



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**“Identificación, aislamiento y caracterización parcial de los
principales antígenos alergénicos del polen de *Quercus alba*”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:**

**LUIS EFRÉN CHÁVEZ JIMÉNEZ
MARÍA GUADALUPE PATIÑO GAITAN**



MÉXICO, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal	MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA
Secretario	CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ
1° Suplente	MARIO ADAN MORENO EUTIMIO
2° Suplente	OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica Estructural, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

ASESOR

Luis Efrén Chávez Jiménez

María Guadalupe Patiño Gaitán

SUSTENTANTE(S)

ABREVIATURAS

EDTA	Etilen diaminotetraacetato disódico
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima
BSA	Albúmina Sérica Bovina
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
CBS	Solución amortiguadora de carbonatos
SDS	Dodecil Sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecil Sulfato de sodio
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ig	Inmunoglobulina ya sea clase A, D, E, G y M
IL	Interleucina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
TFA	Ácido trifluoroacético (por sus siglas en inglés <i>Trifluoroacetic acid</i>)
GINA	Iniciativa Global para el Asma
RAST	Por sus siglas en inglés <i>Radio Allergo Sorbent Test</i>
ITA	Inmunoterapia específica con alérgenos
ITSC	Inmunoterapia específica subcutánea
ITSL	Inmunoterapia específica sublingual
ITIL	Inmunoterapia específica intralinfática
PMN	Células polimorfo nucleares

TNF	Factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés
Da	Daltons
HRP	Peroxidasa del rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
HCl	Ácido clorhídrico

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO.....	15
ANTECEDENTES	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
MATERIALES.....	34
MÉTODOLOGÍA	35
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO.....	74

RESUMEN

La alergia es un problema a nivel mundial que incluye diversos padecimientos como el asma, la rinitis, la conjuntivitis entre otros. Las enfermedades alérgicas tienen un fuerte impacto en la economía de los servicios de salud de los países y en la de los pacientes, así como en la calidad de vida de los mismos. Para su tratamiento existen diversos métodos, siendo la inmunoterapia alérgeno-específica el tratamiento más prometedor y seguro a largo plazo.

El polen del roble blanco (*Quercus alba*) se ha identificado como una fuente de alérgenos importante; debido a esto es medular aislar, identificar y caracterizar a las principales proteínas alérgicas para que así se logre mejorar el diagnóstico y tratamiento mediante la inmunoterapia para esta enfermedad.

En el presente estudio se emplearon ensayos de ELISA, *Western blot* y técnicas cromatográficas para el aislamiento de antígenos alérgicos del polen de *Quercus alba*. A través de espectrometría de masas se identificaron a las proteínas aisladas.

INTRODUCCIÓN

La alergia es un trastorno multifactorial causado por una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediata, también denominada de tipo I;¹ Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I abarcan la mayoría de las reacciones alérgicas comunes como la fiebre del heno, el asma, la dermatitis atópica y las alergias alimentarias. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica ha declarado a la alergia como un “problema público de proporciones pandémicas”. Se estima que el 20% de la población mundial sufre alguna enfermedad mediada por IgE, tal como asma, rinitis, conjuntivitis, eccema atópico, etc., y se considera que más del 50% de los casos de asma en los adultos y alrededor del 80% de los casos de asma infantil, son de origen alérgico, acentuándose en los países más industrializados.²

Las manifestaciones clínicas de las reacciones de tipo I pueden variar en un rango de condiciones que ponen en peligro la vida como la anafilaxis sistémica a condiciones localizadas como la fiebre del heno dependiendo de la vía por la que ingrese al cuerpo el alérgeno, así como la cantidad y las exposiciones previas del paciente. Estas enfermedades tienen un fuerte impacto en la economía de los países y los pacientes; por citar un ejemplo en México se estimó que en 2007 se tuvo un gasto de 35 millones de dólares (USD) para el tratamiento del asma alérgico.³

En la Ciudad de México (CDMX) un estudio reportado en 2009 mostró que la prevalencia de enfermedades alérgicas fue de 42.6% de la población que asiste a las instituciones de salud.⁴

Una de las enfermedades alérgicas de mayor impacto es el asma, definida como una enfermedad crónica no transmisible, multifactorial, influida por la genética, el medio ambiente y algunos factores sociales.⁵

El asma es una enfermedad que afecta a todos los grupos de edad. Su prevalencia está aumentando en muchos países, especialmente entre los niños. En estudios recientes se indica que el asma afecta entre el 5% y 10% de la población general en países desarrollados e industrializados, impactando considerablemente en la calidad de vida de las personas que la padecen y, por lo tanto, en los sistemas económicos y de salud de estos países.⁶

Se tiene registrado que el número mundial de muertes por asma es de alrededor de 180,000 por año, con una amplia variación entre continentes, regiones, edades y grupos económicos.⁷

En el reporte del año 2017 del proyecto Iniciativa Global para el Asma (GINA) se menciona que más de 300 millones de personas padecen asma a nivel global y la prevalencia ha estado aumentando en países de América latina, algo que contrasta con la disminución observada en Estados Unidos de América y Europa.⁸

Aunque se ha visto una disminución en la mortalidad asociada al asma en las últimas décadas debido al uso de fármacos antiinflamatorios, sobre todo en las zonas de altos ingresos, las enfermedades respiratorias crónicas se están convirtiendo en una causa de discapacidad destacada.⁹

El asma en México, como en otros países, es de las principales enfermedades alérgicas, siendo una de las 10 primeras causas de uso de los servicios de salud. La prevalencia de asma varía considerablemente según la zona geográfica, el grupo etario y la metodología utilizada para su diagnóstico. En un estudio en 2006, realizado en la Ciudad de México, se encontró una prevalencia de 6.8% en niños entre 6 y 7 años y de 9.9% en niños entre 13 y 14 años.¹⁰

Un estudio en adultos realizado en el año 2000 mostró una prevalencia de 1.2% en población abierta¹¹; mientras que otro, realizado en pacientes adultos mayores de 65 años, encontró una prevalencia de asma de 3.6%¹².

La prevalencia global encontrada para el asma en la Ciudad de México fue de 14.9%.⁴

El asma es una enfermedad heterogénea, caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias.¹³ Se define por la historia de síntomas respiratorios como sibilancias, falta de aire, opresión

torácica y tos que varían con el tiempo y la intensidad, junto con una limitación reversible del flujo aéreo respiratorio.⁸

En el asma alérgico, al igual que en el resto de las enfermedades alérgicas, se producen anticuerpos de clase IgE específicos a ciertas proteínas ambientales, los cuales se unen a receptores específicos para su región constante (FcεRI), que son expresados por una variedad de células del sistema inmune innato, que incluye las células cebadas, los basófilos y los eosinófilos (sensibilización). La unión posterior del mismo antígeno a estos complejos (re-exposición) activa a éstos granulocitos, induciendo una cascada de señalización que causa que la célula libere el contenido intracelular de los gránulos en el tejido en donde se lleva a cabo esta activación, fenómeno conocido como degranulación. El contenido de los gránulos varía de célula a célula pero típicamente incluye la histamina, heparina, proteasas, citocinas y quimiocinas mediando una respuesta inflamatoria aguda.¹⁴

Existen diversos factores asociados al desarrollo del asma, entre los más relevantes se encuentran los que son intrínsecos al paciente, como lo es la predisposición genética a desarrollar respuestas de hipersensibilidad, la predisposición de generar reacciones por exposición a alérgenos, una mayor susceptibilidad a sufrir afecciones graves en vías respiratorias por agentes virales y una mayor susceptibilidad a las afecciones provocadas por la exposición a contaminantes ocupacionales o ambientales.

Aunque también se ha encontrado que factores socioeconómicos, que junto con los genéticos provocan que la prevalencia de asma sea significativamente diferente entre los diversos grupos sociales y raciales.⁸

Aunque la etiología de las enfermedades alérgicas no es bien conocida, se considera que la atopia es el factor de riesgo más importante para su desarrollo. La atopia se define como la predisposición genética a desarrollar una enfermedad alérgica con producción excesiva de IgE posterior a la exposición a alérgenos específicos, por lo que el riesgo de desarrollar alergia en individuos atópicos es 10 a 20 veces mayor que en sujetos no atópicos.¹⁵

Debido a que la etiología del asma es muy diversa, se ha clasificado en distintos fenotipos siendo uno de los más comunes el asma alérgico, el cual afecta principalmente a niños y adultos⁸; el asma ocupacional el cual está ligado directamente a las actividades laborales de adultos, principalmente por la inhalación de humos, gases, polvo u otras sustancias potencialmente dañinas.¹⁶

Diagnóstico de alergias

Para diagnosticar una enfermedad alérgica es necesario conocer la historia clínica del paciente, sus síntomas, así como comprobar la relación de la clínica con la exposición alérgica. Las pruebas cutáneas,

la prueba de cuantificación de IgE específica sérica o RAST (Radio Allergo Sorbent Test por sus siglas en inglés) y/ o pruebas de exposición específica frente al alérgeno sirven para la identificación de alergias.¹⁷

Tratamientos farmacológicos actuales y de desensibilización

Los tratamientos actuales se enfocan en el alivio sintomático de las alergias y son principalmente medicamentos que sólo ofrecen un alivio a corto plazo,¹⁸ mientras que los corticosteroides que ofrecen un alivio anti-inflamatorio a un plazo más largo, son insostenibles pues una vez que cesa el tratamiento se pueden tener reacciones adversas importantes.¹⁹

Los medicamentos para tratar el asma se pueden categorizar en tres grupos: los medicamentos para aliviar reacciones agudas o de rescate que incluyen a los β_2 -agonistas de corta duración, los medicamentos de control que son usados en tratamientos de largo plazo ya que reducen la inflamación de las vías respiratorias, controlan los síntomas y minimizan el riesgo de exacerbaciones que incluyen a los corticoesteroides inhalados, a los β_2 -agonistas de larga duración, y las terapias para el asma severo que son usadas para tratar el asma que permanece sin ser controlada a pesar de la medicación con medicamentos de control, estos últimos incluyen anticuerpos humanizados contra la IgE (Omalizumab), contra la IL-4 y contra la IL-5 entre otros.¹⁹ Estos medicamentos

presentan diversos efectos adversos dependiendo de la dosis y el tiempo de consumo. Los corticosteroides inhalados pueden provocar síntomas como candidiasis orofaríngea, disfonía, faringitis y hay estudios que muestran alteraciones en la tasa de crecimiento,²⁰ supresión adrenal en el eje hipotalámico-pituitario,²¹ efectos en la densidad mineral de huesos²² y efectos en el metabolismo de la glucosa.²³

Por otro lado, un tratamiento que tiene como objetivo interferir con el curso natural de la respuesta alérgica es la inmunoterapia específica con alérgenos (ITA).¹⁷

A pesar de que la inmunoterapia con alérgenos se ha utilizado durante más de 100 años, en las últimas décadas ha sufrido notables cambios que han mejorado su eficacia y seguridad, introduciéndose aspectos como la estandarización parcial de los extractos, nuevas vías de administración (sublingual, intralinfática, por ejemplo) o el desarrollo de comprimidos siguiendo un proceso completo de registro farmacéutico.¹⁷

Se ha demostrado que la inmunoterapia específica reduce los síntomas clínicos, mejora la calidad de vida y es costo-efectiva. Previene la progresión de la rinitis al asma y el desarrollo de nuevas sensibilizaciones.¹⁷

En general, esta terapia consiste en la progresiva administración de cantidades crecientes de un alérgeno al que se es sensible, modulando

la respuesta inmune IgE-mediada al mismo tiempo, disminuyendo así la intensidad de los síntomas y mejorando la calidad de vida.¹⁷

Existen dos tipos principales de ITA según la vía por la que se administra: subcutánea (ITSC) o sublingual (ITSL)¹⁷ y mas recientemente la intralinfática (ITIL)^{24,25,26}.

