alérgicos mediante la técnica de inmunodetección (western blot).
- 3) Determinar si existe reacción cruzada entre las proteínas de una mezcla de gramíneas de interés clínico y el polen de capim melao (*Melinis minutiflora*) mediante el uso de pruebas de inhibición.
- 4) Cuantificar la respuesta de los pacientes alérgicos frente a las proteínas alergénicas del polen de capim melao (*Melinis minutiflora*) mediante la técnica de ELISA.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1- Población de estudio

Los sueros que se utilizaron fueron obtenidos de pacientes de Punta de Mata Edo. Monagas y Caracas. Los cuales se han clasificado por sus niveles de IgE total y su historia clínica de alergia, asma, rinitis y dermatitis atópica. Se estableció un rango para clasificarlos en tres grupos, bajo, medio y alto niveles de IgE Total.

El rango para el grupo denominado bajo va desde 100 UI/mL de IgE Total hasta 399 UI/mL IgE Total. El rango para el grupo denominado medio va desde 400 UI/mL IgE Total hasta 899 UI/mL IgE Total. El rango para el grupo denominado alto va desde 900UI/mL de IgE Total en adelante.

Se utilizaron 40 sueros de Punta de Mata, 7 sueros con nivel alto de IgE Total, 14 sueros con nivel medio de IgE Total, 19 sueros con nivel bajo de IgE Total y De igual manera se utilizaron 25 sueros de Caracas, 4 con nivel alto de IgE total, 11 con niveles medio de IgE Total y 10 sueros con niveles bajos de IgE Total. Se utilizó como control negativo el suero de pacientes con cero niveles de IgE Total y sin síntomas de alergia.

4.2.- Criterios de inclusión.

1. Niveles de IgE total > 100 UI/mL IgE
2. Específica a gramíneas >0,35 UI/mL
3. Consentimiento previa información del paciente
4. Aprobado por el comité de bioética del IDI.

4.3- Recolección y preparación del polen de capim melao.

Las espigas de la gramínea capim melao fueron recolectadas en el estado Monagas se llevaron al laboratorio de bioquímica del instituto de inmunología U.C.V donde pasaron por un proceso de limpieza extrayéndose las pequeñas ramas y las anteras, quedando solo los granos de polen. Estos se colocaron en tubos de 50 mL hasta completar 50 g y se refrigeró a -4 °C el resto se colocó en bolsas y se refrigeraron a - 20 grados. Inicialmente se trabajó con el polen contenido en las bolsas. Para facilitar la extracción de la muestra, se agregaron aproximadamente 50 mL de TBS (Tris buffer salino) al material contenido en cada bolsa y fue llevado a tubos de plástico de 50 mL formándose 2 grupos de muestras de capim melao, el primer grupo fue denominado con el número 1 (los primeros tubos recolectados con un color más oscuro) y el segundo con el número 2 (más claros).

4.4- Extracción del material proteico del polen de capim melao.

Se utilizaron 2 métodos generales para extraer el material proteico del grano de polen del capim melao: Ruptura física y ruptura física + liofilización.

4.4.1- Ruptura Física.

Los tubos de 50 mL marcados con el número 1 que contenían los granos de polen sumergidos en TBS fueron colocados en una centrifuga Centra GP8R a una velocidad de 2400 RPM por 10 min a 4° C que según el radio y la fórmula de conversión equivalen a 1500 g.

Luego se separó el sedimento del sobrenadante. El sobrenadante fue guardado en tubos de 50 mL a -20 °C. El sedimento con los granos de polen se resuspendió en 10 mL de TBS en el mortero donde se ejerció presión sobre ellos con el fin de romper la exina y lograr la extracción del material proteico que se encuentra dentro del grano de polen. Seguidamente la muestra se colocó en un tubo Eppendorff de 1,5 mL en una centrifuga de marca Hermle Z 233 MK2 a 14 g por 10 min a 4 ° C y se separó el sobrenadante del sedimento. El sobrenadante se almacenó a -20 °C. El sedimento fue resuspendido con 250 µL de TBS y se le aplicó una segunda centrifugación 14 g por 10 min. a 4 ° C.

Se tomó el sobrenadante de la segunda centrifugación y se almacenó a -20° C, el sedimento fue guardado a – 20 ° C junto con el sedimento de la primera centrifugación. Luego se preparó un *pool* de estos sobrenadantes para el análisis bioquímico.

4.4.2- Liofilización.

Para realizar este método los extractos fueron sometidos al proceso de eliminación del agua. El extracto se congela y luego se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido del extracto al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido para obtener muestras con mayor concentración. Se trabajó con el material extraído de las bolsas, se utilizaron los tubos tanto del grupo número uno como los tubos del grupo número 2. De igual modo se trabajó con el material contenido inicialmente en los tubos de 50 mL (granos de polen secos).

4.5- Tubos del grupo número 1.

Luego de pasar por el proceso de ruptura física, se colocaron 25 mL del *pool* de los sobrenadantes en tubos de 50 mL. Seguidamente se llevaron a liofilizar, al finalizar el proceso de liofilización, se obtuvo un promedio de 0,3 g de material en cada tubo.

4.6- Tubos del grupo número 2.

Para la extracción del material proteico de los tubos del grupo número 2 no se utilizó el proceso de ruptura física debido a que la cantidad de granos de polen en este grupo fue mucho menor, razón por la cual se llevaron directo al proceso de liofilización, obteniéndose aproximadamente 1,4 g de material por cada tubo.

4.7- Tubos de 50 mL (Granos de polen seco).

Para realizar este paso se tomaron 2 g de polen de capim melao y se le aplicó el proceso de ruptura física bajo las siguientes condiciones: se le agregó 5 mL de TBS y se llevó al mortero donde se le aplicó presión durante 10 min. Luego se tomó el sobrenadante y se almacenó en un tubo de 50 mL, seguidamente se le agregó al sedimento 5 mL de TBS y se aplicó presión durante 10 min. Este paso se repitió 2 veces mas y se hizo un *pool* con los sobrenadantes, el cual fue colocado en la centrifuga a una velocidad de 1500 g a 4° C g por 10 min. Se obtuvo un nuevo sobrenadante el cual fue colocado en un tubo de 50 mL y fue llevado a liofilizar, obteniéndose un promedio de 0,8 g de material por cada 2 g utilizados inicialmente.

4.8- Preparación de los extractos de capim melao no liofilizados

4.8.1- Extracto puro (EP)

Los extractos obtenidos por ruptura física sin pasar por el proceso de liofilizado lo definimos como Extractos Puros. Se tomó 10 mL del *pool* de sobrenadantes y se almacenó a -20° C

4.8.2- Extracto puro precipitado con etanol (EPE)

Se tomó 1 mL del extracto puro en un tubo de vidrio y se le agregó 3 mL de etanol, el cual fue almacenado a -20°C por 24 horas. Seguidamente se centrifugó en Eppendorff de 1,5 mL a 14 g, a 4 ° C, por 10 min. Se separó el etanol y el sedimento fue resuspendido con 100 µL de agua destilada y se almacenó a -20 °C.

4.8.3- Extracto puro aclarado con carbón activado (EP acla)

Se tomaron 5 mL del extracto puro y se le agregaron 2 g de carbón activado, luego se filtró y se colocó en Eppendorff de 1,5 mL y se centrifugó a 14 g, a 4 ° C, por 10 min. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. El carbón activado también se almacenó a -20 °C.

Una vez que se utilizaba los extractos y quedaba poco de cada uno de los tratamientos se preparó un *pool* de ellos. Para el análisis bioquímico se utilizó 20 µL de buffer de muestra (5x) por cada 100 µL de muestra.

4.9- Preparación de los extractos de capim melao liofilizados

4.9.1- Extracto liofilizado puro 1 (ELP1)

Para obtener este extracto se tomaron 0,3 g del liofilizado del grupo número 1 y se resuspendió en 3 mL de TBS y se colocó en agitación durante 24 horas a 4 °C. Seguidamente se centrifugó en Eppendorff de 1,5 mL a 14 g, a 4 °C, por 10 min. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

4.9.2- - Extracto liofilizado puro (ELP2)

Para obtener este extracto se tomaron 0,3 g del liofilizado del grupo número 2, se resuspendió en 3 mL de TBS y se colocó en agitación durante 24 horas a 4 °C. Seguidamente se centrifugó en Eppendorff de 1,5 mL a 14 g, a 4 °C por 10 min. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

4.9.3- Extracto preparado con Tris HCl. pH 9.5 de materia seca (EPTMS)

Se tomaron 0,3 g del liofilizado de materia seca y se resuspendió en 3 mL de Tris HCl. pH 9.5 y se colocó en agitación durante 24 horas, seguidamente se centrifugó a 14 g, a 4 °C, por 10 min. Se repitió una vez más el proceso y se concentró un *pool* con los sobrenadantes.

4.9.4- Extracto liofilizado de materia seca (ELMS)

Se tomaron 0,3 g del liofilizado de materia seca y se resuspendieron en 3 mL de TBS y se colocaron en agitación durante 24 horas a 4 °C. Seguidamente se centrifugó en Eppendorff de 1,5 mL a 14 g, a 4 °C, por 10 min. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

4.10- Preparación de los extractos de la mezcla comercial de gramíneas IV

Se trabajó con una mezcla de pólenes de gramíneas de interés clínico en nuestro país, denominadas gramíneas IV de una marca comercial ALKBELLO que incluyó las gramíneas: *Festuca pratensis*, *Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Dactylis glomerata*.

Se tomaron 250 µL de la mezcla de gramíneas IV y se mezclaron con acetona en una relación 1:4 y se incubó durante toda la noche a -20°C. Al siguiente día se centrifugó la mezcla a 14 g a 4 °C durante 10 minutos. Se retiró la acetona y el precipitado fue resuspendido en 200 µL de agua destilada.

4.11- Determinación de concentración de proteínas.

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Lowry (1951), se seleccionaron los extractos donde se observaron una mayor cantidad de bandas en experimentos iniciales. Estos fueron los extractos (EP); (ELMS) (ELP1); (EPTMS). Se elaboró una curva de calibración utilizando Albúmina de suero bovino (BSA) a una absorbancia de 660 nanómetros.

4.12- Determinación del perfil proteico del polen de capim melao y de la mezcla de gramíneas IV.

La determinación del perfil proteico se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 10% (Laemmli, 1970). Se utilizó este porcentaje debido al tamaño de las proteínas alergénicas de los granos de polen que van entre 10 y 30 kDa y el rango efectivo de separación de proteínas. Para este porcentaje (10%) el rango separable está entre 14 y 250 kDa.

La electroforesis de proteínas se basa en la migración de proteínas a través de un campo eléctrico. Esta técnica es útil como un método analítico, ya que las proteínas pueden ser separadas y visualizadas. Se pueden analizar tanto en su conformación nativa como en su conformación desnaturalizada.

El gel SDS-PAGE está compuesto principalmente por los reactivos acrilamida y bis-acrilamida y SDS. Las acrilamidas son agentes que forman polímeros en forma de una red, dejando poros a través de los cuales pasarán las proteínas. El tamaño del poro depende de la concentración de estas acrilamidas.

Para realizar el estudio bioquímico de los extractos de capim melao y gramíneas IV se prepararon los geles de corrida (donde se determina el perfil proteico) y el gel de apilamiento (donde se coloca las muestras) en el equipo de Bio-Rad mini Protean IV. Se utilizaron 20 μ L (30-40 μ g/pozo) del extracto en buffer de muestra.

Se utilizaron peines de 10 pozos inicialmente para los extractos de capim melao con la finalidad de determinar cual de los extractos muestra un mejor perfil electroforético. Se seleccionaron los extractos con más bandas observadas. El análisis bioquímico de las muestras de gramíneas IV se realizó en geles preparativos.

Todas las electroforesis se hicieron bajo las mismas condiciones; a 130 voltios en buffer de corrida.