Se piensa que estas vías de administración presentan mecanismos de acción comunes, mediante cambios a nivel de la inmunidad celular con potenciación de la expresión de células T reguladoras y reducción de linfocitos Th₂ (característicos de la enfermedad alérgica mediada por la IgE), una disminución de su producción de interleucinas pro-inflamatorias (IL-4, IL-5 e IL-13), así como un bloqueo de la respuesta ante la exposición alérgica, posiblemente a través del aumento de la IgG₄ (Figura 1).²⁷

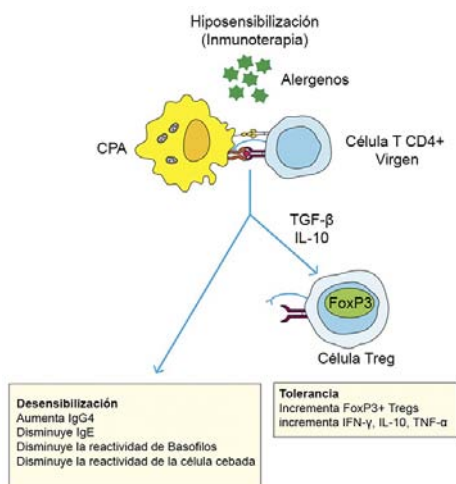


Figura 1. Posibles mecanismos asociados a la inmunoterapia para el tratamiento de la hipersensibilidad de tipo I. La inyección repetida o la ingestión de dosis bajas de antígeno pueden conducir a la tolerancia inmune a través de la inducción de células T reguladoras que regulan la respuesta inmune al alérgeno. Alternativamente o además, puede inducir la generación de anticuerpos IgG (específicamente IgG₄), que compiten con la IgE por la unión al antígeno. Esto inhibe la actividad de los basófilos y los mastocitos, reduciendo los síntomas clínicos.²⁸

MARCO TEÓRICO

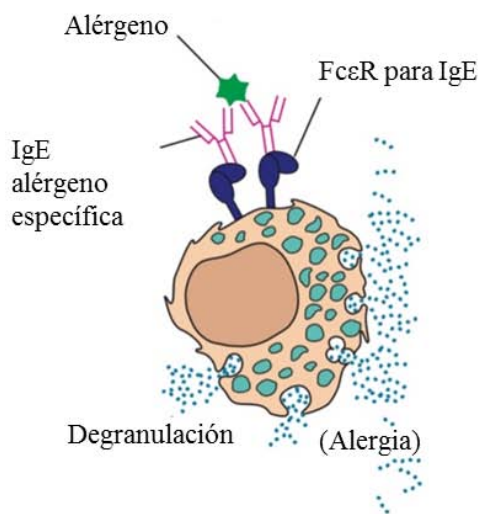
Hipersensibilidad tipo I

Las mismas reacciones inmunológicas que nos protegen de infecciones también pueden infligir una gran cantidad de daño a nuestras células y tejidos, causado por una fuerte respuesta innata y/o adaptativa contra antígenos que representan poca o ninguna amenaza. A estos trastornos se les denomina hipersensibilidades. Existen cuatro tipos de respuestas de hipersensibilidad, que se diferencian entre ellas por los mecanismos inmunológicos que están involucrados en el daño a los tejidos. La de tipo I es mediada por inmunoglobulinas de tipo E (IgE) producidas contra antígenos que no representan riesgo alguno al hospedero. La hipersensibilidad de tipo II está mediada por complejos antígeno-anticuerpos (IgG o IgM) capaces de activar la cascada del complemento (complejo multi-proteico presente en forma inactiva en el suero, capaz de provocar la lisis de bacterias) provocando la llegada de leucocitos polimorfonucleares, que son los responsables del daño a los tejidos. Las reacciones de hipersensibilidad tipo III ocurren cuando se producen reacciones de anticuerpos con antígenos en la sangre, lo que resulta en la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se depositan en las membranas basales glomerular y/o pulmonar. Aquí, la presencia misma de estos complejos, además de los PMN atraídos por la activación del complemento, da como resultado una lesión del tejido y una función

comprometida de éstos órganos. Por último, las respuestas de hipersensibilidad de clase IV son mediadas por respuestas citotóxicas celulares. Recientemente se han propuestos subclasificaciones a estas respuestas de hipersensibilidad, dos para la de clase II y cuatro para la de clase IV.^{29,14}

Para el caso de las respuestas de hipersensibilidad de clase I se han identificado factores de riesgo que predisponen a algunas personas al desarrollo de estas respuestas. Factores genéticos como la atopia³⁰ familiares de primer grado con asma o alguna otra enfermedad alérgica,³¹ así como factores como el sexo, bajo peso de recién nacido, prematuridad, madre joven, retirada temprana de la lactancia materna exclusiva, hacinamiento doméstico, calefacción de carbón o madera, tráfico muy congestionado alrededor del domicilio familiar, contaminación ambiental, peluches, mascotas y humedad en las habitaciones, son algunos factores sociodemográficos y ambientales que se han identificado como importantes.³²

Las hipersensibilidades de Tipo I son mediadas por anticuerpos de clase IgE e incluyen muchas de las alergias comunes a los alérgenos respiratorios, como el polen y los ácaros, alimentos, etc.



**Tipo I
Alergia y Atopia**

Mediador inmunológico	IgE
Mecanismo	El antígeno induce la unión cruzada de IgE unida a mastocitos y basófilos con liberación de mediadores vasoactivos.
Manifestaciones típicas	Incluye anafilaxia sistémica y anafilaxia localizada como fiebre del heno, asma, urticaria, alergias alimentarias y eccema.

Figura 2. Mecanismo de acción inmunológico de las respuestas de hipersensibilidad de tipo I. (Adaptada y traducida de Kuby, Immunology 7th Edition 2013).

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I abarcan la mayoría de las reacciones alérgicas comunes como la fiebre del heno, el asma, la dermatitis atópica y las alergias alimentarias. Las alergias o hipersensibilidades de tipo I se inician por la generación de anticuerpos de clase IgE específicos contra antígenos (alérgenos).

Las personas sanas generan anticuerpos de clase IgE como una respuesta a infecciones parasitarias principalmente; sin embargo, las personas atópicas están predispuestas a generar anticuerpos de clase IgE contra antígenos ambientales, los cuales son en su mayoría proteínas o glicoproteínas con múltiples epítopes por molécula.³³

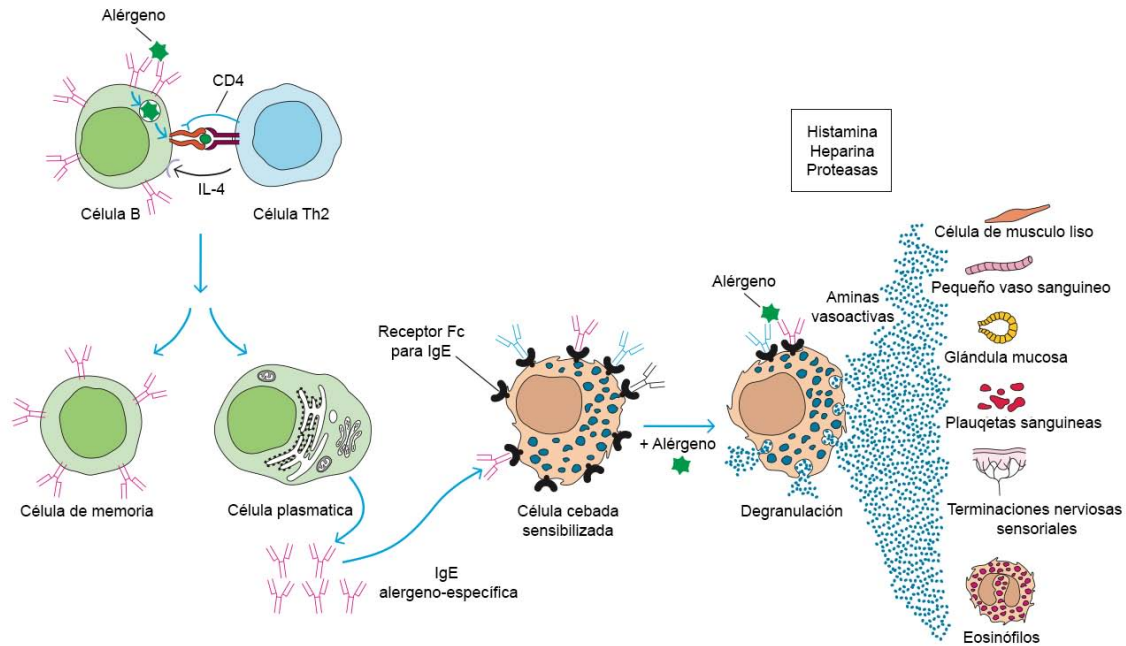


Figura 3. Mecanismos inmunológicos involucrados en la hipersensibilidad tipo I. (Adaptada y traducida de Kuby, Immunology 7th Edition 2013).

Para que se produzca una hipersensibilidad se deben presentar dos fases; la fase de sensibilización y la fase de reexposición o hipersensibilidad. En la primera fase la persona entra en contacto con el alérgeno mediante diferentes vías como la oral o aérea, y se produce una respuesta inmunológica que desencadena en la producción de inmunoglobulinas de clase IgE las cuáles se unen a los mastocitos que almacenan histamina (involucrada en los procesos alérgicos) entre otras sustancias. En esta primera etapa el paciente no presenta síntomas alérgicos.

En la segunda etapa se dice que la persona ya está "sensibilizada", razón por la cual cuando entra en contacto con el alérgeno, éste se une

a las las IgE presentes en los mastocitos, lo que deriva en su activación. Los mastocitos activados liberan gránulos con gran cantidad de sustancias como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas, factores quimiotácticos o citocinas, que son los responsables de la sintomatología alérgica.³⁴

Los mediadores moleculares pueden ser clasificados en primarios o secundarios. Los mediadores primarios son pre-formados y almacenados en gránulos previo a la activación celular, mientras que los mediadores secundarios son sintetizados después de la activación celular o liberados por el rompimiento de la membrana fosfolipídica durante el proceso de degranulación. Los mediadores primarios más significativos son la histamina, proteasas, factor atrayente de eosinófilos, factor atrayente de neutrófilos y la heparina. Los factores secundarios incluyen al factor activante de plaquetas, leucotrienos, prostaglandinas, bradicininas y varias citocinas y quimiocinas.¹⁴

Las células cebadas, los basófilos y los eosinófilos secretan diversas interleucinas que incluyen IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos por sus siglas en inglés) y TNF-alfa (factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés). Las interleucinas IL-4 y IL-13 estimulan la respuesta de T_H2 y así incrementan la producción de IgE por las células B. La IL-5 es

especialmente importante en el reclutamiento y activación de los eosinófilos.¹⁴

Antígenos alergénicos

Los antígenos alergénicos o simplemente alérgenos, suelen ser proteínas, a menudo glicoproteínas (moléculas compuestas por una proteína y uno o varios hidratos de carbono), o lipoproteínas (proteínas que transportan los lípidos o grasas). Excepcionalmente, algunos hidratos de carbono (azúcares) pueden también generar anticuerpos, funcionar como alérgenos y provocar reacciones alérgicas.³⁵

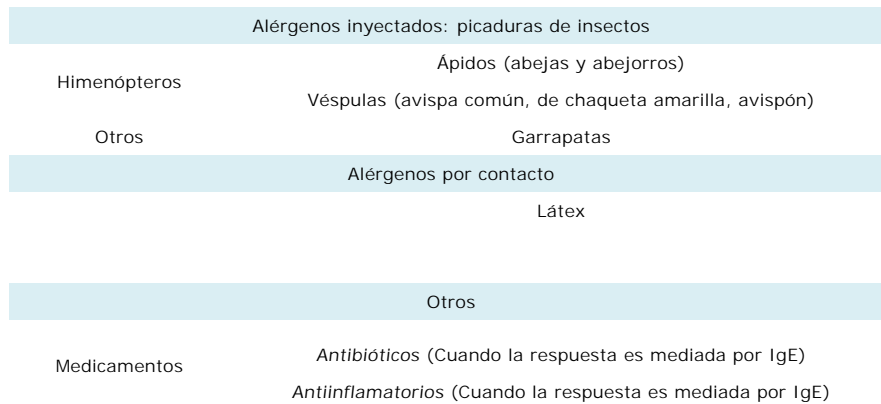
Las propiedades antigénicas, estructurales o funcionales que hacen que una molécula sea alergénica no son muy bien conocidas, y no todas las proteínas tienen la capacidad de causar reacciones alérgicas. En general, las moléculas que han divergido ampliamente en los distintos linajes evolutivos son potentes alérgenos. Las moléculas que contengan muchos epítomos (grupo de aminoácidos que se une a los anticuerpos IgE) tendrán más probabilidades de causar reacciones. El tamaño, la solubilidad, la similitud molecular a otros alérgenos y la estabilidad molecular contribuyen también a determinar sus propiedades alergénicas. El tamaño y la solubilidad son factores importantes, especialmente para los aeroalérgenos que acceden al organismo a través de las vías respiratorias. En general, son proteínas de 10-60 mil Daltons, suelen ser solubles en agua, pues así se facilita su liberación en

la mucosa respiratoria. En el caso de los alérgenos provenientes de alimentos, su capacidad de resistir altas temperaturas y la digestión de los fluidos gástricos, es decir su estabilidad, contribuyen en sus propiedades alergénicas.³⁵

Los alérgenos provienen de fuentes diversas, plantas, animales, alimentos, etc. (Tabla 1), lo que va a condicionar la ruta de exposición más común y la sintomatología clínica que presentará la persona.