4.13-Estimación de la masa molecular

En cada una de las corridas se utilizó 5 μ L de Masa Molecular de referencia (**M**) que contiene las siguientes proteínas conocidas: Miosina (194,66 kDa); Beta-galactosidasa (116,53 kDa); Albúmina de suero de bovino (BSA) 97,22 kDa; anhidrasa carbónica (50,2 kDa); inhibidor de tripsina de soya (37,62kDa); Lisozima (29,28 kDa) y Aprotinina (20 kDa). La figura 6 muestra la curva de regresión utilizada para estimar la masa molecular de las proteínas de cada muestra.

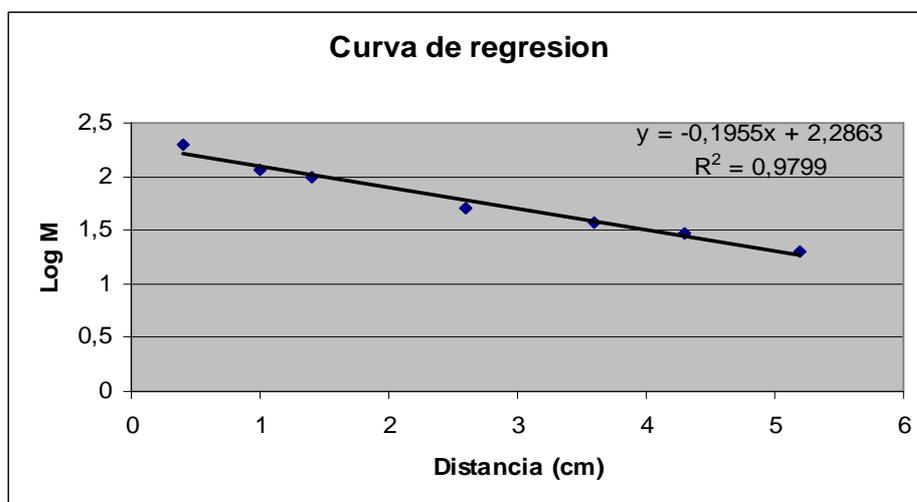


Figura 6.- Curva de regresión para estimar la masa molecular

4.14- Tinción de los geles

Para la visualización de las proteínas en los geles se utilizaron la tinción de plata y la de azul de coomassie.

4.14.1- Azul de coomassie

La tinción con coomassie es capaz de detectar proteínas en el orden de microgramos (1µg) solo tiñe de azul las proteínas presentes en el gel. Puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes.

Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas (Garcia, 2000).

Finalizada la corrida el gel se incubó en azul de coomassie por dos horas. Luego fue decolorado en una solución descolorante compuesta por metanol 40%, ácido acético 10 % y agua destilada 50 %.

4.14.2- Tinción de plata

Dependiendo de la naturaleza de la proteína se puede usar métodos más sensibles como la tinción de plata, capaz de detectar proteínas en el orden de nanogramos (1 ng) utilizando nitrato de plata (AgNO_3). La tinción de plata se basa en su unión a distintos grupos químicos de las proteínas como los grupos carboxilo o sulfidrilo.

El gel fue incubado en 50 mL de metanol al 50% durante diez minutos, luego se sumergió en 50 mL metanol al 5% durante diez minutos, seguidamente se sumergió en 50 mL de agua y 2 μ L de ditioneitol (DTT) durante diez minutos. El gel fue lavado con agua destilada y se colocó en 50 mL de nitrato de plata al 0,1% durante 30 minutos, nuevamente fue lavado con agua destilada y se le agregó la solución reveladora compuesta por formaldehído al 37% y carbonato de calcio. Se añadió el resto de la solución de revelado y se observó el gel hasta la coloración de las bandas. Se detuvo la reacción con ácido acético al 6%

4.15- Estudio Inmunológico de los extractos de capim melao

4.15.1- Western blot.

Para la identificación de las proteínas asociadas a la respuesta de tipo IgE específica se utilizó la técnica del western blot (también llamado “immunoblotting” la cual se basa en la utilización de anticuerpos marcados para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés, según la metodología reportada por Towbin y colaboradores (1979).

Las macromoléculas ya separadas en función de su diferente masa molecular se transfieren a una fase sólida, generalmente una membrana de nitrocelulosa o PVDF para realizar el western blot realizamos dos procedimientos: la transferencia y la inmunodetección.

4.15.2- Transferencia de proteínas

Finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos como se describió en el paso anterior o fueron transferidos electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (Polivinildenedifloruro). El orden de los componentes es el siguiente: electrodo negativo/**esponja/1 papel filtro/gel/membrana/1 papel filtro/esponja/electrodo positivo**. En el caso de la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó con buffer de transferencia mientras que la membrana de PVDF se incubó con metanol durante 30 s para su activación.

Todas las transferencias se realizaron bajo las mismas condiciones; a 180 mA durante una hora a temperatura ambiente. Finalizada la transferencia, la membrana se coloreó con rojo Ponceau para observar las proteínas transferidas.

4.15.3- Inmunodetección

La inmunodetección consta de varias etapas: Bloqueo, lavados y colocación de los anticuerpos.

La membrana se cortó en tiras de aproximadamente 3 mm de ancho. Luego se bloquearon para evitar uniones inespecíficas con BSA al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (este paso no se aplicó a las membranas de PVDF).

Seguidamente, se lavaron las membranas 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% para eliminar el exceso de bloqueo. Se colocó el anticuerpo primario (suero de los pacientes), en una dilución de 1/20 en PBS-BSA 0,1% -Tween 20 para cada tira durante 48 horas en agitación constante.

Finalizada la incubación del anticuerpo primario se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% por 10 min. Luego, se incubó el anticuerpo secundario, un anti-IgE humana acoplada a la peroxidasa (Vector). En nuestro caso utilizamos anticuerpos con dos tipos de enzimas: peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (FA).

Para la HRP se colocó el anticuerpo secundario (Invitrogen) con biotina en una dilución de 1/500 en PBS-BSA 0.1% -Tween 20 para cada tira durante 2 horas en agitación constante. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1%. Seguidamente, se colocó el sistema avidina-biotina acoplada a la HRP en una dilución de 1/1000 en PBS-BSA 0,1% -Tween 20 para cada tira durante 1 hora en agitación constante. Las tiras fueron lavadas en PBS-Tween 20 al 0,1% y se revelaron con un estuche comercial de tetrametilbenzidina (TMB) Vector.

Para la FA se colocó el anticuerpo secundario (Invitrogen) en una dilución de 1/750 en PBS-BSA 0,1% -Tween 20 para cada tira durante 24 horas a 4°C en agitación constante. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y se reveló con el estuche comercial de bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) Vector.

4.15.4 Dot blot.

Esta técnica es una variante del western blot, basada en que el extracto proteico es colocado directamente sobre la membrana. Consiste en la absorción de la gota provocando la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'dot' para obtener resultados de reactividad de manera sencilla.

Sobre tiras de membrana de nitrocelulosa de 1 cm de ancho, se colocó una gota de los extractos EP; EPacla; ELP1; EPE y una gota de PBS como control negativo. Se dejó secar la membrana aproximadamente 5 min. Luego, se colocó el anticuerpo primario en una dilución de 1/20 en PBS-BSA 0,1% - Tween 20 para cada tira durante 2 horas. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1%. Seguidamente se colocó el anticuerpo secundario en una dilución de 1/750 en PBS-BSA 0,1% -Tween 20 durante 24 horas a 4°C en agitación constante. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y se reveló con el estuche comercial de (BCIP/NBT).

4.16- Reactividad Cruzada.

Para determinar si existe reacción cruzada entre los pólenes de capim melao y el polen de la mezcla de gramíneas IV realizamos el ensayo de inhibición. Este ensayo se realizó de 2 maneras: primero inhibiendo los sueros con reactividad para capim melao con extractos de gramíneas IV. Segundo inhibiendo los sueros con reactividad para gramíneas IV con extracto de capim melao.

4.16.1- Inhibición de sueros reactivos a capim melao.

Se selecciono un *pool* de sueros con reactividad al polen de capim melao. Luego se cortó la membrana en 4 tiras de aproximadamente 3 mm de ancho de PVDF en la cual estaban transferidas las proteínas de capim melao.

Se tomaron 3 alícuotas del *pool* de sueros que corresponden a una dilución de 1 /20 y se incubó con alicotas del extracto de gramíneas IV (procesado) que corresponden a diluciones de 1/50; 1/25 y 1/12,5 respectivamente, durante 1 hora a 37°C. Seguidamente, a cada tira se le agregó el suero incubado mezclado con PBS-BSA 0,1% -Tween 20 y se dejó 48 horas en agitación constante.

A una cuarta tira se le agregó el suero sin incubación con el extracto de gramíneas IV, como control positivo. Luego, se colocó el anticuerpo secundario con la enzima FA acoplada siguiendo el mismo protocolo que en el western blot y se reveló con el estuche comercial de (BCIP/NBT).

4.16.2- Inhibición de sueros reactivos a gramíneas IV.

Se concentró un *pool* de sueros con reactividad al polen de gramíneas IV. Luego, se cortó la membrana en 4 tiras de aproximadamente 3 mm de ancho de PVDF en la cual estaban transferidas las proteínas de gramíneas IV. Seguidamente se confrontaron con los sueros incubados previamente con alícuotas del extracto ELTMS (se utilizó este extracto debido a que contiene la mayor concentración de proteínas y arrojó el mejor perfil proteico) siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

4.17- Respuesta de anticuerpos IgE específica de sueros reactivos al polen de capim melao por la técnica de ELISA.

Para determinar la respuesta de IgE específica utilizamos el método ELISA. En una placa o soporte con 96 micropozos se acopló el extracto ELMS de capim melao a 10 µg de proteínas/pozo.

La placa fue incubada a 37 °C durante una hora. Luego, se colocó a 4°C durante 24 horas. Seguidamente, se lavó con PBS, se aspiró y se bloqueó con (BSA) al 5% por una hora a temperatura ambiente.

Luego de este tiempo, se descartó la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario (suero de los pacientes), en una dilución de 1/10 en PBS-T, BSA al 1% durante una hora a 37°C.

Finalizado el tiempo se lavó (3 veces) con PBS-T, se incubó con 100µL/pozo del anticuerpo secundario Anti-IgE humana marcada con biotina a una dilución de 1/1000 en PBS-T-BSA 1% durante 2 horas a 37°C se lavó (3 veces) con PBS-T 0,1% para colocar 100µL/pozo del sistema avidina-biotina-peroxidasa a una dilución de 1/1000 en PBS-BSA 0,1% -Tween 20 durante media hora. Se lavó (3 veces) nuevamente en PBS-T y se reveló con el estuche comercial de (TMB), la reacción se detuvo con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico 1 mol/L y se leyó a una densidad absorbancia de 450 (nm) de densidad óptica.

5- RESULTADOS.

5.1- Caracterización del perfil proteico del polen de capim melao y gramíneas IV.

La caracterización del perfil proteico se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %.

5.1.1- Perfil proteico del polen de capim melao de los extractos no liofilizados en geles teñidos con azul de coomassie.

Los extractos no liofilizados fueron los primeros en ser preparados y probados en el análisis bioquímico. La figura 7 muestra un gel de poliacrilamida al 10%; con los extractos EPE; EP acla y EP. Se puede observar en el carril número 4 (EP) un patrón de 5 bandas de masas moleculares 113, 63, 53,43, y 20 kDa aproximadamente. En el carril número 2 (EPE) y en el carril número 3 (EP acla) no se observaron bandas.

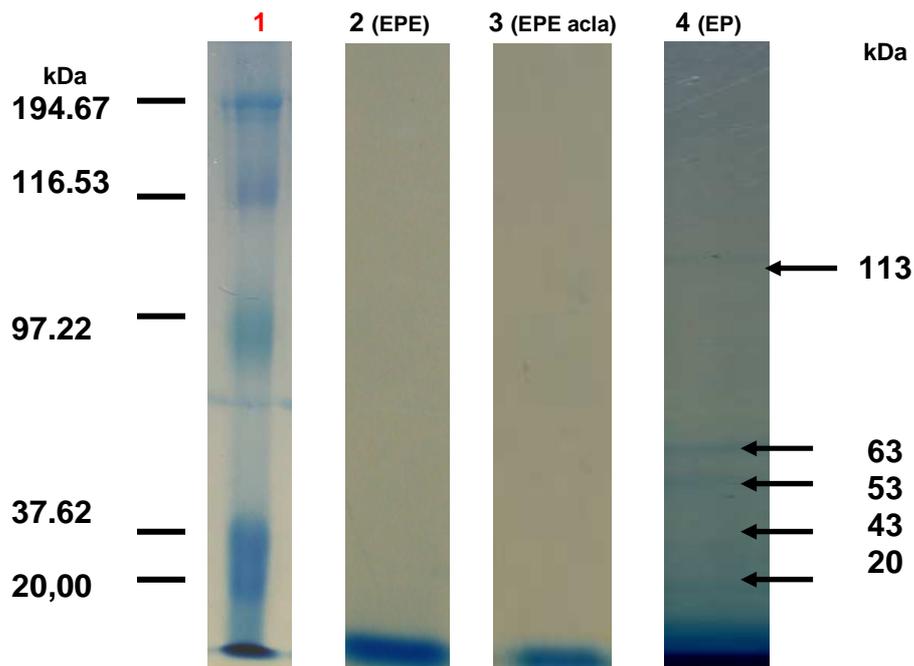


Figura 7.- Geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. 20 μ L/pozo por cada muestra. **1** Masa molecular (M). 2.EPE; 3. EPacla; 4. EP. Nótese que se aprecian al menos 5 bandas en el gel número 4 señaladas con flechas y sus respectivas masas moleculares relativas

5.1.2- Perfil proteico del polen de capim melao de los extractos no liofilizados en geles teñidos con coloración de plata.

Partiendo de los mismos extractos (EPE; EPacla; EP) y del mismo volumen por muestra que en el experimento anterior se realizó la separación de las proteínas por electroforesis. La figura 8 muestra el perfil proteico de los extractos no liofilizados de capim melao en un gel teñido con coloración de plata. En el carril número 2 (EPE) se pueden observar bandas proteicas de 25 y 27 kDa. En el carril número 3 (EP acla) se observaron bandas de 19, 25 y 27 kDa y en el carril número 4 (EP) se observaron bandas de masa molecular de 15, 19 65 y 70 kDa aproximadamente El patrón de bandas obtenido para los extractos EPacla y EPE no fue posible detectarlo en el experimento anterior.

Esto posiblemente se deba a que dependiendo de las características de algunas proteínas el revelado con tinción de plata que es de 50 a 100 veces más sensible que el de azul de coomassie. Sin embargo, en el carril número 4 (EP) se observaron una cantidad menor de bandas que las observadas con la tinción de azul de coomassie, esto se puede atribuir a que el extracto utilizado en el experimento anterior no fue el mismo que el utilizado en la tinción con coloración de plata a pesar de que fue preparado con la misma metodología.

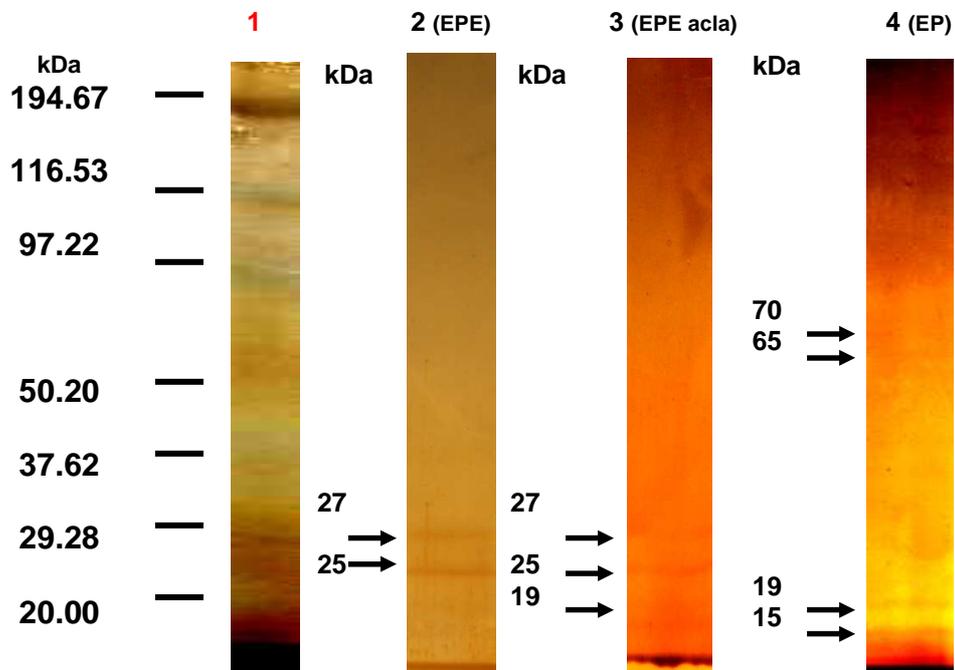


Figura 8.- Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración plata. 20 μ L/pozo por muestra. 1 Masa molecular (M). 2. EPE; 3. EP acia; 4. EP.

5.1.3- Perfil proteico del polen de capim melao de extractos liofilizados teñidos con coloración de plata.

En esta parte del estudio, el procedimiento para el análisis bioquímico de los extractos liofilizados fue el mismo que se utilizó para los extractos no liofilizados. La figura 9 muestra los patrones de bandas proteicas de los 5 extractos liofilizados (ELP1, ELP2, ELMS, ELTMS). En el carril número 1 (ELP1) se observó un amplio patrón de bandas de masa molecular de 70, 49, 42, 28, 24, 21, 7 kDa. En el carril 2 (ELP2) no se observaron bandas. En el carril 3 ELMS se observaron bandas de 47, 36, 32, 28, 26 y 24 kDa. En el carril número 4 (ELTMS) se observaron bandas de 29 y 25 kDa.

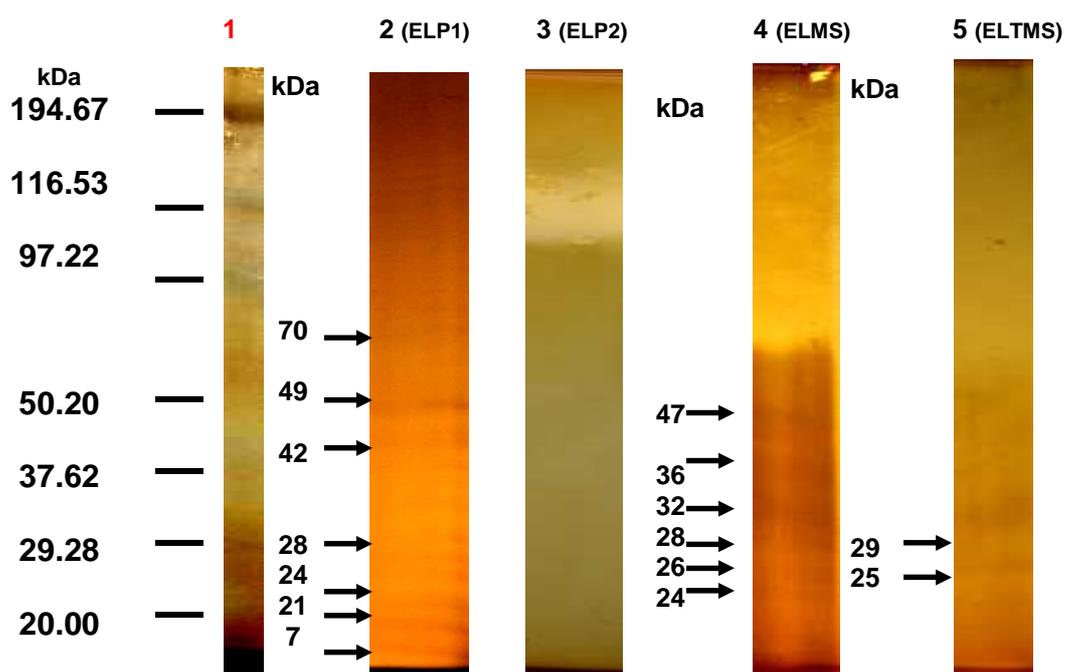


Figura 9.- Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración plata. 20 μ L/pozo por cada muestra. 1 Masa molecular (M). 2. ELP1; 3. ELP2; 4. ELMS; 5. ELTMS.

5.1.4- Perfil proteico de la mezcla comercial polen de gramíneas IV teñido con coloración de plata.

La mezcla de polen de las gramíneas de una marca comercial que incluye a *Festuca pratensis*, *Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Dactylis glomerata*, se le realizó un proceso de precipitación con acetona para separar la capa de glicerol que protege a la mezcla de polen. La figura 10 muestra la diferencia significativa entre la muestra procesada (carril con el número 2) y la muestra pura (carril con el número 3). La muestra procesada muestra un perfil proteico de 5 bandas de masa molecular aproximada de 71, 52, 44, 28 y 23 kDa. En la muestra no procesada no se observaron bandas.

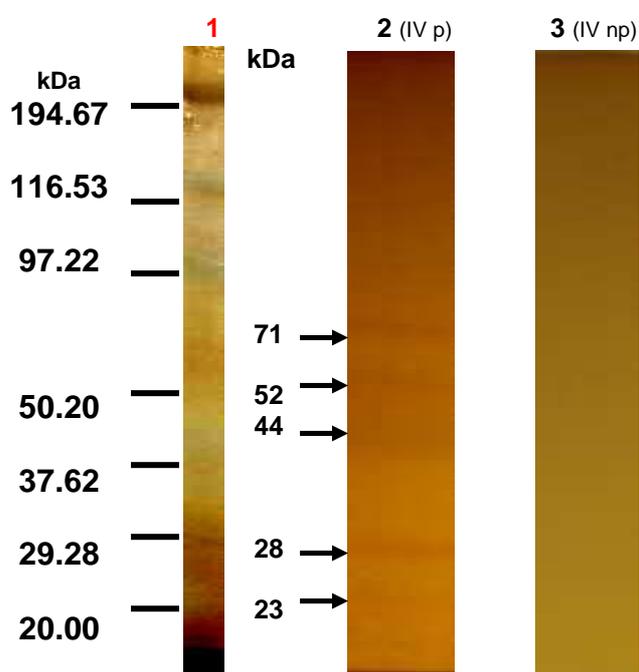


Figura 10.- Geles de poliacrilamida al 10% teñido con coloración de plata. 20 μ L/pozo por cada muestra. 1 Masa molecular (M). 2. IV (procesado); 3 IV (no procesado).

5.2- Determinación de la concentración de proteínas de los extractos de capim melao.

Tabla I.- Concentración de proteínas de los extractos de capim melao.

MUESTRAS	Miligramos de proteínas por mililitro (mg/mL)
EPTMS	7,700
EP	0,984
ELMS	7,756
ELP1	1,729

EPTMS= Extracto preparado con tris HCl de materia seca.

EP= Extracto puro.

ELMS= Extracto liofilizado de materia seca.

ELP1= Extracto liofilizado puro 1

La concentración de proteínas de los extractos se determinó por el método de Lowry (1951). Se puede observar en la tabla I la diferencia significativa que existe entre los extractos extraídos con TBS y los extractos preparados directamente de la materia seca. El extracto ELP1 (resaltado en azul) fue el extracto utilizado inicialmente. Luego de estos resultados se comenzó a utilizar el extracto ELMS (resaltado en rojo).

5.3- Identificación de sueros reactivos para la respuesta IgE con el extracto de capim melao por dot-blot en membranas de nitrocelulosa.

Esta técnica se usó como criterio para seleccionar cual de los 4 extractos obtenidos inicialmente EPE, EPacla, ELP1, EP (Los tres extractos puros no liofilizados y el primer extracto obtenido liofilizado) era el indicado para realizar el análisis bioquímico.