Tabla 1. Clasificación de las principales fuentes de alérgenos. (Adaptada de José Manuel Zubeldia y colaboradores 2012).³⁵

Alérgenos inhalados (transportados por el aire)	
Del exterior:	
	Árboles (Olivo, Fresno, Abedul, Olmo, Encino, Roble)
Pólenes	Malezas (Pasto inglés, Amaranato, <i>Chenopodium</i> , Hierba de San Juan)
	Hierbas (gramíneas: ballico, hierba timotea, festuca)
Mohos	<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i>
Del interior:	
	Domésticos
Ácaros	De almacenamiento
	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>
Hongos	<i>Cladosporium</i>
	Gato
Mascotas	Perro
	Cucarachas
Insectos	Polillas
Alérgenos ingeridos: alimentos	
	Frutas
	Legumbres
Alimentos vegetales	Hortalizas
	Frutos secos
	Cereales
	Leche y derivados
	Huevos
Alimentos animales	Pescados
	Mariscos
	Carne de vaca y aves



Entre los principales alérgenos tenemos a los *aeroalérgenos*, que son aquellos que son transportados por el aire y por lo tanto se inhalan; la llegada de los alérgenos a la nariz recae exclusivamente sobre partículas que tienen un amplio rango de moléculas en adición a las proteínas alergénicas. Frecuentemente estas moléculas incluyen moléculas asociadas a patógenos PAMPs (por sus siglas en inglés pathogen-associated molecular patterns) que pueden alterar la respuesta. Las primeras características de exposición parecen ser las que se encuentran en la llegada de partículas como los granos de polen o las heces de ácaros, que contiene a ambas, proteínas y PAMPs, pero en conjunto en baja dosis.³⁶

Los aereoalérgenos son partículas transportadas por el aire que suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas. La mayoría son glicoproteínas solubles, su única característica físico-química, es la de tener un peso molecular comprendido entre 10,000 y 40,000 daltons (Da), aunque no es poco frecuente encontrarlos con pesos de hasta

140,000 Da. Estos aeroalérgenos son inhalados, produciendo cuadros alérgicos. Las fuentes alérgicas más frecuentes son: pólenes, esporas de hongos, polvo, ácaros, epitelio de animales y otras sustancias que invaden directamente la mucosa respiratoria.³⁷

Los pólenes son fuentes de alérgenos del exterior. Son gametofitos masculinos vivos de plantas de tamaño grande (gimnospermas y angiospermas). Son anemófilos (transportados por el viento) y, en épocas determinadas (invierno o primavera-verano), se concentran en el aire. Las plantas que generan pólenes alérgicos se agrupan de la siguiente manera: árboles, hierbas y malezas. El tamaño del polen oscila entre 20-60 μm en los árboles; 30-40 μm en las hierbas, y entre 5-20 μm en las malezas. Pueden causar conjuntivitis, rinitis, asma. Los árboles, los arbustos y las hierbas liberan estas partículas minúsculas al aire para fecundar otras plantas y recorren, en ocasiones, varios kilómetros por el aire.³⁵

Tabla 2. Pólenes encontrados en las décadas de 1940 a 1990 en la Ciudad de México. Adaptado de Terán y colaboradores (2009)³⁷

Cuarenta	Setenta	Ochenta	Noventa
Árboles			
<p><i>Alnus</i> Cupressaceae <i>Fraxinus</i> <i>Ligustrum</i> <i>Mimosa</i> <i>Pinus</i> <i>Populus</i> <i>Quercus</i> <i>Salix</i></p>	<p><i>Alnus</i> Cupressaceae <i>Eucalyptus</i> <i>Fraxinus</i> <i>Pinus</i></p>	<p><i>Abies religiosa</i> <i>Alnus</i> Betulaceae Burseraceae <i>Callistemon</i> <i>Casuarina</i> <i>Corylus</i> Eleagnaceae <i>Eucalyptus</i> <i>Fraxinus</i> <i>Ligustrum</i> <i>Morus</i> <i>Pinus</i> <i>Populus</i> <i>Quercus</i> <i>Salix</i> <i>Schinus molle</i> <i>Taxodium</i></p>	<p><i>Abies religiosa</i> <i>Acer</i> <i>Alnus</i> <i>Arbutus</i> <i>Callistemon</i> <i>Casuarina equisetifolia</i> Cup-ju <i>Eucalyptus</i> <i>Fraxinus uhdei</i> <i>Jacaranda</i> <i>Juglans</i> <i>Ligustrum</i> <i>Liquidambar</i> <i>Pinus</i> <i>Populus</i> <i>Quercus</i> <i>Salix</i> <i>Schinus mole</i></p>
Malezas			
<p><i>Ambrosia</i> Cheno-Am <i>Helianthus</i> <i>Plantagolanceolata</i> <i>Resedaluteola</i> <i>Rumex</i></p>	<p><i>Artemisa</i> Cosmos y <i>Helianthus</i> <i>Rumex</i></p>	<p><i>Ambrosia</i> <i>Chenopodium</i> Cheno-Am Compositae <i>Eupatorium</i> Urticaceae</p>	<p>Cheno-Am Compositae Cruciferae <i>Daucus</i> Leguminoseae Liliaceae <i>Morus</i> <i>Diplandra</i> <i>Rumex</i> Urticaceae</p>
Pastos			
<p><i>Capriola dactylan</i> <i>Zea mays</i></p>	<p><i>Capriola</i> <i>Lolium</i></p>	<p>Gramineae <i>Typha</i> <i>Zea mays</i></p>	<p>Cyperaceae Gramineae <i>Typha</i></p>

ANTECEDENTES

Quercus alba

1. Características

Quercus alba o roble blanco es un árbol perteneciente a la familia Fagaceae, cuyo polen se ha identificado como una fuente de alérgenos clínicamente relevante. Los robles, que forman el género *Quercus*, son abundantes árboles resistentes de bosques caducifolios en América del Norte, Europa y Asia. Hay aproximadamente de 500 a 600 especies en todo el mundo, 250 en el hemisferio occidental, más de 150 en México y 70 en los Estados Unidos y Canadá.³⁸

Los robles generalmente se clasifican en 2 tipos, Blanco o Rojo. Entre las especies, el roble blanco (*Quercus alba*) es el más común. Está muy extendido en el noreste de América. Las especies relacionadas se distribuyen ampliamente en el hemisferio norte y se encuentran en las montañas de México.



Figura 4. Imagen de un ejemplar de *Quercus alba* mostrando en la misma el tipo de follaje que tienen estos árboles. (Foto obtenida y editada de <http://www.carolinanature.com/trees/qual.html>)

El roble blanco es un árbol caducifolio de tamaño mediano a grande, que alcanza comúnmente de 18 a 24 m de altura. Individualmente pueden crecer a más de 30 m de altura y superar los 1.5 m de diámetro. El roble blanco es de crecimiento lento y puede vivir hasta 600 años. Las flores son de 2 tipos: el macho, en amentos caídos de 2.5 a 8 cm de largo; y la hembra, que aparece más tarde, ya sea solo o en pares en tallos cortos, y produciendo como fruto una bellota de 1.5 a 2.5 cm de largo. Las bellotas generalmente se llevan en pares.³⁹

Los robles son polinizados por el viento. La floración generalmente ocurre en primavera, cuando las nuevas hojas se están alargando, pero varía según la latitud, las condiciones climáticas y la composición genética de los árboles individuales. En el hemisferio norte, la floración puede ocurrir en cualquier momento desde finales de marzo hasta mayo o junio. Tres distintas olas de floración (temprano, medio y tardío) han sido reportadas. En general, el polen se elimina en 3 días, pero los vientos ligeros pueden acelerar el desprendimiento y el clima lluvioso prolongado puede retrasarlo. Los robles arrojan copiosas cantidades de polen, más que cualquier otra planta, pero generalmente viaja a menos de 200 m. El polen de roble es de relevancia clínica en gran parte de Estados Unidos y México.^{40,41,42}

2. Alergenicidad del polen de *Quercus alba*

Los estudios realizados a la fecha sugieren que el polen de roble blanco contiene múltiples proteínas que son potencialmente alergénicas.⁴³

Aparentemente, no todas las especies de Robles son igualmente alergénicas; por ejemplo. El polen de *Quercus ilex*, aunque es producido en cantidades considerables, no se encontró que sea causante de alergias.⁴⁴

Los siguientes alérgenos provenientes del polen de *Quercus alba* se han caracterizado:

- Que a 1, es una proteína de 17 kDa, perteneciente al grupo 1 de alérgenos, que son un grupo de proteínas homólogas al alérgeno de *Betula verrucosa* Bet v1, cuya función biológica es de protección contra patógenos.^{45,46,47,48,49}
- Que a 4, es una proteína pequeña de unos 9 kDa perteneciente a la familia de las polcalcinas, proteínas de unión a calcio que participa en diversos procesos biológicos modulando las funciones del Ca⁺ tanto a nivel intracelular como extracelular.^{45,50}
- Que a 2, es una proteína pequeña de 14 kDa perteneciente a la familia de las profilinas, la cual se ha encontrado presente en todas las células eucariontes en donde se ha buscado a la fecha. Se sabe que es una de las proteínas más importantes para el rearreglo del citoesqueleto, regulando la polimerización-

despolimerización de actina, aunque se sabe que también podría estar involucrada en algunos procesos de señalización intracelular. Su amplia distribución filogenética provoca que sea una de las proteínas alergénicas involucradas en los fenómenos de reactividad cruzada entre diversas fuentes alergénicas, principalmente pólenes y frutas.^{45,47}

El alérgeno Que a 1 se purificó a partir de un extracto de polen de roble y se evaluó en 16 sujetos sensibilizados al polen de roble. Que a 1 mostró una identidad de secuencia de 58-74% con otros alérgenos de clase 10 relacionados con la patogénesis.⁴⁹

3. Posible reactividad cruzada

Algunos de los alérgenos del polen en las diversas especies de roble provocan reacciones de forma cruzada entre sí, mientras que otros son únicos para su propia especie.

En Sapporo, Japón, muchos pacientes alérgicos al polen de abedul se quejaron de los síntomas típicos después de la temporada de polen de roble. Esto se ha atribuido a las personas alérgicas al polen de abedul afectadas por la polinosis de roble debido a la reactividad cruzada entre el polen de abedul y roble.⁵¹

Los pólenes del abedul, aliso, cuerno, avellana y roble contienen alérgenos que comparten epítomos de unión a IgE con Bet v 1 y Bet v 2.

Una combinación de Bet v 1 y Bet v 2 representó el 82% de la unión de la IgE específica de polen de árbol en un estudio europeo. La mayoría de los anticuerpos IgE específicos del polen de los árboles se dirigieron contra rBet v 1;⁴⁷ De forma similar, se ha encontrado que la reactividad cruzada con IgE de pacientes entre el abedul y el polen de árboles relacionados como el roble, es de alrededor del 75%, lo que demuestra la importancia clínica de estos árboles.⁴⁸ Por lo tanto, en las regiones donde el árbol de roble es una fuente importante de aeroalérgenos dominante o significativo, las pruebas de sensibilización a miembros de Abedul, Aliso, Haya u otros miembros de Fagales pueden ser positivas como resultado de mecanismos de reactividad cruzada.⁵²

4. Relevancia clínica del polen de *Quercus alba*

El polen de roble es uno de los causantes importantes de rinitis alérgica y asma.^{53,54,40,41}

El polen de roble afecta a personas sensibilizadas alrededor de todo el mundo. En Madrid, España, el nivel más alto de polen en el aire desde 1979 hasta 1993 fue de las especies de *Quercus* (17%)⁴¹. El polen de *Quercus* también ha demostrado ser significativo en Ciudad de México⁵⁵, Zúrich⁵⁶, Japón⁵⁷, Corea⁵⁸, Tampa, Florida⁵⁹, la Península Ibérica⁶⁰ y Ciudad del Cabo, Sudáfrica⁶¹.

En un estudio realizado en 10 grandes ciudades canadienses, se determinó el impacto de las concentraciones diarias de diferentes pólenes de árbol y la asociación entre las hospitalizaciones diarias por asma, encontrándose que con un aumento intercuartílico en la concentración diaria del polen de *Quercus* y *Castanea*, el porcentaje de hospitalizaciones diarias por asma aumenta en un 2.32%.⁶²

La exposición al polvo de la madera del roble también puede conducir al desarrollo de dolor de garganta e hiperreactividad bronquial. Lo que puede llevar al desarrollo de asma ocupacional y rinitis en trabajadores de la madera de roble.⁶³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al ser un problema, frecuente y cada vez más grave, que afecta a personas de todas las edades y condición social, el asma y los procesos alérgicos cobran una mayor importancia en la sociedad debido a su impacto económico, en los sistemas de salud y social. Con la inmunoterapia alérgeno específica se pretende ofrecer una alternativa duradera, carente de la mayoría de efectos secundarios que ofrecen los tratamientos farmacológicos actuales y que mejore la calidad de vida de los pacientes. En esta tesis se busca identificar a los principales alérgenos alergénicos de *Quercus alba* como un paso para alcanzar dicho fin.

HIPÓTESIS

Los antígenos alergénicos reconocidos por las IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Quercus alba* pueden ser aislados por métodos cromatográficos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar, aislar y caracterizar parcialmente los principales antígenos alergénicos del polen de *Quercus alba* que sean reconocidos por las IgE del suero de pacientes de la Ciudad de México que son alérgicos a este polen.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la presencia de IgE específicas contra antígenos alergénicos del polen de *Quercus alba* en un banco de sueros de pacientes alérgicos.
2. Determinar cuáles son los antígenos alergénicos que son reconocidos por las IgE de la mayoría de los pacientes alérgicos al polen de *Quercus alba*.
3. Aislar y caracterizar parcialmente a los principales alérgenos presentes en el polen de *Quercus alba*.

MATERIALES

Como fuente de alérgenos se empleó un extracto comercial estandarizado del polen de *Quercus alba* (White Oak) ALK-Abello© con una concentración de proteínas totales de 6.23 mg/mL.

Se analizaron 220 sueros de un banco proveniente de pacientes alérgicos a distintos pólenes, de diferentes instituciones de salud de la Ciudad de México.