Se utilizaron 3 tiras de membranas a las cuales se les colocó una gota de cada extracto de manera que las proteínas se adhirieran a la membrana y se colocó una gota adicional de PBS como control negativo. La tira de membrana número 1 fue incubada con el suero de un paciente positivo para el capim melao (control positivo). La tira de membrana número 2 fue incubada con un *pool* de sueros con nivel alto de IgE Total. La tira de membrana con el número 3 fue incubada con un *pool* de sueros de pacientes con nivel medio de IgE Total. La figura 11 muestra el resultado del dot-blot realizado con los extractos, se pudo observar En la membrana numero 2 que el extracto ELP1 fue el único reconocido por los sueros de los pacientes con altos niveles de IgE Total. Mientras que en la membrana número 3 no hubo reconocimiento por el suero de los pacientes.

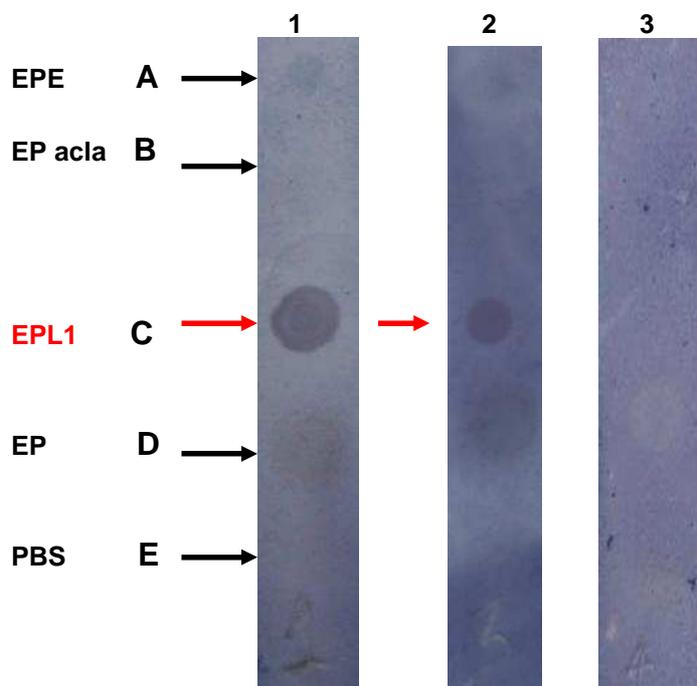


Figura 11.- Membranas de nitrocelulosa con los 4 extractos que mayor cantidad de bandas se observaron en los geles de poliacrilamida. A. EPE; B. EPacla; C. EPL1; D. EP; E. PBS (Control negativo) 1. Membrana incubada con un suero de alto nivel de IgE total (control positivo) 2. Membrana incubada con *pool* de sueros con alto nivel de IgE total. 3. Membrana incubada con *pool* de sueros con nivel medio de IgE total.

5.4- Prueba de inmunodetección con sueros de los pacientes del estado Monagas utilizando el extracto (ELP1) como antígeno.

En esta parte de nuestro estudio utilizamos 25 sueros del estado Monagas (tabla II) 7 con niveles altos de IgE Total y los 14 con niveles medios de IgE total y 4 con niveles bajos de IgE total. De los 25 sueros utilizados, sólo uno suero con el código asn 12 mostró reactividad frente a las proteínas del extracto ELP1 de capim melao. Este resultado sugiere que la concentración de proteínas del extracto utilizado no era suficiente para obtener resultados positivos en el inmunoblot.

Tabla II. Veinticinco sueros de pacientes seleccionados del estado Monagas para la inmunodetección

Número	Código del Paciente	IgE Total
1	lj 6	>2000
2	asn 12	>2000
3	cz 43	>2000
4	bd 9	>2000
5	cd 37	>2000
6	lk 14	>2000
7	lm 24	>2000
8	x2	570
9	x	420
10	gl 24	534
11	nm 15	576
12	gt 45	582
13	cs 14	604
14	mr 35	645
15	vd 10	791
16	bs 19	778
17	md 41	477
18	rb 44	444
19	sm 50	410
20	cs 19	576
21	x5	488
22	pa 49	266
23	pi 35	263
24	rg 14	218
25	pm 36	154

5.4.1- Suero reactivo.

La figura 12 muestra una tira de membrana de nitrocelulosa con proteínas transferidas del extracto (ELP1) confrontada con el suero del paciente asn 12 que fue el único que mostró reactividad a proteínas del capim melao y la correspondencia de las bandas en el gel. Se puede observar dos banda de 48 kDa y otra de 33 kDa aproximadamente que concuerdan con las bandas de 49 kDa y 28 kDa identificadas con las flechas rojas en el gel del mismo extracto teñido con coloración de plata .

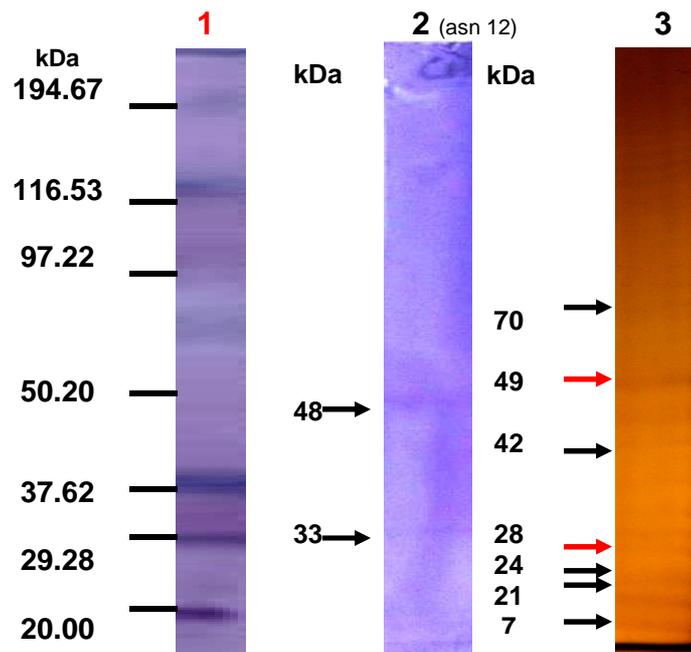


Figura 12- Tira de membrana con reconocimiento de proteínas por el suero del paciente. **1.** M; **2.** Suero **asn 12** **3.** Gel de poliacrilamida de capim melao teñido con coloración de plata. Obsérvese dos bandas de aproximadamente 48 y 33 kDa en la tira número 2.

5.5- Prueba de inmunodetección con sueros de los pacientes del estado Monagas y Caracas utilizando el extracto (ELMS) como antígeno.

Se utilizaron los 25 sueros de Monagas (tabla II) y 18 sueros de Caracas, 4 sueros con nivel alto de IgE Total y 11 sueros con nivel medio de IgE Total y 3 con nivel bajo de IgE Total (tabla III). Se escogió el extracto liofilizado de materia seca (ELMS) para realizar esta parte de nuestro estudio debido a que es más sencillo de elaborar y obtuvo la mayor concentración inicial de proteínas.

Se realizaron preparativos (gel con una sola muestra) con el fin de transferir mayor cantidad de proteínas a las membranas. Conjuntamente con membranas de nitrocelulosa se comenzó a utilizar membranas de PVDF debido a que no hay que bloquearla y por su mayor afinidad hacia las proteínas.

Tabla III. Dieciocho sueros seleccionados de Caracas para la inmunodetección

Número	Código del paciente	IgE Total
1	5	2000
2	1.7	2000
3	1.9	2000
4	1.8	2000
5	9	479
6	1.3	512
7	2	414
8	1	594
9	25	569
10	1.11	474
11	1.14	468
12	15	446
13	23	423
14	1.1	961
15	32	404
16	31	301
17	7	130
18	12	193

La figura 13 muestra 10 tiras de membranas con 10 sueros diferentes que mostraron reactividad hacia las proteínas del capim melao y la correspondencia de las bandas en el gel. Se puede observar bandas de masa molecular de 65, 49, 48, 44, 38, 35, 33, 31, 28, 27, 21 kDa aproximadamente. La banda de 35 kDa marcada en rojo en la tabla III es la se repite con una frecuencia de 0,4. El suero de Caracas 1.9 (tira 10, número en rojo) mostró el mayor número de bandas visibles.

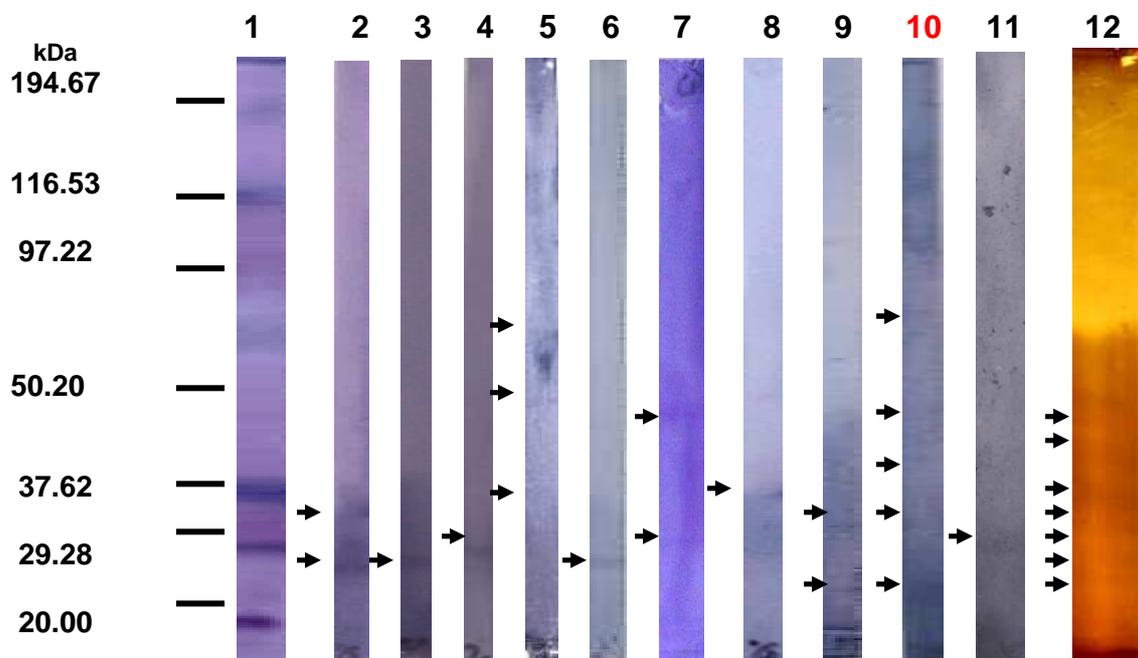


Figura 13- Reconocimiento de proteínas del extracto ELMS de capim melao en membranas nitrocelulosa por los sueros de los pacientes. Tira 1 (M); Tira 2 suero (1.3); Tira 3 suero (gl 24); Tira 4 suero (1.8); Tira 5 suero (x5); Tira 6 suero (x2); Tira 7 suero (asn 12); Tira 8 suero (x); Tira 9 suero (bs 19); Tira 10 Suero (1.9); Tira 11 Suero (1.11); 12. Gel de poliacrilamida del extracto ELMS de capim melao teñido con coloración de plata.

La tabla IV muestra los 10 sueros que mostraron reactividad frente a las proteínas del capim melao utilizando el extracto ELMS. Los sueros de los pacientes de Caracas los denominamos con la letra C y los sueros de los pacientes de Monagas los denominamos con la letra M.

Tabla IV.- Sueros de pacientes que mostraron reactividad a las proteínas de capim melao.

Número de la tira	Código del paciente	Masa molecular (kDa)	Localidad
2	1.3	35, 28	C
3	gl 24	27	M
4	1,8	31	C
5	x5	65, 49, 38	M
6	x2	28	M
7	12 asn	48,33	M
8	x	35	M
9	bs 19	35, 24	M
10	1.9	65,48, 44, 35, 24	C
11	1.11	28	C

C = Caracas
M = Monagas

5.6- Prueba de inmunodetección con sueros de pacientes del estado Monagas y Caracas utilizando el extracto procesado de gramíneas IV como antígeno.

Una vez determinado el grupo de sueros con reactividad al capim melao se procedió a determinar un grupo de sueros con reactividad a la mezcla de gramíneas IV. Se utilizaron 4 sueros con nivel alto de IgE Total y 11 sueros con nivel medio de IgE Total de Caracas y de Monagas sólo los sueros que resultaron reactivos al capim melao y que se encuentran en la tabla III.

La figura 14 muestra las tres tiras de membranas de PVDF con sueros que mostraron reactividad para la mezcla y la correspondencia de las bandas en el gel. Se puede observar en la tira 2, dos bandas de masa molecular de 28 y 24 kDa. En la tira 3, dos bandas de 35 y 31 kDa. En la tira 4, tres bandas de 86, 35 y 28 aproximadamente.

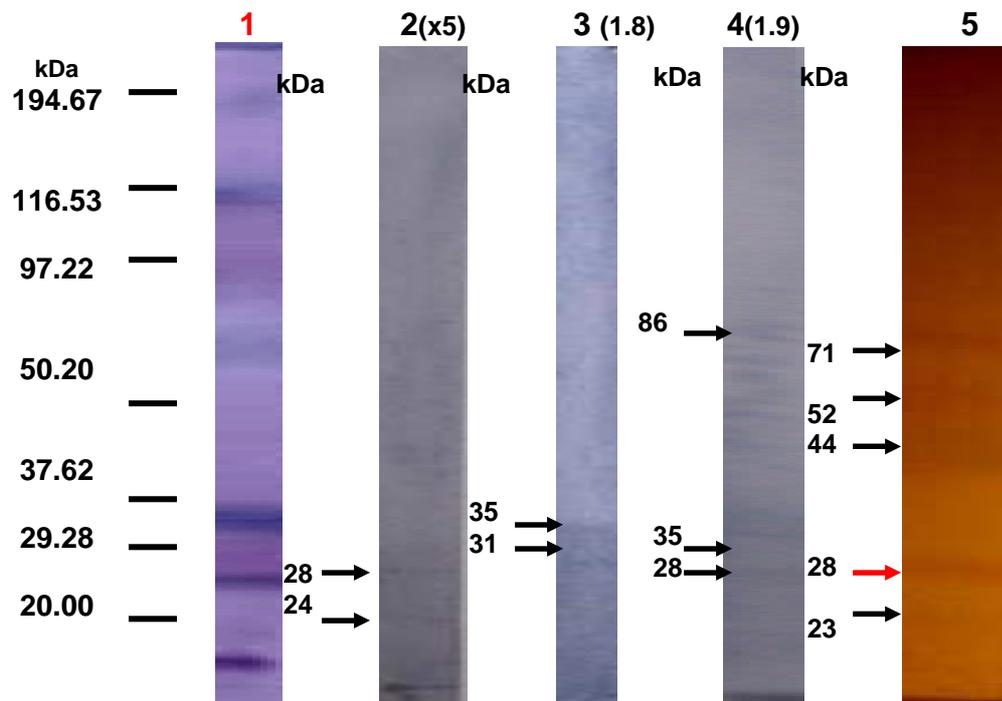


Figura 14- Tiras de membrana de PVDF con reconocimiento de proteínas de gramíneas IV por los sueros de pacientes. Tira 1 (M); Tira 2 suero (x5); Tira 3 suero (1.8); Tira 4 suero (1.9); 5. Gel de poliacrilamida del extracto de gramíneas IV procesado teñido con coloración de plata.

5.7- Determinación de reactividad cruzada con prueba de inhibición de los sueros reactivos a gramíneas IV.

Para determinar si existe o no reactividad cruzada entre las proteínas del polen de capim melao y las de la mezcla comercial gramíneas IV se realizó una prueba de inhibición del *pool* sueros reactivos a gramíneas IV con diluciones seriadas de 1/50; 1/25 y 1/12.5 respectivamente del extracto ELMS de capim melao, con el fin de obtener a que concentración comienza la inhibición del suero.

La dilución del suero fue de 1/20. La figura 15 muestra 4 tiras de membranas de PVDF en las cuales se transfirieron las proteínas de las gramíneas IV confrontadas con el *pool* de sueros inhibidos previamente y la correspondencia de las bandas en el gel. Se puede observar en la tira de membrana con el número 2 que es nuestro control positivo (suero sin capim melao) la presencia de 2 bandas de masa molecular de 33 y 28 kDa aproximadamente.

La banda de 33 kDa se observa en las 3 siguientes tiras no así la banda de 28 kDa que deja de observarse inclusive en la mayor dilución de capim melao. Este resultado nos sugiere que existe reactividad cruzada por lo menos con una de las proteínas de gramíneas IV.

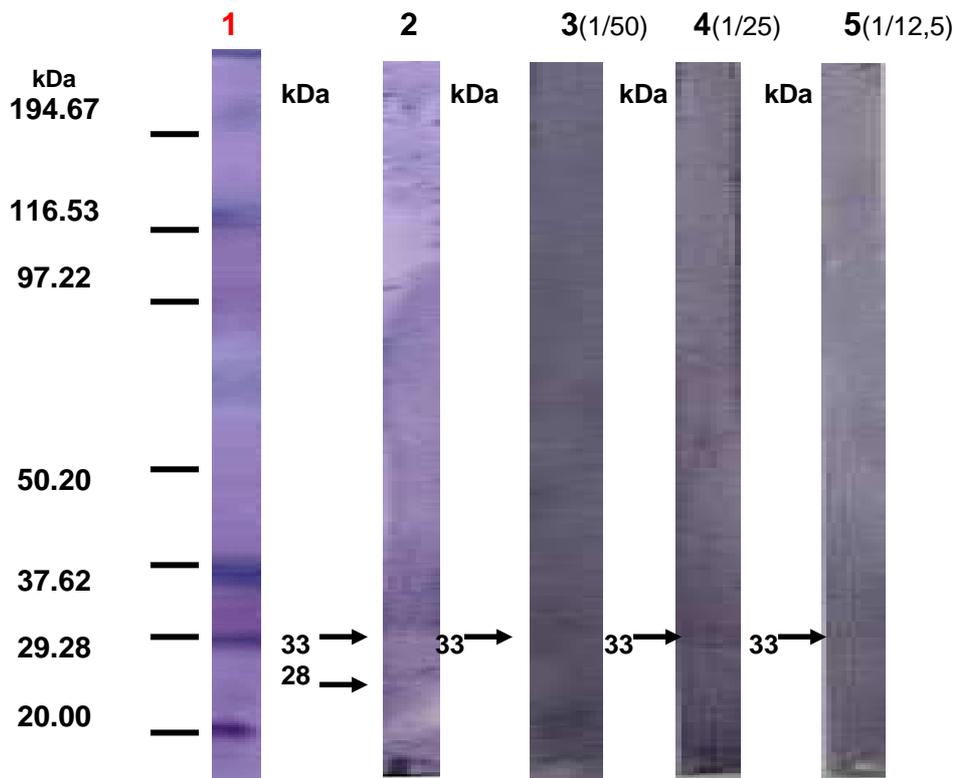


Figura 15- Tiras de membrana con proteínas transferidas de gramíneas IV confrontadas con un *pool* de sueros de pacientes reactivos a la mezcla, incubados con diferentes diluciones de capim melao. 1. M; 2.control positivo; 3. Dilución 1/50; 4. Dilución 1/ 25; 5. Dilución 1/12,5.

5.7.1- Determinación de reactividad cruzada con prueba de inhibición de los sueros reactivos a capim melao.

Para corroborar la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas del polen de capim melao y las de la mezcla comercial gramíneas IV se realizó una prueba de inhibición del *pool* sueros reactivos a capim melao. De la misma manera que en el experimento anterior, se hicieron diluciones seriadas de 1/50; 1/25 y 1/12.5 respectivamente del extracto gramíneas IV previamente procesado. La dilución del suero fue igualmente de 1/20.

La figura 16 muestra 4 tiras de membranas de PVDF en las cuales se transfirieron las proteínas de las capim melao confrontadas con el *pool* de sueros pre-absorbidos y la correspondencia de las bandas en el gel.

El control positivo arrojó la presencia de 3 bandas proteicas de masa molecular de 65; 44 y 33 kDa aproximadamente. De forma muy tenue se puede observa la banda de 44 kDa en la tira de membrana con dilución 1/50 de gramíneas IV denotada con el número 3. A medida que se aumentaba la dilución del extracto en el *pool* de sueros no se observaron ninguna de las 3 bandas. Este resultado nos sugiere que la inhibición fue completa con respecto a nuestro control.

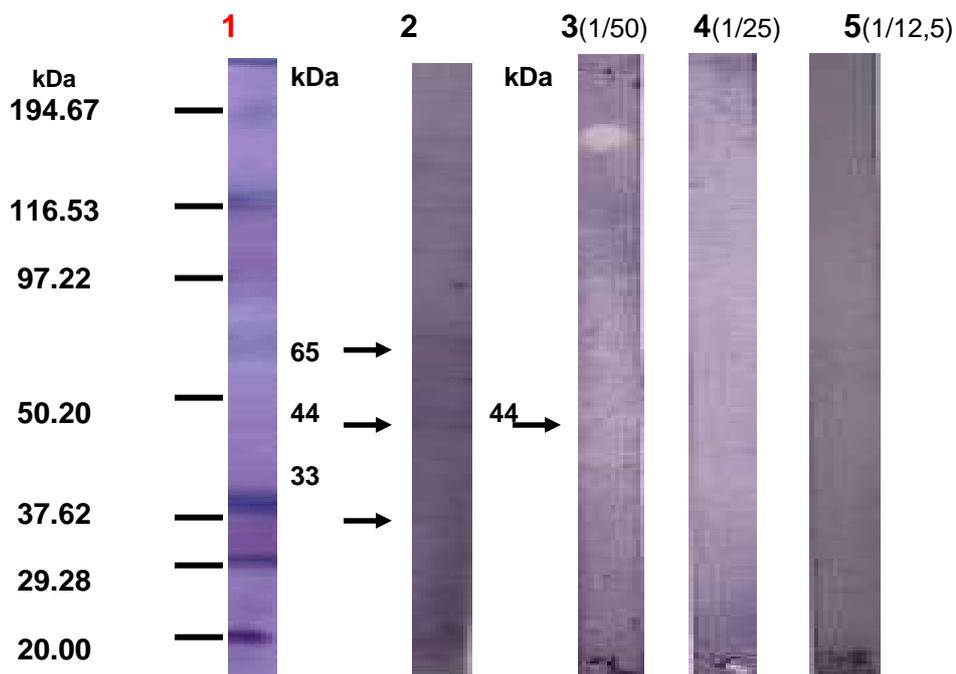


Figura 16- Tiras de membrana con proteínas transferidas de capim melao confrontadas con un *pool* de sueros de pacientes reactivos al capim melao, incubados con diferentes diluciones de gramíneas IV. 1. M; 2.control positivo; 3. Dilución 1/50; 4. Dilución 1/ 25; 5. Dilución 1/12,5.

5.8- Respuesta de anticuerpos IgE específica de sueros reactivos al polen de capim melao mediante la técnica de ELISA.

La tabla V muestra la respuesta de 25 sueros en pacientes con diferentes niveles de IgE total y su reactividad frente a antígenos de capim melao. Reflejado en el promedio de las absorbancias (Abs) obtenidas. Para esta parte del estudio se utilizó el extracto ELMS.

Tabla V.- Resumen de resultados del análisis de los sueros para medir la respuesta de IgE específica a capim melao mediante la técnica ELISA. Los códigos resaltados pertenecen a los 9 sueros de pacientes que mostraron reactividad en el western blot.