Para la cromatografía de exclusión molecular se empleó una columna Superdex 75 (10/3006L) con límites de exclusión de 10-75 KDa y volumen de cama de 24 mL.

Para la cromatografía de intercambio iónico se utilizó la columna Mono-Q 5/50 GL 0.9 mL (intercambio aniónico).

Para la cromatografía de fase reversa acoplada a HPLC se utilizó una columna ZORBAX SB-C18 Agilent 5µm 2.1 x 50 mm.

MÉTODOLOGÍA

1. Caracterización de alergenicidad

a. Generación del banco de suero de pacientes alérgicos.

Se realizaron pruebas cutáneas en distintos hospitales y centros médicos de la Ciudad de México utilizando un panel de entre 17 y 46 extractos alérgicos, entre ellos el extracto comercial del polen de *Quercus alba* (White Oak).

Los criterios que se tomaron en cuenta para incluir a los pacientes en el estudio fueron:

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

Los criterios de exclusión fueron:

- Embarazo confirmado.
- Uso de terapia esteroidea tópica o sistémica, antihistamínicos tópicos o sistémicos dos semanas previas al ingreso al estudio.
- Antecedente de inmunoterapia en el último año.

- Presencia de urticaria o dermografismo.
- Residencia menor a un año en la ciudad de México.
- Presencia de síntomas de crisis de asma en cualquiera de sus estadios.
- Tratamiento con astemizol los dos últimos meses previos al estudio.
- Que no acepten firmar el consentimiento informado.
- Antecedentes personales de inmunodeficiencias severas.
- Lesiones dermatológicas patológicas en lugar de puntura.
- Presencias de tatuajes o cicatrices en lugar de puntura.
- Procesos infecciosos dérmicos en lugar de puntura.

Los criterios de eliminación fueron:

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

El procedimiento por el cual se realizó la prueba cutánea fue mediante "*Skin Prick Test*". Previamente a realizar la prueba, se le explicó al paciente, o el tutor en caso de que fuera menor de edad, en que consiste el estudio y se le solicitó firmar la carta de consentimiento informado, se realizó una asepsia en el lugar de punción (región anterior

del antebrazo, posición central, iniciando a 3 cm de la articulación humero radial e igual distancia de la articulación radio carpiana), con una torunda de algodón con alcohol al 70% en barridos verticales sin pasar más de una vez cada transepto definido. Posteriormente se realizaron marcas lineales de forma horizontal de 3 cm de longitud y de separación entre cada línea, se aplicó una alícuota de cada alérgeno, después se procedió a puncionar la piel sobre la alícuota mediante la lanceta para prueba de Prick y se realizó un ligero rascado siguiendo las recomendaciones dadas por el comité de pruebas cutáneas de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI).⁶⁴

Una prueba cutánea se consideró positiva cuando al comparar los resultados con el control negativo, la pápula tuvo un diámetro ≥ 3 mm de dicho control.

b. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Este método involucra la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595nm y se monitorea midiendo el incremento en la absorción a 595nm. El ensayo es muy reproducible y rápido.⁶⁵

El procedimiento consistió en añadir a 1 tubo Eppendorf 33 μ L del extracto diluído 1:10, por duplicado y añadir 1mL del reactivo de Bradford. Se realizó el mismo procedimiento con los blancos añadiendo

sólo PBS y el reactivo de Bradford. Se incubó durante 15 minutos para permitir la reacción y se procedió a leer la absorbancia a 592 nm. Se construyó una curva de calibración con BSA con concentraciones de proteína total de 150 a 750 µg/mL y los datos de absorción a 595 nm y concentración se utilizaron para obtener una ecuación de una recta que describiera los mismos. Para determinar la concentración de proteínas totales del extracto alérgico, los valores de absorción a 595 nm fueron utilizados en la ecuación obtenida en el ajuste de datos de la curva patrón.

c. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)

Se adsorbieron por duplicado 5 µg de proteínas totales del extracto total del polen de polen de *Quercus alba* en una placa para ELISA (Corning Costar® de 96 pozos) diluidos en 50 µL amortiguador de carbonatos (CBS) pH 9.6. La placa se incubó durante toda la noche (ON) a 4 °C. Los pozos se lavaron tres veces con un amortiguador de lavado (fosfatos salino (PBS) pH 7.4 con 0.05% de Tween 20). Los pozos se bloquearon por 2 horas a temperatura ambiente (TA), con una suspensión de leche descremada (Svelty®) al 2% en PBS adicionado con 0.05% Tween 20. Posteriormente, los pozos se incubaron por duplicado con 50 µL de sueros de pacientes alérgicos diluidos 1:10 en solución de bloqueo, se incubó la placa por 1 hora a TA y ON a 4 °C.

El exceso de anticuerpos se eliminó lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y los pozos se incubaron 2 horas a TA con 50 μ L de un anticuerpo monoclonal de ratón contra IgE humana diluido 1:5000 en solución de bloqueo (Sigma-Aldrich[®]). Después de lavar los pozos 5 veces con PBS-Tween 0.05%, los pozos se incubaron durante 2 horas a TA con 50 μ L de un anticuerpo policlonal de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) contra IgG de ratón, diluido 1:1500 en solución de bloqueo (BioLegend[®]). Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y finalmente para evidenciar la presencia de complejos (Figura 5), se agregaron 50 μ L de 3,3,5,5 tetrametilbenzidina (TMB; Sigma-Aldrich[®]) permitiendo el desarrollo de la reacción en ausencia de luz durante 25 minutos a TA. La reacción se paró con 50 μ L de una solución 1N de HCl. La absorbancia de cada pozo de la placa se registraron en un lector de placas ELISA a 450 nm (Shenzen Emperor Electronic Technology Co., LTD).

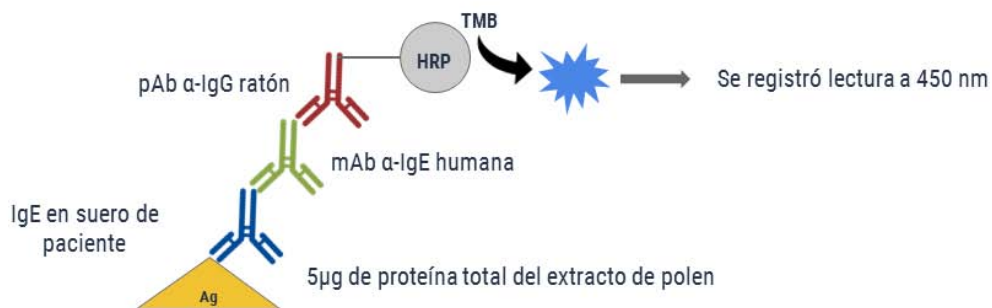


Figura 5. Esquema general del ensayo de ELISA para detectar la presencia de inmunoglobulinas de clase IgE en el suero de los pacientes alérgicos que reconocieran antígenos alérgénicos del extracto total del polen de *Quercus alba* adsorbidos a la placa (Ag).

2. Caracterización molecular.

a. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto total del polen de *Quercus alba* se obtuvo en geles de poliacrilamida de gradiente (4-20%) o al 16% (Ver anexo).

Las muestras (30 μ g por carril) se desnaturalizaron en un buffer de carga (ver anexo) y se colocaron a ebullición por 3 minutos. A los geles de gradiente se les aplicó un voltaje constante de 150 V, mientras que a los geles al 16% se les aplicó un voltaje de 80 V hasta que el frente llegara al gel separador y posteriormente 120 V. Como referencia de masa molecular se utilizaron marcadores de 10 a 170 KDa (Bio-Rad®). Al término de la corrida los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron con agua hasta que ya no se observara colorante en las zonas del gel que no tuvieran proteínas. Se adquirió una imagen de los geles después y se analizaron con el programa *ImageJ* para determinar la masa molecular de las fracciones observadas.

b. Inmunodetección por *Western blot* de proteínas del polen de *Quercus alba* reconocidas por IgE de pacientes alérgicos.

Para identificar las fracciones proteicas que se reconocen por las IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de *Quercus alba* se estandarizó un ensayo de inmunodetección por *Western blot*. Se fraccionaron las proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin teñir con el azul de Coomassie. Las proteínas separadas se electro-transferieron de a una membrana de PVDF, previamente hidratada con metanol y equilibrada en buffer de transferencia (Tris-glicina pH 8.5 con 20% de metanol) por el método de transferencia semiseca a 300 mA por 1.5 horas. Se cortaron los carriles conteniendo proteína y para bloquear las zonas de la membrana que no contenían proteínas, la membrana se dejó secar completamente a TA. Posteriormente, se incubó de forma individual cada tira con suero de pacientes (los que resultaron positivos a IgE específicas para alérgenos del polen de *Quercus alba* en los ensayos de ELISA) diluidos 1:10 en solución de bloqueo, durante 1 hora a TA y ON a 4 °C. Las tiras se lavaron dos veces con PBS-Tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpos IgE de los pacientes que no se unieron a las proteínas transferidas a la membrana. Las tiras se incubaron 2 horas a TA con un anticuerpo monoclonal de ratón contra IgE humana (1:4000), después de lavar los pozos 5 veces con PBS-Tween 0.05%, se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a HRP (1:1500) durante 2 horas a TA.

Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando 5 veces con PBS-Tween 0.05% y finalmente los complejos (Figura 6) se revelaron por quimioluminiscencia (GE[®]) y placas radiográficas (Kodak[®]) y/o con TMB solución para blot (Biosciences[®]).

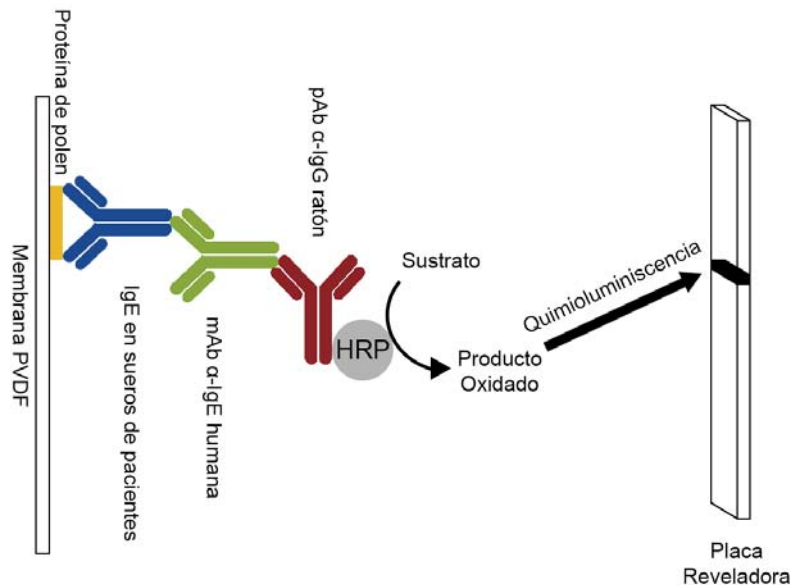


Figura 6. Representación esquemática del ensayo de *Western blot* para detectar la presencia de proteínas que son reconocidas por inmunoglobulinas de clase IgE de los pacientes alérgicos.

3. Fraccionamiento del extracto total por cromatografía.

a. Cromatografía de exclusión molecular.

Para realizar el fraccionamiento del extracto total del polen de *Quercus alba* por cromatografía de exclusión molecular, el extracto previamente dializado contra PBS (usando una membrana de diálisis de corte de 3 KDa), se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro y se aplicó a una columna Superdex 75 (GE[®]),

equilibrada con PBS. La elución se realizó con PBS a un flujo de 0.9 mL/min haciendo pasar 1.5 volúmenes de columna (VC) y colectando fracciones de 1 mL c/u. Se siguió la elución de las proteínas usando un detector de UV a una longitud de onda de 280 nm. Las fracciones obtenidas se analizaron a través de un ensayo de ELISA para determinar en cuáles de ellas se encontraban los alérgenos que son reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos. Este ensayo se realizó adsorbiendo a la placa las proteínas contenidas en 10 μ L de cada fracción y en las mismas condiciones descritas anteriormente.

b. Cromatografía de intercambio iónico.

Las fracciones conteniendo alérgenos reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos fueron dializadas contra un amortiguador de Tris-HCl 0.02 M pH 8.0 y aplicadas a una columna con intercambiador aniónico MonoQ 5/50GL (GE[®]). La columna se equilibró con 20 VC del amortiguador de Tris-HCl 0.02 M pH 8.0. Para unir a las proteínas se aplicaron 2 mL de la fracción a un flujo de 0.9 mL/min y la elución se realizó al mismo flujo realizando un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl disuelto en el mismo buffer de unión. Se colectaron fracciones de 0.5 mL y las proteínas fueron detectadas a una longitud de onda de 280 nm en un detector UV.

c. Cromatografía de fase reversa

Debido a que en la cromatografía de intercambio iónico no logramos un aislamiento eficiente de las proteínas presentes en las diversas fracciones, se optó por purificar a estas mediante una cromatografía de fase reversa. Las fracciones con reconocimiento por IgE, obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular, se aplicaron a una columna de fase reversa C18 acoplada a un HPLC. La unión de las proteínas a la columna se realizó con TFA al 0.12% y la elución se realizó a través de un gradiente lineal de 0 a 100% de acetonitrilo con TFA 0.1%, ambos a un flujo de 0.7 mL/min. Las fracciones con las proteínas eluidas se colectaron manualmente en microtubos de plástico. El acetonitrilo fue retirado por liofilización, las fracciones se resuspendieron en PBS y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

d. Espectrometría de masas

Después de la separación cromatográfica de las proteínas por fase reversa, las muestras se analizaron en un ensayo de ELISA para determinar que fracciones eran reconocidas por IgE de pacientes alérgicos. Las fracciones positivas fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Ciudad de México en donde se obtuvieron los perfiles de fragmentación de los péptidos trípticos para cada fracción (los generados por la proteólisis con tripsina de cerdo), los cuales fueron analizados con el Software

Protein Pilot™ utilizando la base de datos de UniProt (www.uniprot.org) general al 66% (% similitud de los perfiles obtenidos comparados con los de todas las proteínas de la base) y la base de proteínas de polen al 66%. Adicionalmente se compararon los perfiles obtenidos con los reportados para las proteínas de *Quercus alba*, incluyendo proteínas de todos los tejidos de la planta reportadas a la fecha.