Número	Código del Paciente	Localidad	Nivel IgE Total	Valor de IgE Total	Reac. al cm	Promedio Abs.
1	25	C	medio	569	.-	0,334
2	x	M	medio	420	.+	0,353
3	gl 24	M	medio	534	.+	0,272
4	nm 15	M	medio	576	.-	0,298
5	1.7	C	alto	>2000	.-	0,31
6	1.3	C	medio	512	.+	0,358
7	2	M	medio	414	.-	0,457
8	1	C	medio	594	.-	0,344
9	as 27	M	bajo	229	.-	0,319
10	asn 12	M	alto	>2000	,+	0,475
11	cz 43	M	alto	>2000	.-	0,419
12	bs 19	M	medio	778	.+	0,301
13	1.11	C	medio	474	.+	0,325
14	1.14	C	medio	468	.-	0,37
15	bd 9	M	alto	>2000	.-	0,354
16	7	C	bajo	130	.-	0,343
17	cs 19	M	medio	576	.-	0,384
18	23	C	medio	423	.-	0,399
19	1,1	C	alto	961	.-	0,299
20	fe 14	M	bajo	181	.-	0,345
21	12	C	bajo	193	.-	0,401
22	32	C	medio	404	.-	0,383
23	31	C	bajo	301	.-	0,335
24	X5	M	medio	488	.+	0,416
25	x2	M+	0,346
B	0,271
c-	1,4	C	...	0	...	0,352
c+	1,9	C	alto	>2000	.+	0,592

c- = control negativo; c+ =control positivo; B= Blanco; Reac al cm =reactivo al capim melao. C= Caracas; M= Monagas

Los sueros de los pacientes utilizados se dividieron en tres grupos según sus niveles de IgE Total. El rango para el grupo denominado bajo va desde 100 UI/mL de IgE Total hasta 399 UI/mL IgE Total. El rango para el grupo denominado medio va desde 400 UI/mL IgE Total hasta 899 UI/mL IgE Total. El rango para el grupo denominado alto va desde 900UI/mL de IgE Total en adelante. Como se muestra en la tabla VI se calculó el promedio de las absorbancias obtenidas por triplicado para cada uno de los sueros y se le restó el blanco.

Tabla VI.- Valores de los promedios de las absorbancias obtenidas por la técnica ELISA de los sueros con diferentes niveles de IgE Total.

Nros. de Sueros	Nivel de IgE T	Promedio Abs	Blanco	Abs corregida
5	Alto	0,371	0,271	0,100
14	Medio	0,352		0,080
5	Bajo	0,326		0,054

En la figura 19 se puede observar con mayor claridad los datos obtenidos en la tabla VI los sueros del grupo con alto nivel de IgE Total obtuvieron un mayor promedio en el valor de las absorbancia obtenidas por ELISA, que el grupo denominado medio y este a su vez un mayor promedio que el grupo denominado bajo.

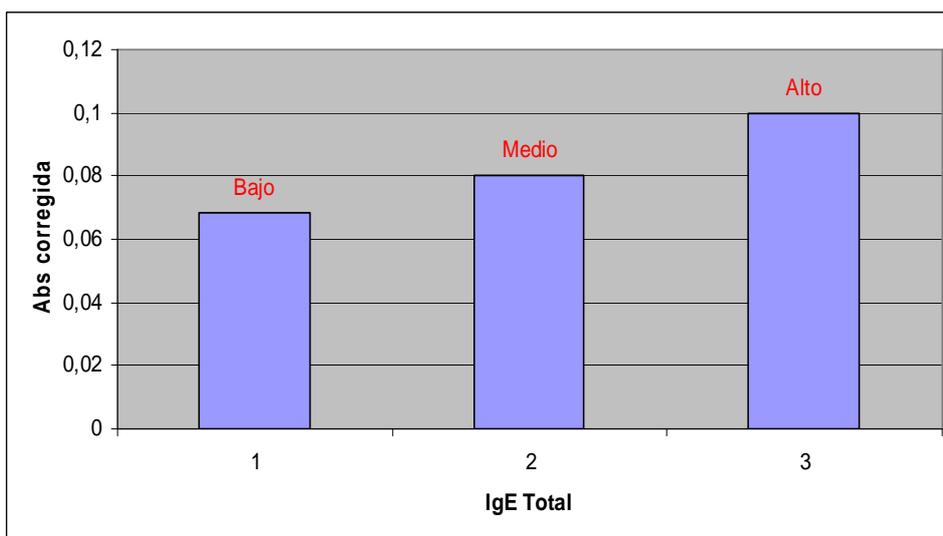


Figura 17- Gráfico de las absorbancias corregidas obtenidas por la técnica ELISA de los tres grupos de pacientes clasificados por su nivel IgE Total

Este resultado nos sugiere que hay una correspondencia entre los niveles de IgE total con los niveles de IgE específica para las proteínas del polen de capim melao.

La tabla número VII muestra los valores del promedio de la absorbancia obtenida por la técnica de ELISA, los valores de la absorbancia corregida, la desviación estándar (D.S.), la suma de la de D.S con el promedio total de las absorbancias corregidas de los 25 sueros utilizados para medir IgE específica a capim melao con el fin de establecer un valor que se denomina cut off, el valor obtenido fue de 0,141. Los valores en blanco corresponden a los sueros con los códigos asn 12, x5 y 1.9 (c+) que mostraron reactividad al polen de capim melao en el western blot y están por encima del cut-off.

Tabla VII.- Valores de los promedios de las absorbancias y desviación estándar de los 25 sueros utilizados para medir la IgE específica a capim melao. Los valores resaltados en azul pertenecen a los 10 sueros que mostraron reactividad al polen de capim melao en el western blot.

Número	Absorbancia	Absorbancia corregida	Promedio de la absorbancia corregida (PĀbs c)	DS	PĀbs c + DS
1	0,334	0,063	0,092	0,049	0,141
2	0,353	0,082			
3	0,272	0,001			
4	0,298	0,027			
5	0,310	0,039			
6	0,358	0,087			
7	0,457	0,186 *			
8	0,344	0,073			
9	0,319	0,048			
10	0,475	0,204*			
11	0,419	0,148*			
12	0,317	0,046			
13	0,325	0,054			
14	0,370	0,099			
15	0,354	0,083			
16	0,343	0,072			
17	0,384	0,113			
18	0,399	0,128			
19	0,299	0,028			
20	0,345	0,074			
21	0,358	0,087			
22	0,383	0,112			
23	0,335	0,064			
24	0,416	0,145*			
25	0,346	0,075			
B	0,271				
c-	0,352	0,081			
c+	0,592	0,321			

c- = control negativo; c+ =control positivo; B= Blanco; DS = Desviación estándar; PĀbs c= Promedio de la absorbancia corregida; PĀbs c + DS = Suma del promedio de la absorbancia corregida y desviación estándar. * Valores por encima del cut-off

5.9- Cut-off

A partir de las absorbancias obtenidas por la técnica ELISA se logró calcular el valor denominado cut-off (0,141) que nos permite discriminar cual suero tiene potencialmente alto nivel de IgE específica al polen de capim melao. La figura 18 muestra con mayor claridad lo obtenido en la tabla VII. Se puede observar 4 sueros que están por encima de este valor. Los puntos en rojo pertenecen a los sueros que resultaron reactivos al polen de capim melao en el western blot.

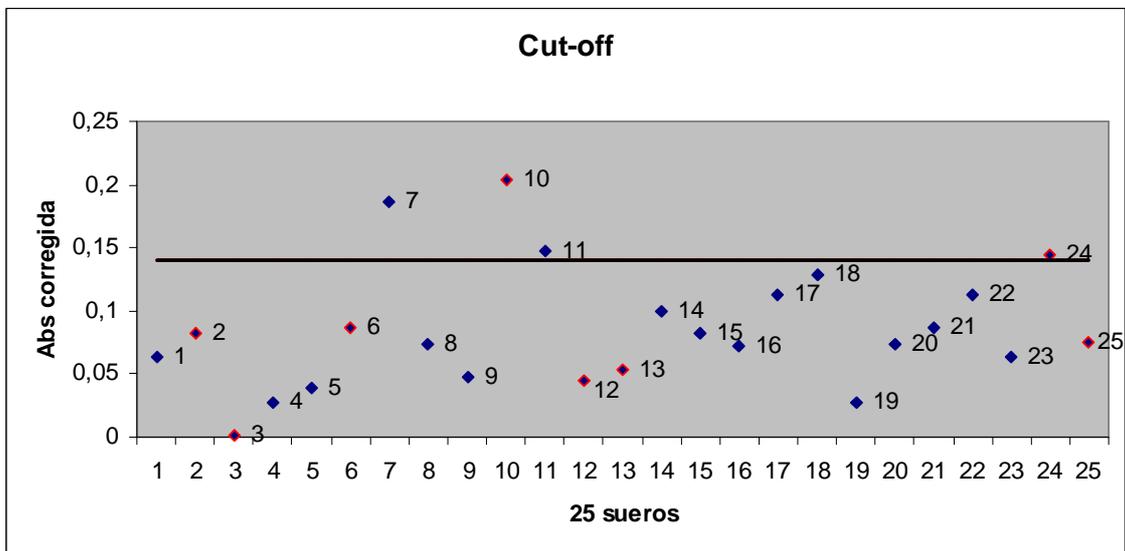


Figura 18- Gráfico del cut-off de las absorbancias obtenidas por la técnica ELISA de los 25 sueros utilizados para medir la IgE específica a capim melao

5.10- Coeficiente de correlación lineal de Pearson.

El coeficiente de correlación de Pearson nos permitió establecer si hay una dependencia lineal entre los valores de IgE total y las absorbancias obtenidas por la técnica ELISA de los 25 sueros utilizados para medir IgE específica al polen de capim melao. En esta prueba estadística se obtiene un valor r de rango 1 y -1 mientras más se acerca a estos valores, mayor es la dependencia lineal. El valor obtenido en nuestro estudio fue de $r = -2.937 \text{ E-}05$ muy cercano a cero los que nos sugiere que no hay dependencia entre los datos Abs e IgE Total, es decir un suero que tiene alto nivel de IgE Total puede o no puede tener valores altos de absorbancia

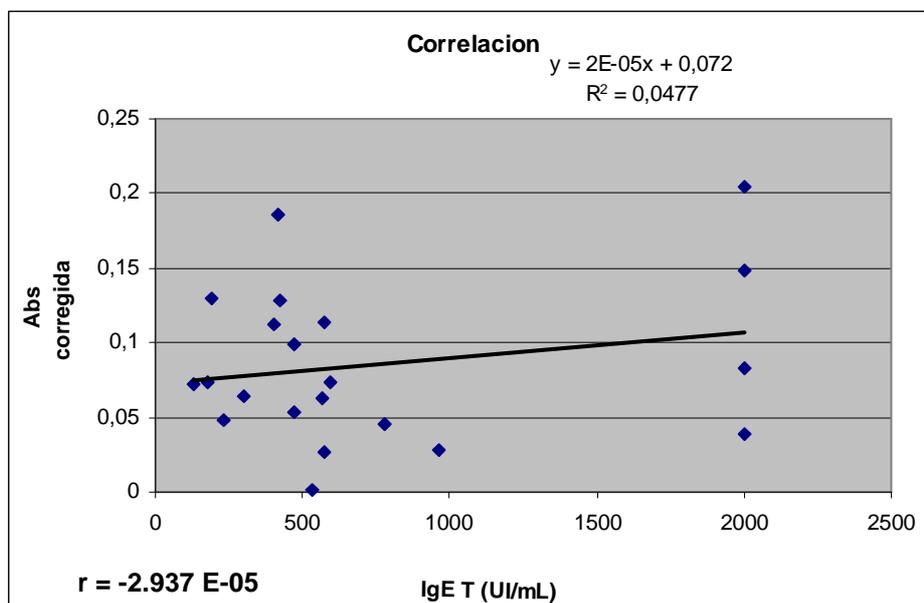


Figura 19- Gráfico del coeficiente de regresión lineal de Pearson. El r obtenido sugiere que no hay correspondencia lineal.

6- DISCUSIÓN.

La familia de las gramíneas consta de unos 650-700 géneros y alrededor de 12.000 especies repartidas por todo el globo, que viven incluso en las regiones más frías o tórridas; tal ha sido su éxito que frecuentemente son dominantes en formaciones vegetales importantes como las sabanas, estepas y vegetación acuática (Subiza y col, 2003).