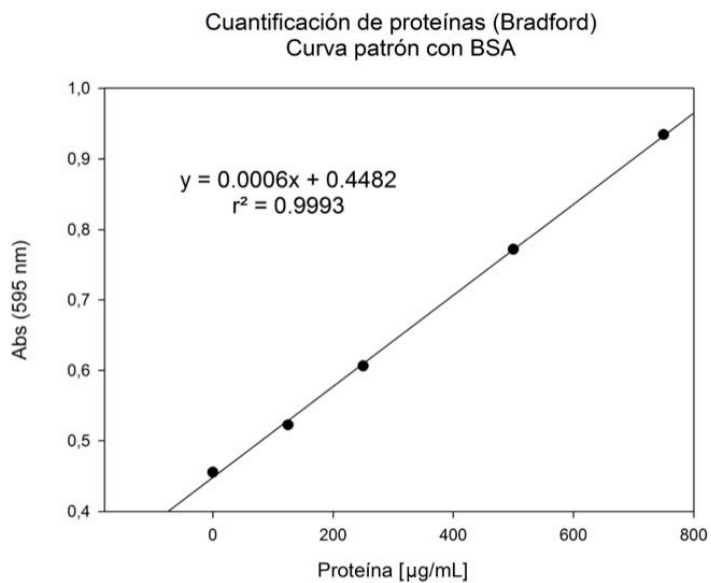
RESULTADOS

- La concentración de proteínas totales difiere entre lotes del extracto alergénico del polen de *Quercus alba*.

La curva estándar elaborada con BSA muestra una correlación alta (0.9993) en la linealidad de los datos de absorbancia a 595 nm obtenidos con relación a la concentración de la proteína (Gráfica 1 y Tabla 3).

Tabla 3. Datos para realizar curva estándar del BSA (albumina sérica bovina).

[STD] ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 1 592 nm	Absorbancia 2 592 nm	Absorbancia promedio 592 nm
0	0.4487	0.4622	0.4555
125	0.5213	0.5240	0.5226
250	0.6059	0.6068	0.6064
500	0.7695	0.7738	0.7716
750	0.9299	0.9388	0.9344



Gráfica 1. Curva estándar de BSA. Se muestran los valores de la ecuación de una recta que describen a los datos experimentales y el coeficiente de correlación de la linealidad de los mismos.

A partir de la ecuación de una recta que describe a los valores obtenidos experimentalmente (Gráfica 1), se estimaron las concentraciones de proteína total contenida en el extracto alergénico del polen de *Quercus alba* de dos lotes diferentes, ambos utilizados en diferentes etapas del proyecto (Tabla 4).

Tabla 4. Datos obtenidos de las diferentes muestras analizadas por el método de Bradford para saber la concentración del extracto comercial ALK de Polen de *Quercus alba*.

Muestra	Absorbancias (592nm)	Absorbancia Promedio	Concentración (µg/mL)	Concentración*FD (µg/mL)
<i>Quercus alba</i> (lote 1)	1) 0.78671 2) 0.76570	0.776205	486.68	4866.8
<i>Quercus alba</i> (lote 2)	1) 0.81583 2) 0.82898	0.822405	623.67	6236.7

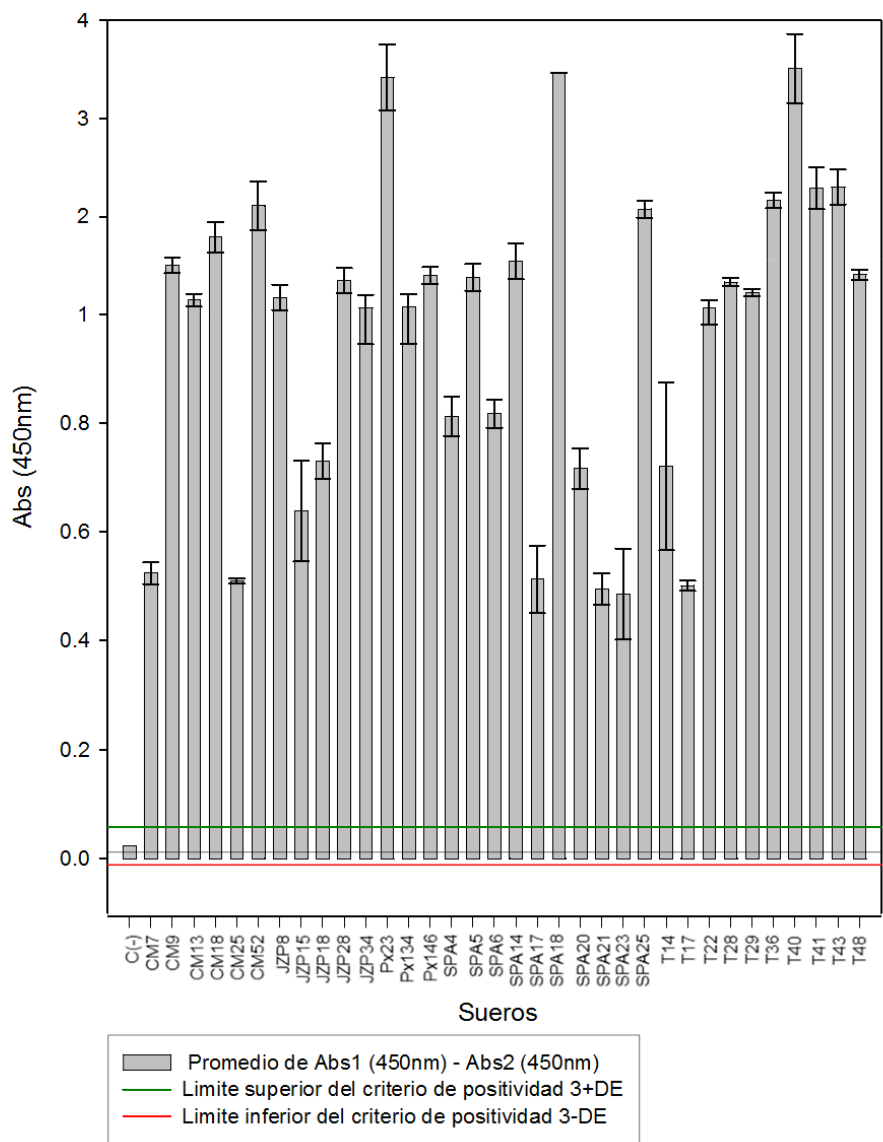
*El factor de dilución (FD) fue de 10.

La concentración del extracto comercial del polen de *Quercus alba*:

- Lote 1: 4.8668 mg/mL
- Lote 2: 6.2367 mg/mL.
- El suero de pacientes alérgicos al polen de *Quercus alba* presenta títulos relativos de IgE altos.

Se analizaron un total 220 sueros a través de ensayos de ELISA para determinar la prevalencia de pacientes alérgicos a diversos pólenes con IgE sérica específicas contra antígenos alergénicos del polen de *Quercus alba*. Los resultados nos indican que el 15.45% de ellos presentaron IgE

específicas para antígenos del polen de *Quercus alba*. (Figura 7). Se consideró como criterio de positividad el propuesto por la Unión Internacional de Inmunología Clínica y Alergia (valores de absorción en ELISA mayores al promedio observado en sueros de personas no alérgicas, más tres desviaciones estándar) el número de pacientes positivos empleando este criterio fue de 34.



Gráfica 2. Título relativo de IgE específicas para alérgenos del polen de *Quercus alba* en pacientes alérgicos. Se muestran solo los resultados positivos.

La línea verde indica el límite del criterio de positividad para el ensayo, la cual está definido por un promedio de la absorción de los controles negativos más tres desviaciones estándar. Las claves de cada suero corresponden a la rotulación que se usó para identificar los pacientes en cada centro de salud.

Los ensayos de ELISA también nos mostraron que alrededor del 60% de los pacientes tuvieron títulos relativos de IgE altos (absorbancias a 450 nm mayores a 1), esto es, 10 o más veces mayores niveles de IgE específicas contra alérgenos del polen de *Quercus alba*, que lo observado en personas no alérgicas.

- El extracto alérgico del polen de *Quercus alba* contiene diversas proteínas alérgicas.

El perfil electroforético de las proteínas presentes en el extracto alérgico del polen de *Quercus alba* mostró la presencia de proteínas detectables en un rango de 17 a 120 KDa aproximadamente (Figura 7). La abundancia relativa de las fracciones fueron bajas en general, sin embargo se lograron observar que bandas alrededor de 17, 20, 90, 110 y 120 kDa fueron las más abundantes en este extracto.

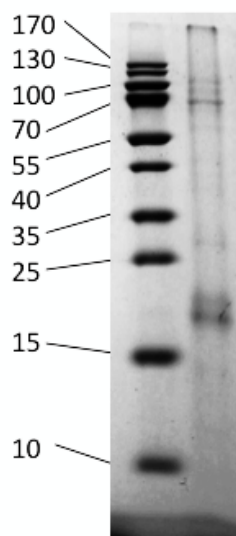


Figura 7. Perfil electroforético del extracto total de polen de *Quercus alba* teñido con azul de Coomassie.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron transferidas a membranas de PVDF para determinar la masa molecular de las proteínas alergénicas reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgico al polen de *Quercus alba* (Figuras 8-1, 8-2).

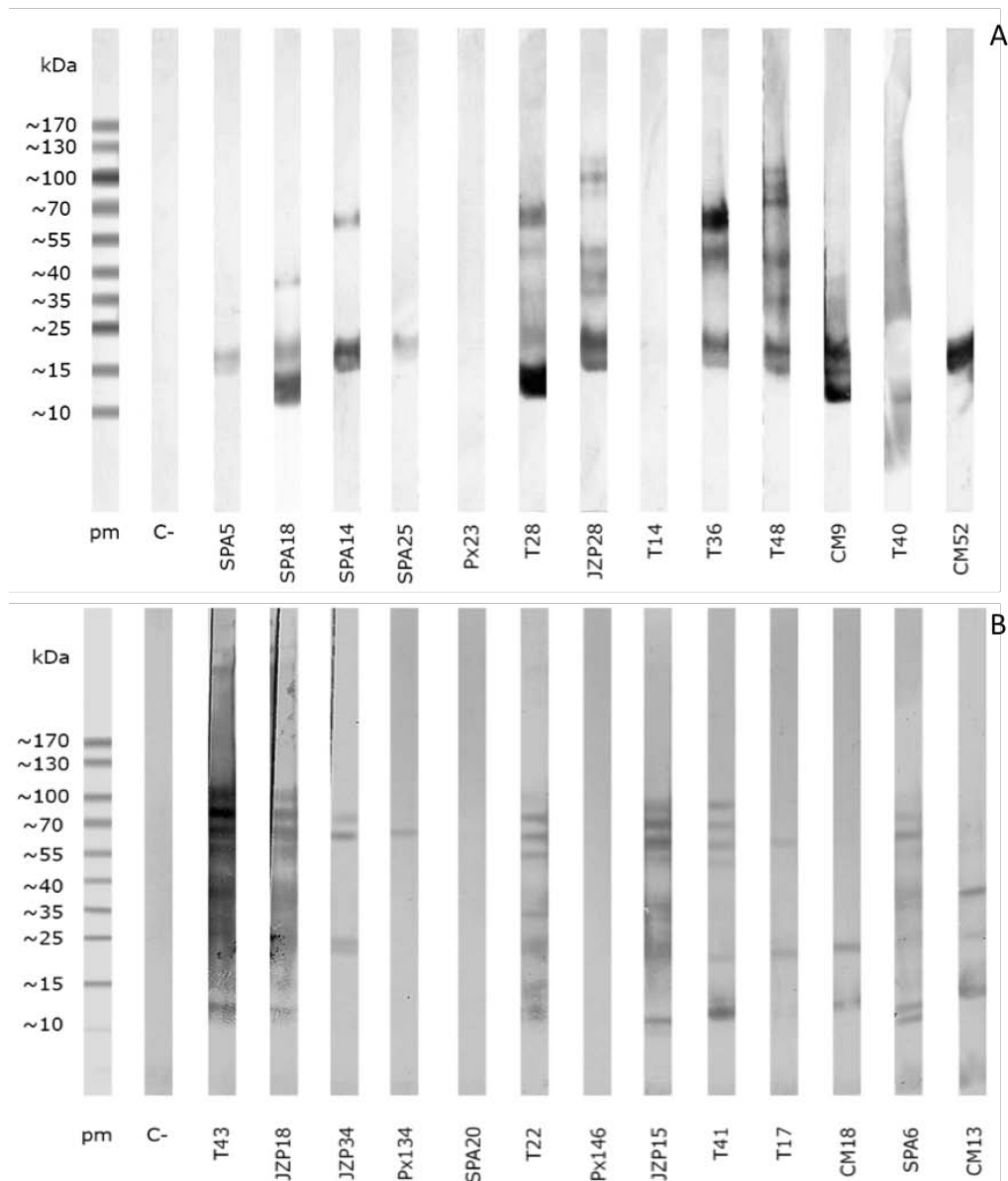
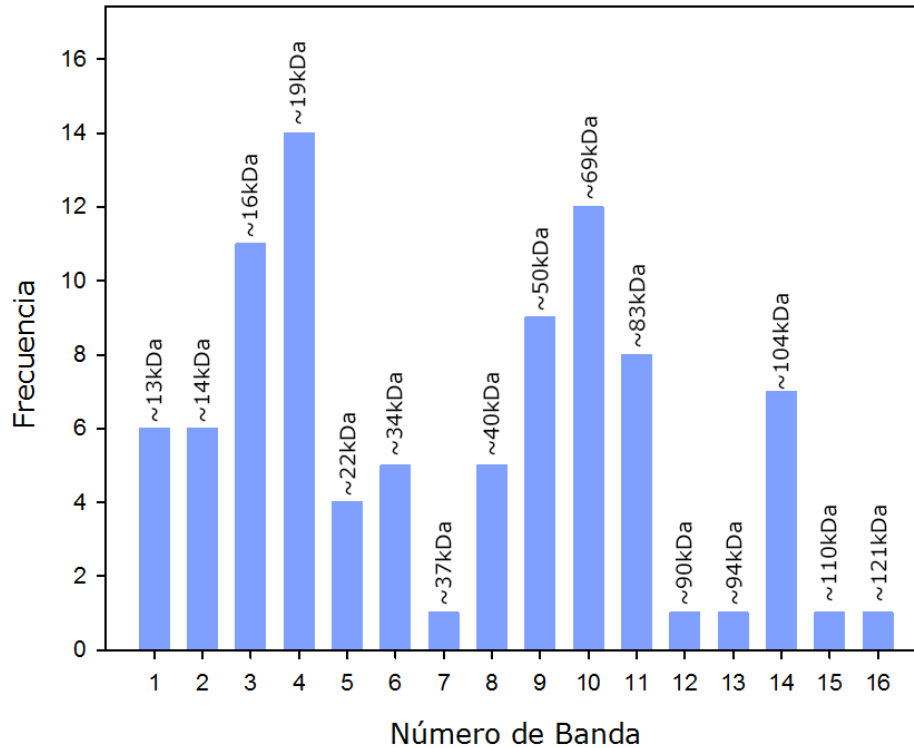