La alergia al polen de gramíneas se ha convertido en una fuente de estudio en referencia a las enfermedades respiratorias. Entre estas gramíneas se encuentra *Melinis minutiflora*, originaria de África, introducida en Suramérica por Brasil y en la actualidad posee una población abundante en nuestro país lo cual nos sugiere que puede tener una posible implicación en la etiología de alergias respiratorias. En el primer estudio en Venezuela de la gramínea *Melinis minutiflora* realizado por Pinto (1972) se observó que las espigas de capim melao sueltan un abundante polen, cuyos gránulos tiene características parecidas a la de otras gramíneas alergógenas. De igual forma realizó pruebas intradérmicas en pacientes con alergia respiratoria, resultando incidencias muy alta de positividad, aún a diluciones 10 veces mayores que las usadas con otras gramíneas.

En esta investigación por primera vez en Venezuela se logró identificar y caracterizar las proteínas presentes en el polen de capim melao para conocer su capacidad alergénica. Se usaron distintas metodologías con el fin de extraer el material proteico del grano de polen.

Se utilizaron varias metodologías para la extracción del material proteico del grano de polen de capim melao. Precipitado con etanol, aclarado con carbón activado y macerado, se observó que los patrones de bandas de los extractos de capim melao estudiados fueron similares, obteniéndose bandas identificadas generalmente por debajo de los 40 kDa, a excepción del extracto puro donde se observaron dos bandas de 70 y 65 kDa (figura 8). Sin embargo, al incluir el proceso de liofilizado como método para la extracción de proteínas se encontró diferencias significativas en los patrones de bandas observados. Los resultados obtenidos en los geles de poliácridamida teñidos con coloración de plata (Figura 9) muestran que el extracto liofilizado ELP1 presentó un patrón de bandas mayor que los obtenidos con los extractos no liofilizados de masas moleculares de 70, 49, 42, 28, 24, 21 y 7 kDa.

Behrman y colaboradores en el 2006 indican que los alérgenos de pólenes de maleza y gramíneas son mas fáciles de extraer en soluciones acuosas. Pinto en 1972 extrajo el material proteico con una solución de Cocaglicerina para esterilizarlo con NaCl_2 y realizar pruebas intradérmicas. Metodología muy diferente utilizada en este estudio. Es importante resaltar que en un principio se trabajó con los granos de polen ubicados en bolsas y se utilizó TBS para extraerlos, sin embargo, con la finalidad de estandarizar una metodología efectiva para extraer las proteínas del grano de polen se comenzó a trabajar con el material ubicado en tubos de 50 mL que denominamos materia seca, obteniendo así el extracto denominado ELMS que presentó un patrón con un número similar de bandas que el extracto ELP1, de masas moleculares de 47,36, 32, 28, 26, 24 kDa (figura 9).

Estos resultados del patrón de bandas del extracto ELP1 (70, 49, 42, 28, 24, 21 y 7 kDa) y del patrón de bandas del extracto ELMS (47,36, 32, 28, 26, 24 kDa) nos permitieron determinar un perfil proteico del polen de capim melao en base a estos dos extractos.

Ahora bien para el análisis inmunológico utilizamos las técnicas de dot blot y de western blot. En primer lugar, se realizó la técnica dot-blot (figura 11) con la finalidad de establecer si había por lo menos un extracto que pudiera contener proteínas alergénicas.

Se observó reactividad contra el extracto ELP1 por parte de un *pool* de sueros con nivel altos de IgE total. El resultado obtenido en el dot-blot en conjunto con el patrón de bandas obtenido por este extracto en el análisis bioquímico nos sugirió establecer como criterio el uso del extracto ELP1 como antígeno en el western blot.

Los primeros 25 sueros utilizados fueron los de los pacientes del estado Monagas y sólo un suero denotado como asn 12 mostró reactividad frente a las proteínas del extracto capim melao (figura 12). Se observaron claramente dos bandas de 48 y 33 kDa, las cuales pueden corresponder a las observadas en el gel de masas moleculares de 49 y 28 kDa respectivamente. En nuestro conocimiento luego de una sistemática y ardua revisión bibliográfica para saber si han sido identificadas proteínas alergénicas en el polen del capim melao, no encontramos ningún resultado. Esto sugiere que los resultados del presente trabajo representan el primer reporte de proteínas alergénicas reconocidas por el suero de un paciente al polen de capim melao.

Sin embargo, sólo representa el 4% de los sueros utilizados. Posiblemente las causas de este bajo porcentaje se debe a que la concentración de proteínas del extracto utilizado es baja, por lo cual, procedimos a medir la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

El extracto ELMS posee la mayor concentración con un valor 7,756 mg/mL, 4,5 veces más que la concentración del extracto ELP1 que fue de 1,729 mg/mL, lo que nos sugirió utilizar este extracto como antígeno para un nuevo análisis inmunológico.

En esta parte del estudio se incluyeron los sueros de los pacientes de Caracas, debido al agotamiento de algunos de los sueros del estado Monagas. Al realizar los western blot con el extracto ELMS obtuvimos 10 sueros con reactividad a las proteínas del capim melao como se muestra en la figura 13, incluyendo sueros que con anterioridad no habían dado reactividad. Se observaron bandas de 65, 49,48, 44, 38, 35,33, 31, 28, 27 y 24 kDa (tabla IV). La banda de 35 kda fue la que se observó con mayor frecuencia, 4 de los 10 sueros reconocieron esta banda, esto representa el 40 %, porcentaje 10 veces mayor que el obtenido con el extracto ELP1. Posiblemente esta banda corresponda a la de 36 kDa en el gel con las proteínas separadas de ELMS. El suero del paciente de Caracas marcado con el código 1.9 fue el que mayor cantidad de bandas reconoció, de masas moleculares de 65, 48, 44, 35, 24 kDa aproximadamente. Es importante destacar la diferencia significativa observada en los resultados obtenido en esta parte del estudio.

De tener un sólo suero que mostró reactividad, se obtuvieron 10 sueros que mostraron reactividad, incluyendo el suero que ya había dado resultado positivo (asn 12). Este resultado nos sugirió que la baja concentración de proteínas en los extractos utilizados con anterioridad era la causa de obtener falsos negativos.

De igual manera se determinó el perfil proteico de la mezcla comercial de gramíneas de nuestro interés (figura 10) donde observamos un patrón de bandas de 71, 52, 44, 28,23 kDa para la muestra procesada. Mientras que la muestra no procesada no presentó bandas, esta diferencia se debe a que el polen de esta mezcla viene protegido por una capa de glicerol la cual tuvo que ser solubilizada con acetona. Se realizó un western blot con el extracto de esta mezcla como antígeno (figura 14) con el fin de determinar los sueros reactivos a esta mezcla.

De los 25 sueros utilizados, 15 de Caracas con niveles altos y medios de IgE total (Tabla III) y los 10 de Monagas que mostraron reactividad al capim melao (Tabla IV), sólo 3 sueros mostraron reactividad a la mezcla. Posiblemente la precipitación con acetona pudo destruir la antigenicidad de las proteínas.

Las bandas observadas en las tres tiras de membranas fueron de 86, 35, 31 y 28 kDa (Figura 14). Las bandas de 35 y 28 kDa se observaron en dos de los tres geles (Figura 14). El suero del paciente de Caracas con el código 1.9 mostró el mayor número de bandas visibles. Este resultado corresponde con el obtenido utilizando al capim melao como antígeno (Figura 13). El suero 1.9 fue reactivo para los dos antígenos mostrando en ambos casos un mayor reconocimiento por parte de la IgE de bandas proteicas.

Según el sub-comité de nomenclaturas de alérgenos de la unión internacional de sociedades de inmunología año 2010, la banda de masa molecular de 28 kDa puede tratarse de una proteína de nombre beta-expansina que es uno de los componentes de la pared celular y se encuentra en tres de las cinco gramíneas presentes en la mezcla, estas gramíneas son: *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Dactylis glomerata*.

Un punto a tomar en cuenta es la dificultad en diagnosticar alergia frente a gramíneas dado que las proteínas son muy parecidas y hay reacciones cruzadas debido a su acercamiento desde el punto taxonómico. Por lo tanto encontrar reacción cruzada entre capim melao y alguna de las proteínas en la mezcla sería de gran importancia a los fines de identificar proteínas comunes y no comunes. Para ello, realizamos pruebas de inmuno-inhibición para los pólenes de capim melao y gramíneas IV.

Primero se concentró un *pool* de sueros con reactividad al polen de gramíneas IV. El cual se preabsorbió con el extracto ELMS de capim melao como inhibidor en diferentes concentraciones y se incubó con tiras de membrana con proteínas transferidas de gramíneas IV. Luego se concentró un *pool* de sueros con reactividad al polen de capim melao, El cual se preabsorbió con el extracto procesado de la mezcla de gramíneas IV como inhibidor en diferentes concentraciones y se incubó con tiras de membrana con proteínas transferidas de capim melao.

Para las tiras de membrana con proteínas transferidas de gramíneas IV se observó inhibición en una banda de masa molecular de 28 kDa (Figura 15) que puede tratarse de la beta expansina mencionada anteriormente. Para las tiras de membrana con proteínas transferidas de capim melao se observó inhibición de las tres bandas observadas en el control positivo de masa molecular de 48, 36 y 32 kDa respectivamente (Figura 16). En un principio la banda de 36 kDa se observó en la membrana con el inhibidor menos concentrado, sin embargo, a medida que la concentración se aumentó en un 100% la banda desapareció.

Esta banda de 36 kDa presente en el control positivo de capim melao podemos correlacionarla con la banda de 35 kDa que con mayor frecuencia se observó en las tiras de membranas con los sueros reactivos a capim melao.

Estos resultados nos sugieren que existe reactividad cruzada en al menos 3 proteínas entre el polen de capim melao y el polen de al menos una gramínea de la mezcla IV. Es importante destacar que estos resultados obtenidos son los primeros reportados en nuestro país, sin embargo, se debe profundizar más en este aspecto debido a que la presencia tenue observada de la banda de 36 kDa en la tira con el inhibidor menos concentrado, puede dar indicios de encontrar al menos una proteína que no presente reactividad cruzada y se pueda utilizar como alérgeno para el desarrollo de una prueba *in vitro* diagnóstico al polen de capim melao.

Por otra parte la existencia de reactividad cruzada entre estas gramíneas coincide con los resultados obtenidos por Subiza y colaboradores en el 2003 que encontraron reactividad cruzada entre *Lolium perenne* y *Poa pratensis* debido a que los alérgenos de las diferentes especies de gramíneas presentan grandes similitudes fisicoquímicas, que explican la gran reactividad cruzada entre ellas. Estas similitudes han permitido la clasificación de los alérgenos en grupos, de forma que los componentes de un mismo grupo tienen en común secuencias moleculares independientemente de la especie de procedencia.

Con respecto a la cuantificación de la IgE específica para capim melao se utilizó la técnica de ELISA. Las absorbancias obtenidas son proporcionales a la cantidad de IgE específica para un antígeno, en nuestro caso el capim melao. Muchos estudios destacan las ventajas de esta técnica para la determinación de IgE específica en sueros como lo describe Arruda en el 2004 resaltando el no utilizar material radiactivo para estas determinaciones.

Es importante destacar que en esta parte de nuestro estudio se nos presentaron algunas limitaciones las cuales nos obligaron a trabajar con ciertas restricciones. Un ejemplo de esto fue el agotamiento de los sueros con reactividad al capim melao. Estos nos dificultó la tarea de estandarizar los parámetros necesarios para la optimización de nuestro resultado. Sin embargo, más del 80% de los resultados obtenidos en la placa de ELISA corresponden a los esperados, evidenciando la sensibilidad y la eficiencia de la técnica.