Figura 8. Inmunodetección por IgE mediante *Western blot* del extracto total de polen de *Quercus alba*. El perfil de reconocimiento de cada paciente se muestra en los paneles A y B de la figura. PM: marcadores de masa molecular; C-: control negativo (mezcla de sueros de voluntarios no alérgicos).

Se identificaron 16 fracciones diferentes que fueron reconocidas por las IgE de los sueros ensayados (Tabla 5 y Gráfica 3) con masas moleculares de entre 13 a 121 kDa aproximadamente. Del total de los 26 sueros de pacientes que fueron analizados, 22 reconocieron al menos una fracción proteica del extracto alergénico.

Tabla 5. Frecuencia de reconocimiento por IgE de las diferentes fracciones observadas en los ensayos *Western blot* del polen de *Quercus alba*.

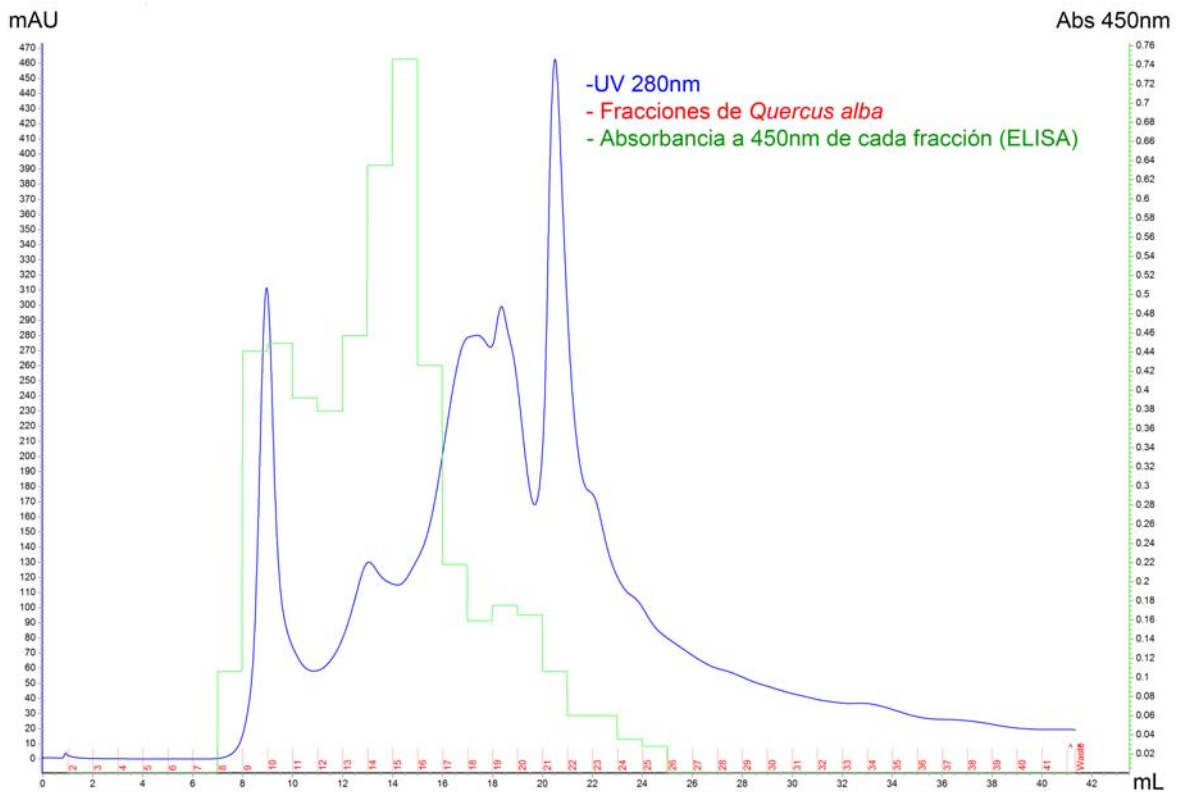
No. Banda	PM (kDa)	No. De Sueros (N=26)
1	~13	6
2	~14	6
3	~16	11
4	~19	14
5	~22	4
6	~34	5
7	~37	1
8	~40	5
9	~50	9
10	~69	12
11	~83	8
12	~90	1
13	~94	1
14	~104	7
15	~110	1
16	~121	1



Gráfica 3. Representación gráfica de la frecuencia de reconocimiento de las fracciones reconocidas por las IgE de pacientes alérgicos al polen de *Quercus alba*.

- Las fracciones cromatográficas de mayor masa molecular aparente concentran a los alérgenos reconocidos por las IgE.

El fraccionamiento cromatográfico, en una columna de exclusión molecular Superdex-75, de las proteínas contenidas en el extracto alérgico del polen de *Quercus alba* rindieron cinco “picos” principales en 20 fracciones, de las cuales las primeras diez contienen a la mayoría de los alérgenos que son reconocidos por las IgE del suero de pacientes alérgicos a este polen (Gráfica 4).



Gráfica 4. Perfil cromatográfico por exclusión molecular del extracto de *Quercus alba*. Las barras en verde muestran la ABS_{450} de cada fracción analizada por ensayos de ELISA para el reconocimiento por IgE provenientes de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos.

El análisis electroforético de las fracciones obtenidas nos muestran que las que fueron reconocidas por IgE contienen una mezcla de proteínas de baja y alta masa molecular (Figura 9).

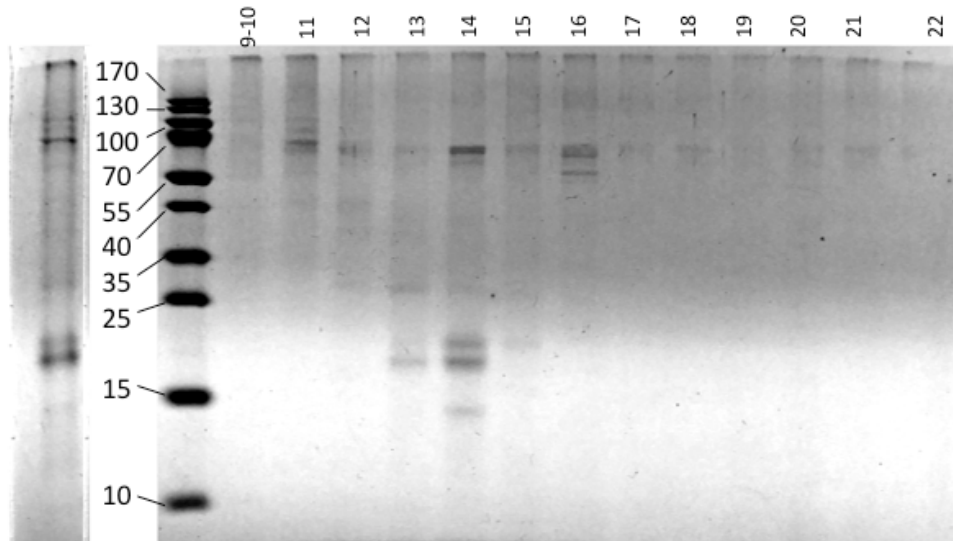


Figura 9. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular. Los números en la parte inferior de la imagen identifican a las fracciones que se colocaron en cada carril. Los marcadores de masa molecular se indican del lado izquierdo de la imagen (bandas intensas) y el perfil electroforético del extracto total se muestra en el extremo izquierdo de la imagen.

Observamos que estas fracciones, analizadas mediante *Western blot*, contienen desde 7 bandas antigénicas (fracción 12) hasta solo una (fracciones 15, 17 y 18), todas en el mismo rango de masas moleculares observado para el extracto total del polen (Figura 10).

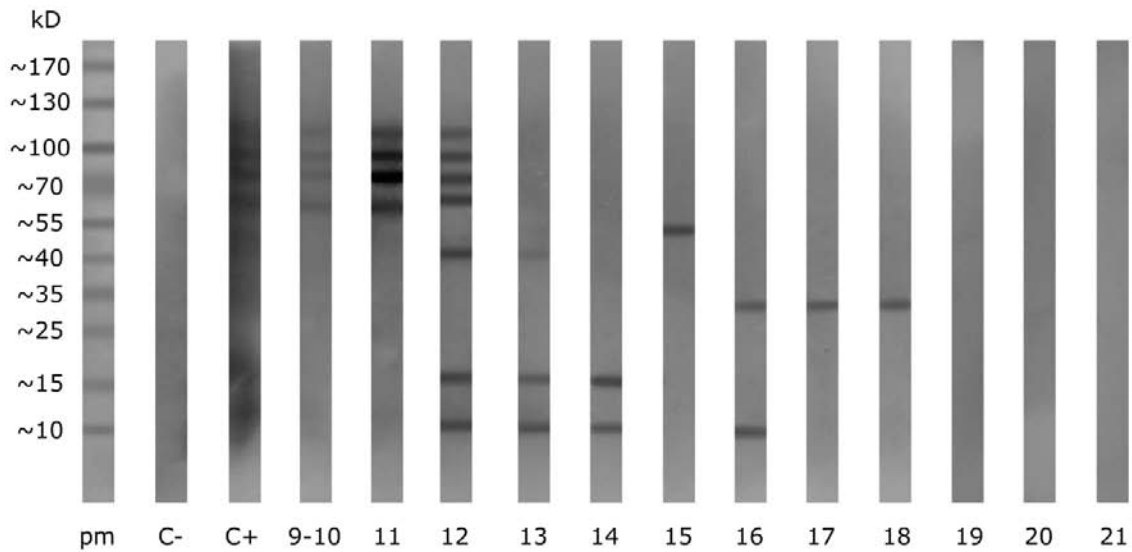


Figura 10. Reconocimiento de antígenos alérgicos para cada fracción obtenida en la cromatografía de exclusión molecular. pm: marcadores de masa molecular; C-: control negativo (tira incubada con una mezcla de suero de voluntarios no alérgicos); C+: control positivo (extracto total del polen); los números en la parte inferior de la imagen indican la fracción cromatográfica analizada.

Las fracciones conteniendo proteínas alérgicas fueron aplicadas a una columna de intercambio aniónico, desafortunadamente los perfiles mostraron que esta cromatografía no nos fue útil para lograr un aislamiento mayor de las proteínas de cada fracción (resultados no mostrados), por lo que se decidió emplear un tipo de cromatografía de mayor resolución.

Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular fueron inyectadas a una columna de fase reversa C-18 acoplada a un HPLC. El análisis por ELISA de las fracciones obtenidas en esta cromatografía nos

indica que solo 6 pudieron recuperarse en cantidad suficiente para poder continuar su caracterización (Figuras 11 a 13).

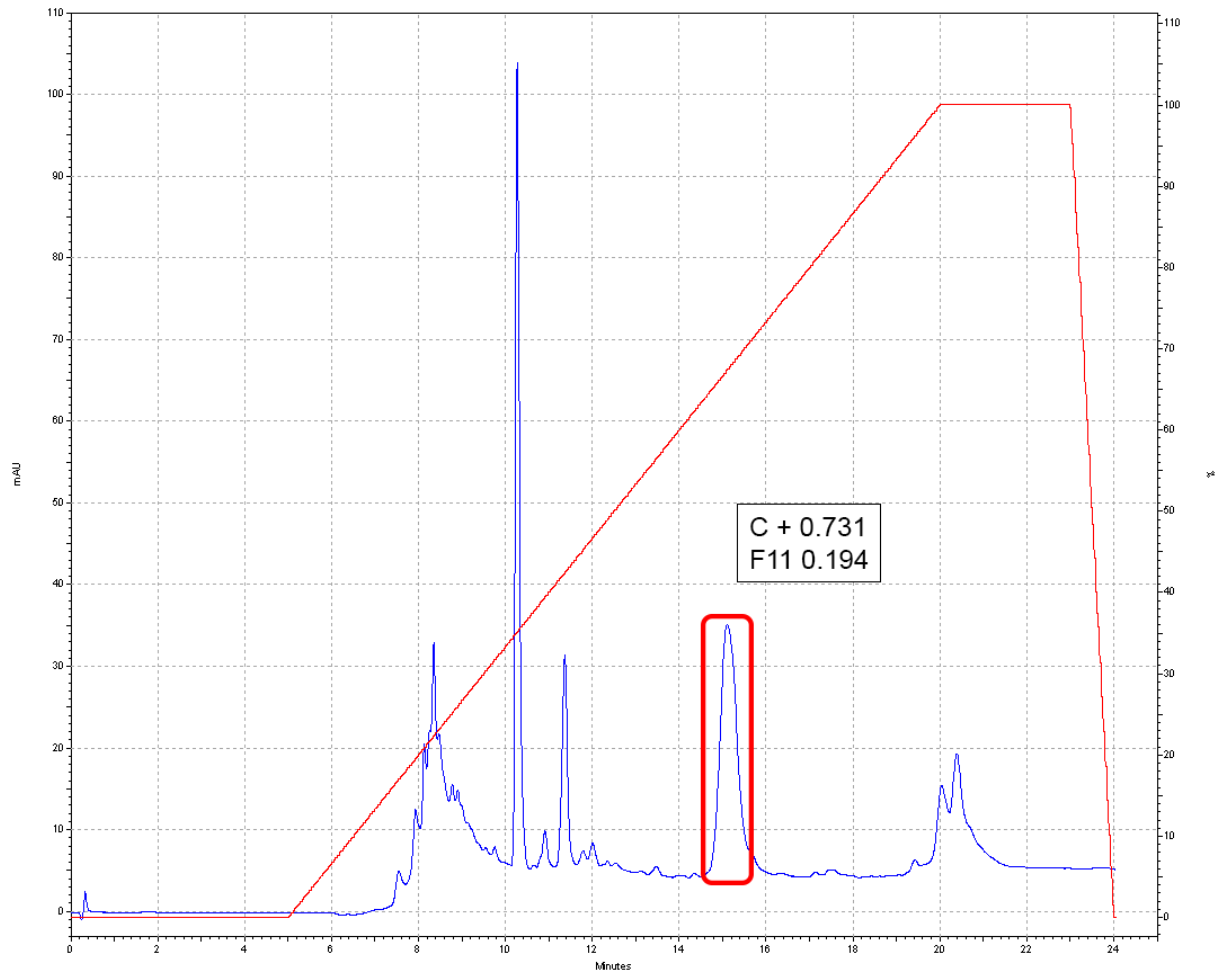


Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido en una columna de fase reversa de las fracciones 9 y 10 provenientes de la columna de exclusión molecular. La línea azul corresponde a los valores de A_{280} (correspondiente a las proteínas eluidas) y la línea roja al gradiente de acetonitrilo empleado para la elución (en %). En el recuadro rojo se muestra la fracción que fue reconocida por IgE del suero de pacientes alérgicos a través de un ensayo de ELISA. En el inserto se muestran los valores de A_{450} obtenido para el extracto total (C+) y la fracción (F11).

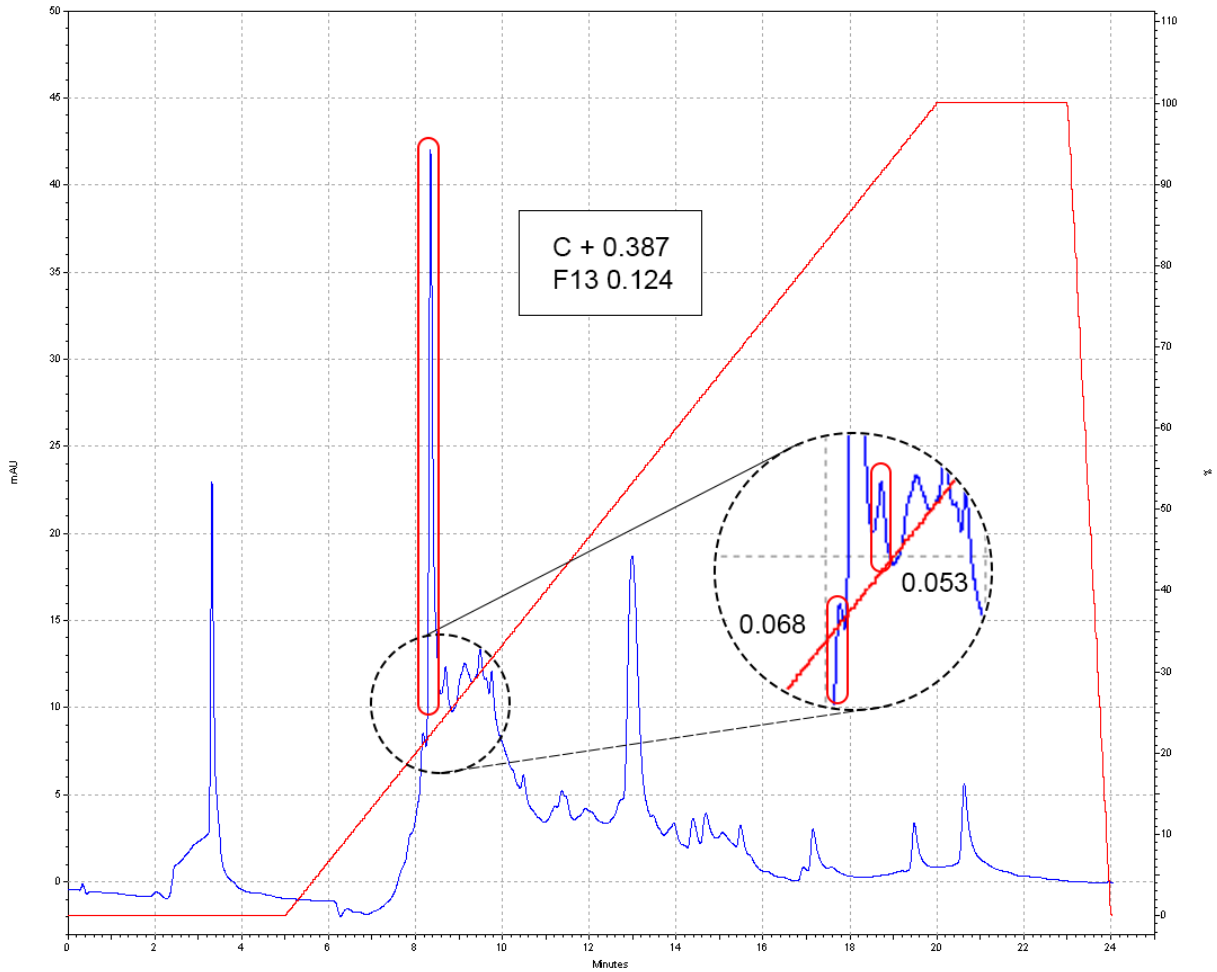


Figura 12. Perfil cromatográfico obtenido en una columna de fase reversa de la fracción 13 proveniente de la columna de exclusión molecular. La línea azul corresponde a los valores de A_{280} (correspondiente a las proteínas eluídas) y la línea roja al gradiente de acetonitrilo empleado para la elución (en %). En el recuadro rojo y en el inserto se muestran las fracciones que fueron reconocidas por las IgE del suero de pacientes alérgicos a través de un ensayo de ELISA. En el inserto se muestran los valores de A_{450} obtenido para el extracto total (C+) y las fracciones positivas (F2, F3 y F4).

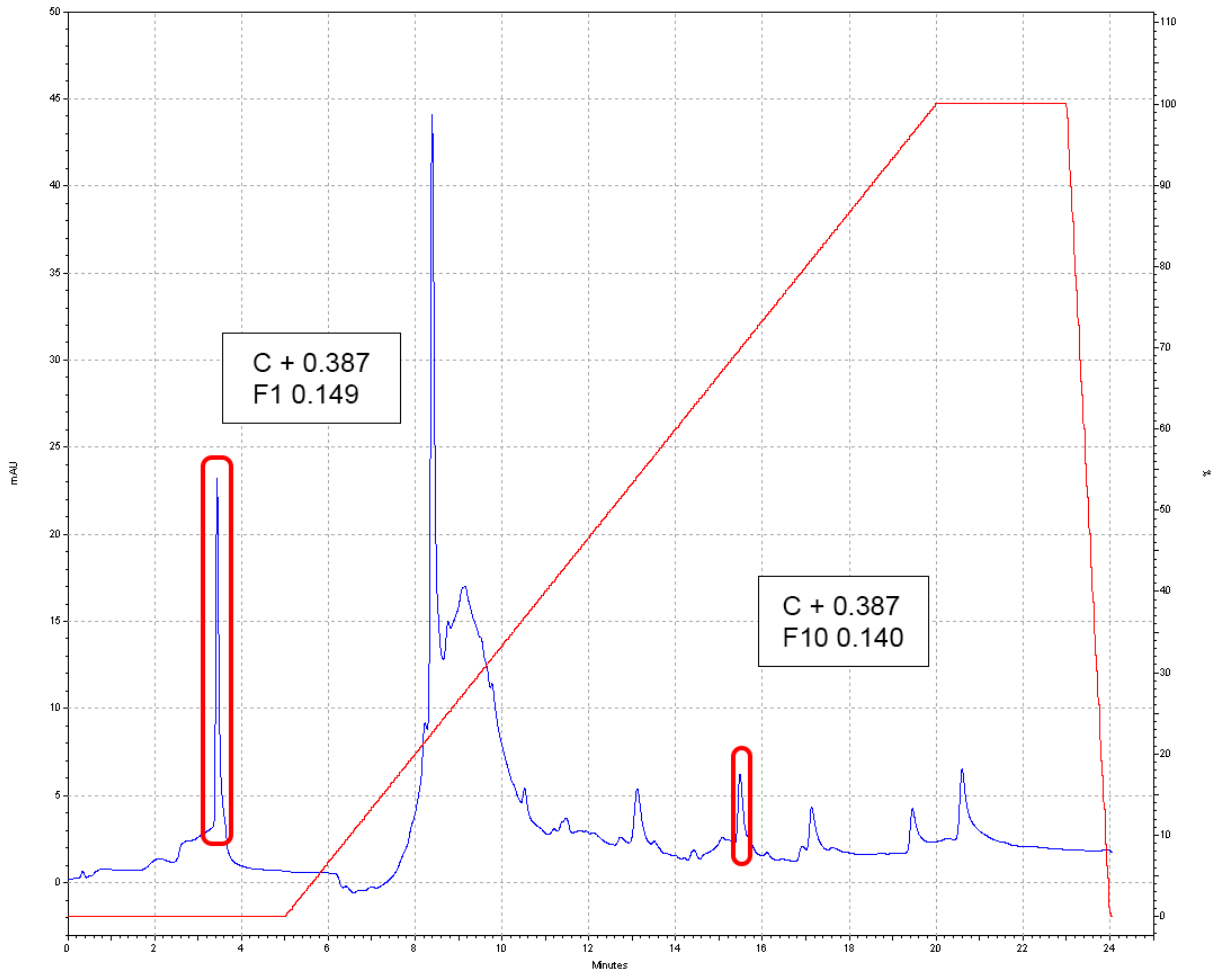


Figura 13. Perfil cromatográfico obtenido en una columna de fase reversa de la fracción 14 proveniente de la columna de exclusión molecular. La línea azul corresponde a los valores de A_{280} (correspondiente a las proteínas eluídas) y la línea roja al gradiente de acetonitrilo empleado para la elución (en %). En el recuadro rojo se muestra la fracción que fue reconocida por IgE del suero de pacientes alérgicos a través de un ensayo de ELISA. En el inserto se muestran los valores de A_{450} obtenido para el extracto total (C+) y las fracciones positivas (F1 y F10).