Inicialmente los sueros utilizados fueron agrupados según sus niveles de IgE Total los cuales dividimos en tres grupos: alto, medio y bajo (Tabla VI). Seguidamente se calculó el promedio de las absorbancias obtenidas para cada uno de los sueros pertenecientes a cada grupo, a estos promedios se les restó la absorbancia del blanco con el fin de obtener el valor real de las absorbancias que arrojaron los sueros o lo que es igual la absorbancia corregida. Se encontró que la mayor absorbancia la obtuvo el grupo denominado alto (figura 17), seguido por el grupo medio y el grupo bajo, este resultado nos sugiere que la IgE específica a capim melao mantiene un patrón similar al obtenido en la cuantificación de la IgE Total.

Con la finalidad de establecer un cut-off para la IgE específica de los sueros de los pacientes, se utilizaron algunos parámetros estadísticos reflejados en la tabla VII. A las absorbancias corregidas obtenidas por la técnica ELISA de los 25 sueros utilizados se les calculó el promedio y la desviación estándar, luego al promedio obtenido se le sumó la desviación estándar con el fin de obtener un valor que establece que suero potencialmente tiene un nivel alto de IgE específica a capim melao.

En nuestro estudio el cut-off se estableció en 0,141 de absorbancia. Esto nos permitió relacionar si algún suero con un valor superior al cut-off presentó reactividad al capim melao en las pruebas de inmunodetección. De igual forma, nos permitió relacionar si este suero con nivel alto de IgE específica a capim melao tiene nivel alto de IgE Total.

Se encontró que dos de los cuatros puntos que están por encima del cut-off en la gráfica 18 pertenecen a sueros reactivos al polen de capim melao incluyendo al suero del paciente de Monagas con el código asn 12, que fue el único suero que mostró reactividad al extracto de capim melao con baja concentración de proteína (ELP1). El otro suero es el denotado como x5, que es precisamente uno de los sueros que mostró reactividad tanto para el capim melao como para el polen de gramíneas IV y por último el suero 1.9 que se utilizó como control positivo debido a que presentó la mayor cantidad de bandas en el western blot.

De igual forma se encontró que 2 de estos 4 sueros tiene niveles altos de IgE Total, el primero es el suero asn 12 y el segundo es el suero cz 43 con niveles mayores de 2000 UI/mL (Tabla V).

Ahora bien para corroborar esta relación entre la IgE Total y la IgE específica se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson (Figura 19). No se encontró dependencia lineal entre las absorbancias corregidas de los sueros utilizados en la ELISA y los niveles de IgE Total ($r=-2.937 \text{ E-05}$) Lo que nos indica que un suero con niveles altos de IgE total puede o no puede tener un valor alto de absorbancia. Esto puede explicar de alguna manera el hecho de que 8 de los 10 sueros reactivos están por debajo del cut-off establecido.

7- CONCLUSIONES.

1. Se logró estandarizar un método para la extracción del material proteico del polen de capim melao Obteniéndose el extracto ELMS.
2. Se logró mostrar el perfil electroforetico de las proteínas del extracto del polen de capim melao en base a los extractos liofilizados puro 1 (ELP1) y el extracto liofilizado de materia seca (ELMS).
3. Se identificaron básicamente 3 proteínas del extracto de capim melao que fueron reconocidas por la IgE específica presente en el suero de pacientes alérgicos de 33kda, 44kDa y 65kDa.
4. Las proteínas alergénicas de capim melao de 33kDa, 44Kda, y 65Kda presentan reacción cruzada con algunas proteínas de la mezcla de gramíneas IV.
5. Dos de los sueros que resultaron reactivos al polen de capim melao en el western-blot denominados con los códigos asn 12; x5 presentaron valores de absorbancia por encima del cut-off establecido definiéndose así como sueros con niveles altos de IgE específico al capim melao.
6. No se encontró dependencia lineal entre los valores de absorbancia y los valores de IgE Total para los sueros utilizados en la técnica de ELISA.

8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AAIC.2007. Alergia a Gramíneas. *Comité de alérgenos e inmunoterapia*. **38 (4)**:162-170.
- Abbas, A, Lichtman, A. 2004. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. *Saunders*. Segunda Edición, Philadelphia, E.U.A.
- Arrudas, E. 2004. Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica. *Rev Med Hered*. **15**:113-117.
- Barber, D. 2003 Gramíneas y alérgenos y reactividad cruzada. *Alergol Inmunol Clin* **18 (3)**: 24-28.
- Beck, H, Korsgaard, J. Atopic.1989 .Dermatitis and house dust mites. *J. Dermatol*.**120**:245-251.
- Behrman, R, Kliegman, R, Hal, J. 2006. Principios Terapeuticos de las enfermedades alérgicas. Elsevier, Madrid, España.
- Belin, L. 1972. Studies of Birch Pollen Antigens with Special Reference to the Allergenic principal. *Grana*, **12(2)**: 65 — 78.

- Corado, J, Mora S. 2003. Inmunología actual. Bases fisiológicas para la comprensión de las alteraciones del sistema inmunitario, Primera edición, Valencia, Venezuela.
- Fonseca, E. 2001. Dermatitis atopica. Disponible: <http://www.aeped.es/protocolos/dermatologia/dos/dermatopica.pdf> [Consulta el 28 de abril 2009].
- Galindo, H, Girón, K, Pedroza, A. 2007. Reacciones cruzadas. *Alergia, abedul y alimentos*. **16(1)**: 25-28.
- García, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag*.**1(2)**:31-41.
- Green, W, Cyster, J, Chua, K, O'Brian, R, Thomas, W. 1991. IgE and IgG binding peptides expressed from fragments of cDNA encoding the mayor house dust mite allergen Derp 1. *J Immunol*.**147**:3768-3773.
- Guidos, G, Almeida, V. 2005. Polinosis y aeroalergenos. **14**: 2. pp 52-55.
- Hernández, A, Montilla, G, Baruch Z. 1983. Fonología y Repartición de Biomasa en Gramíneas Nativas e Introducidas en la Cordillera de la Costa. *Informe Final CONICIT*. Proyecto **S1**:1135.

- Hogan C, Michael.2008. Toxicodendron diversilobum. GlobalTwitcher. *Western poison-oak ed.* Nicklas Stromberg. Disponible en: http://globaltwitcher.auderis.se/artspec_information.asp?thingid=82914 [Consulta el 25 de enero 2010].
- Hurtado, I, Riegler-Goihman, M. 1986. 'Air-Sampling Studies in a Tropical Area'. *Grana*. **25**: 1, 63 – 68.
- Laemmli, U, Molbert, E, Showe, M. 1970. *J Mol. Biol.*,**49**:99.
- Lowry, O, Rosenbrough, N, Farr, A, Randall, U. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Marsh D, Goodfriend L, King T, Lowenstein H.1986. Allergen nomenclature. *Bull WHO*, **64**:767-770.
- Martínez, C, Subiza, G, Lestache, F, Sellers, F, Farr, I. 2000. Estudio epidemiológico de la rinitis alérgica en la consulta de alergología. Relación de la sintomatología estacional con los niveles de polen atmosférico. *Alergol Inmunol Clin*. **15** (Extr. 3): 116-117(A).
- Mondolfi, E. 1956. Capim melao o pasto gordura. Extensión Pecuaria. Ministerio de Agricultura y Cría. *Publicación Nº 1: Serie C*.

- Newmark, F. 1980. aereoalergens.in.lockey RF. *Clin allergy immunol.* 634.
- Pacheco, D, Zambrano, J, Sthormes, G. **2006**.Las gramíneas (Poaceae) del estado Zulia, Venezuela. Lista de los géneros presentes *Rev.Fac.Agron(LUZ).***23**:223-23 Disponible en: http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/abril_junio2006/pacheco.pdf [Consulta el 25 de abril 2009].
- Pascual, C, Crespo, I, Martín, E. 1993. Actualización en alergenitos alimentarios. *Alergol Inmunol Clin.* **8**:125-131.
- Pinto, B. 1972. Polen de *melinis minutiflora Beauv.* (Capim Melao): Contaminante Biológico del aire Con Posible Implicación en La Etiología de alergia Respiratoria. *Acta Cient. Vzlna.* **23**:155-156.
- Ponce, D. 2004. Hipersensibilidad vs tolerancia *Gac Méd Cs.* **112**: (4).
- Rincón,J. 2005. Gramíneas introducidas bajo riego en el semiárido venezolano. *Manual de Ganadería Doble Propósito.*
- Rodríguez, O, Rodríguez, R .2001. Ensayo clínico diagnóstico en pacientes alérgicos con extracto de polen de *Parthenium hysterophorus.* *Rev Alergia Mex.* **48 (2)**:45-47.

- Rodríguez, O, Rodríguez, R .2002. Ensayo clínico diagnóstico en pacientes alérgicos con extracto de polen de *Cynodon dactylon* (L) *pers*. *Rev Alergia Mex.* **49 (6)**:168-70.
- Rodríguez, R, Villalba M. 1997. Reacciones cruzadas entre alergenos: implicación de los carbohidratos. *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín.* **12(5)**: pp. 269-281.
- Rosas, A, Montes, J,García, E. 2008. Identificación de los alergenos del polen de *amaranthus palmeri* comparando el patron de reconocimiento entre alérgico y no alérgicos. *Rev aler mex;* **55(6)**:215-21.
- Silva, D, Gervasio, A, Sopelete M. 2001 et al. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der a major Dermatophagoides pteronyssinus allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **86 (5)**:545-50.
- Singh, A.B. and Singh, A. 1994. Pollen Allergy- A global scenario. In: *Recent trends in Aerobiology.* ACAAI. Ed. S.N. Agashe, Oxford IBH.
- Spieksma F, Nolard N, Frengueli G, Van Moerbeke, D.1973. Polen atmosférico en Europa. *UCB-Braine-l'Alleud.* 78.

- Straumann F, Bucher C, Wuthrich B. 2000. Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting IgE antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom. *Int Arch Allergy Immunol.* **123(3)**:268-74.
- Sub-comité de nomenclaturas de alergenos de la unión internacional de sociedades de inmunología. 2010. Disponible en: <http://www.allergen.org/Allergen.aspx> [Consulta el 15 de abril 2010]
- Subiza, E, Subiza, J, Jerez, M. 1989. Aerobiología de las gramíneas en los climas de España. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin.* **4**: 45-50.
- Subiza J, Jerez M, Jiménez J. 1995. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol.* **96**: 15-23.
- Subiza, J, Garrido-Lestache, Lahoz, C. 2003. Gramíneas: Aerobiología y polinosis en España. *Alergol Inmunol Clin* **18 (3)**: 7-23.
- Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Of Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4250-4354.
- .Villego, C. 1974. Biología. **Sexta edición**, México D.F., México.

- Wide, I, Bennich, H, Johansson, S.G.O. (1967) Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet*. **2(7526)**:1105-7.
- Williams C, Galli S.2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. **105(5)**:847-859.
- Zdravko, B, Hernández, A, Montilla, M. 1989. Dinámica del crecimiento, fenología y repartición de biomasa gramíneas nativas e introducidas en una sabana neotropical. *Ecotropicos*. **2.(1)**: 1-13.

9- ANEXOS.

Protocolos

Gel de corrida

Reactivos	10%	12%
Agua destilada	4.15 ml	3.35 ml
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
Acrilamida 30%	3.30 ml	4.0 ml
SDS al 10%	100 μ l	100 μ l
Persulfato de Amonio	100 μ l	90 μ l
TEMED	10 μ l	9 μ l

Gel de Apilamiento 4%

Reactivos	2 geles	1 gel
Agua destilada	3.05 ml	1,525ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.25 ml	625 μ l
Acrilamida	650 μ l	325 μ l
SDS al 10%	50 μ l	25 μ l
Persulfato de Amonio	40 μ l	20 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

PBS

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.2

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 7.4

TBS

Reactivo	Cantidad (g)
Tris-HCl 50nM	6.055
Na Cl 150nM pH 7.5	8.76

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 7.5

Buffer de corrida

Reactivo	Cantidad (g)
Tris base	3
Glicina	14.4
SDS	1

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 8.3

Buffer de transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL

Se lleva a un litro con agua destilada a pH 8.3