- Las fracciones aisladas son homólogas a proteínas de pólenes de otras plantas.

Las fracciones provenientes de la cromatografía de fase reversa que fueron reconocidas por IgE del suero de pacientes alérgicos se enviaron

al Instituto Nacional de Medicina Genómica para su identificación por espectrometría de masas. A partir de los perfiles de fragmentación de los péptidos tripticos obtenidos de cada fracción se identificaron seis posibles proteínas, las cuales son homólogas a proteínas de pólenes de otras plantas (Tabla 6).

Tabla 6. Proteínas identificadas por espectrometría de masas analizadas con las bases de datos de UniProt.

ID Proteína	Familia de proteínas	Peso Molecular (kDa)	Peso Molecular en Western Blot (kDa)
A0A0V0IS18	Dedo de Zinc CCCH	77.381	~75
ADL63286.1	ATP Sintasa	37.340	~36
M4DDB6	Proteína sin caracterizar con dominio DPBB de alérgeno expansina	40.876	~40
K7LCV6	Receptor de lectina de tipo G como serina/treonina proteína quinasa	78.670	~70
Q7XQT3	Serina/treonina proteína quinasa	88.841	~90
A0A0V0HT86	Supuesta proteína de óvulo	22.543	~20

*ID de la proteína es el que se encuentra en la base de datos de www.uniprot.org

DISCUSIÓN

Uno de los retos actuales en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas es el identificar y aislar a los antígenos alérgicos clínicamente relevantes de diferentes fuentes, lo que permitirá estandarizar los insumos empleados en la práctica clínica.

Una de las ventajas más evidentes de contar con estos alérgenos aislados se visualiza en el diagnóstico paciente-alérgeno-específico, que se ha llamado como "diagnóstico resuelto por componente" específico para cada paciente, que permitirá eventualmente contar con una terapia adaptada al paciente.^{66,67}

El polen producido por diversas plantas es una de las fuentes alérgicas de mayor relevancia clínica, ya que evitar la exposición a estas partículas, encontradas en la atmósfera durante diversas épocas del año, es prácticamente imposible. El polen de algunos árboles ha mostrado ser altamente alérgico, y el polen del roble blanco (*Quercus alba*), si bien no es de los de mayor abundancia, se ha visto que en México es responsable de un número significativo de los casos de rinitis, asma y conjuntivitis.^{68,69}

En este trabajo nos enfocamos a identificar algunos de los antígenos alérgicos que son reconocidos por pacientes alérgicos de la Ciudad de México. La prevalencia de pacientes alérgicos a pólenes de cualquier planta, que mostraron IgE específicas contra alérgenos del polen de

Quercus alba, fue similar a la prevalencia observada a través de pruebas cutáneas positivas realizadas por nuestro grupo de investigación (15.45% y 16.38%, respectivamente). Reportes recientes muestran que el 22% de pacientes alérgicos de la Ciudad de México presentan síntomas clínicos asociados a la presencia de polen de *Quercus alba*, correlacionado con la presencia de estas partículas en la atmósfera en diferentes temporadas del año.⁶⁹

Los ensayos de *Western blot* nos mostraron que existen por lo menos 16 fracciones proteicas que son reconocidas por IgE de pacientes alérgicos. A la fecha se han reportado y caracterizado tres antígenos alérgicos del polen de *Quercus alba*, los cuales presentan masas aproximadas de 9, 14 y 17 kDa. Si bien, no se han reportado estudios que nos indiquen la relevancia clínica de estos alérgenos, se ha sugerido que podrían ser de los más importantes. Nuestros resultados nos muestran que la fracción que se reconoce con mayor frecuencia es una de aproximadamente 19 kDa (54%), seguida de una de casi 70 kDa (46%) y una de 16 kDa (42%), que pensamos que puede tratarse del alérgeno Qua a 1, perteneciente a la familia de proteínas de protección de patógenos. Interesantemente, cuatro fracciones, con pesos aproximados de 50, 70, 83 y 104 kDa, son reconocidas por una cantidad importante de pacientes (35%, 46%, 31% y 27%, respectivamente). Estas fracciones se observaron como de las más intensas en los

diferentes inmunodetección, sugiriendo que una fracción importante de las IgE del suero de los pacientes se dirige contra estos antígenos.

Las técnicas cromatográficas empleadas nos permitieron aislar algunos de estos antígenos alérgicos, y por espectrometría de masas logramos identificar a seis proteínas de diversas familias. Las masas teóricas de estas familias correlacionan con las observadas para diferentes fracciones detectadas por *Western blot*. La fracción que se reconoció por la mayor cantidad de pacientes (~20 kDa, 54%) podría ser una proteína que está asociada al reconocimiento e interacción del polen con los pistilos de la planta.⁷⁰ Otra fracción reconocida por un número significativo de pacientes alérgicos es la de 83 kDa (31% de pacientes), que basados en los resultados de masas podría ser una mezcla compuesta por dos proteínas de masas moleculares similares, una de la familia de proteínas con dominios “desdos de zinc” y una proteína de la familia de los receptores para polen similar serin/treonin protein cinasa con dominio parecido a lectina de tipo G (77.4 y 78.7 kDa, respectivamente). La primera está asociada a la modulación de los procesos de crecimiento de las plantas a través de la regulación de RNA;⁷⁵ mientras que la segunda está asociada al proceso de reconocimiento de polen y preservación de identidad de especie en plantas.⁷¹ Las otras proteínas identificadas podrían ser: un alérgeno homólogo a las expansinas.⁷² Una proteína homóloga a la familia de las

ATP-sintasa que se ha reportado como de importancia alérgica,⁷³ y una proteína de la familia de la Serin/treonin protein cinasa. Es importantes destacar que estas fueron las únicas que lograron ser aisladas y que conservaran su capacidad de unir a IgE, ya que la cromatografía de fase reversa, si bien es la de mayor resolución de las que existen, provoca en algunas proteínas que se desnaturalicen y no puedan recobrar sus propiedades estructurales, algo necesario para que se lleve a cabo el reconocimiento por parte de las IgE.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto nos permiten hacer una aportación en la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de algunos de los alérgenos del polen del árbol de *Quercus alba* que, a juzgar por nuestros resultados, podrían ser de los clínicamente más relevantes. Adicionalmente, se hace una contribución metodológica para el aislamiento y purificación de proteínas alérgicas de este mismo polen, que podrían ser empleadas para otras fuentes alérgicas similares.

CONCLUSIONES

- Con las técnicas empleadas fue posible aislar e identificar seis proteínas clínicamente relevantes del extracto total de *Quercus alba*.
- Las 6 probables proteínas que se identificaron pertenecen a las familias de proteínas reportadas como alérgicas:
 - 1) Dedo de Zinc CCCH
 - 2) ATP sintasa
 - 3) Proteína sin caracterizar con dominio DPBB de alérgeno expansina
 - 4) Receptor de lectina de tipo G como serina/treonina proteína quinasa
 - 5) Serina/treonina proteína quinasa
 - 6) Supuesta proteína de óvulo

BIBLIOGRAFIA

1. Richard F. Lockey, Dennis K. Ledford. (February 19, 2014). Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual, and Oral, Fifth Edition. Ledford: CRC Press .
2. Ferrera Fatima ,Martin Wolf, and Michael Wallner. (2014 Jul 1). Molecular Approach to Allergy Diagnosis and Therapy. Yonsei Med Journal, 55(4), 839–852.
3. Pawankar R. (2014 May 19). Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. World Allergy Organ Journal, 7(1), 12.
4. López PG, Morfín MBM, Huerta LJ, Mejía CF, López LJ, Aguilar G, Rivera PJL, López ML y Vargas F. (2009). Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México. Revista Alergia México, 56 (3), 72-79.
5. Ocampo, Jaime, Gaviria, Rodrigo, & Sánchez, Jorge. (2017). Prevalencia del asma en América Latina. Mirada crítica a partir del ISAAC y otros estudios. Revista alergia México, 64(2), 188-197.
6. Sally E Wenzel. (2012 May 4). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches Nature Medicine. 18(5):716-25
7. Braman SS. The global burden of asthma. Chest. 2006;130(1 Suppl):4–12.- Organización Mundial de la Salud (World Health Organization). WHO factsheet 206: bronchial asthma. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en. Consultado el 12 Abr 2017.
8. Global Initiative for Asthma (GINA). 2017. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponible en www.ginasthma.org
9. Nuñez Carlos, Pereira Ana Margarida y Morais-Almeida Mario. (2017). Asthma costs and social impact. Asthma Research and Practice, 3:1.

10. Del Río-Navarro B, Del Río-Chivardi JM, Berber A, Sienra- Monge JJ, et al. (2006) Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proceedings* ;27(4):334-40
11. Pérez Martín J.(2000). Impacto del asma en el individuo y la sociedad. Editorial. *Revista Alergia México* ;47(6):175-6.
12. Becerril-Ángeles M, Vázquez Merino CL, Ángeles-Garay U, Alvarado M, Vilchis G. (2008). Prevalencia de enfermedades alérgicas en la vejez. *Rev Alerg Mex*;55(3):85-91.
13. Méndez de Inocencio Julia I. , José G. Huerta López , Joseph A. Bellanti, Roberto Ovilla Martínez y Alejandro Escobar Gutiérrez. (2008). *Alergia. Enfermedad multisistémica Fundamentos básicos y clínicos*. México: Panamericana. P 135
14. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Kuby, J. (2013). *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman. Página 485,491,493
15. Hussain Iftikar, and Jeanne Smith. (2003). Evidence for the Transmissibility of Atopy* Hypothesis. *Chest Journal*, 124 (5), 1968-1974.
16. American Academy of Allergy Asthma & Immunology. Occupational Asthma TTR Disponible en www.aaaai.org/ Consultado el 12 Abr 2017
17. Domínguez Ortega J, López Carrasco V. (2015) . La inmunoterapia específica con alérgenos. En AEPap ed. *Curso de Actualización Pediatría 2015*. Madrid: Lúa Ediciones 3.0;. p. 199-206.
18. Álvarez Sintés Roberto, Rogelio Álvarez Sintés y Manuel Rogelio Álvarez Castro. (1999). Corticoides inhalados en el asma. *Resumed*, 12 (4), 212-22.
19. Kaur S, Singh V. (2018). Asthma and Medicines - Long-Term Side-Effects, Monitoring and Dose Titration. *The Indian Journal of Pediatrics*, 6, 1-9.

20. Zhang L, Prietsch SO, Ducharme FM. (2014). Inhaled corticosteroids in children with persistent asthma: effects on growth. *Evid Based Child Health.*;9:829–930
21. Lipworth BJ.(1999) Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.*;159:941–55.
22. Kelly HW, Van Natta ML, Covar RA, Tonascia J, Green RP, Strunk RC, and the CAMP Research Group. (2008). Effect of long-term corticosteroid use on bone mineral density in children: a prospective longitudinal assessment in the childhood Asthma Management Program (CAMP) study. *Pediatrics.* 122:e53–61
23. Yucel O, Eker Y, Nuhoglu C, Ceran O. (2009) Hemoglobin A1c levels in children with asthma using low dose inhaled corticosteroids. *Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology , Pediatrics.* 46:300–3.
24. Senti G, Johansen P, Kündig TM.(2009 Dec). Intralymphatic immunotherapy. *Current Opinion in Allergy. Clin Immunol.* 9(6):537-43
25. Gabriela Senti and Thomas M Kündig, Intralymphatic immunotherapy.(2015). *World Allergy Organ J.* 8(1): 9.
26. Seon Tae Kim, So Hyun Park, Sang Min Lee and Sang Pyo Lee. (2017 Jul). Allergen-specific intralymphatic immunotherapy in human and animal studies. *Asia Pac Allergy.* 7(3): 131–137
27. Moingeon P. (2013) Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice.* 1:228-41
28. A. M. Scurlock, B. P. Vick- ery, J. O'B. Hourihane, and A. W. Burks, 2010, Pediatric food allergy and mucosal tolerance, *Mucosal Immunology* 3(4):345–354, www.nature.com/mi/journal/v3/n4/g_tab/mi201021f1.html.
29. T.V. Rajan. (2003 July). The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *TRENDS in Immunology .* 24.7

30. Rasmussen F, Siersted HC, Lambrechtsen J, Hansen HS, Hansen NC. (2000). Impact of airway lability, atopy, and tobacco smoking on the development of asthma-like symptoms in asymptomatic teenagers. *Chest*; 117: 1330-1335.
31. Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M, Barcelo MA, Soriano JB, Tobías A et al. (1997). Risk factors for asthma in young adults. *Eur Respir J*; 10: 2490-2494.
32. J. Fuertes Fernández-Espinara, J. Meriz Rubioa, C. Isanta Pomara, C. Pardos Martíneza, V. López Cortésa y E. González Pérez-Yarzab. (2001). Factores de riesgo de asma, alergia e hiperreactividad bronquial en niños de 6 a 8 años. Centro de Salud del Perpetuo Socorro. Huesca. Unidad de Neumología Infantil. Hospital Donostia. San Sebastián. *Esp Pediatr*; 55: 205-212
33. Minai-Fleminger, Y., and F. Levi-Schaffer. (2009). Mast cells and eosinophils: The two key effector cells in allergic inflammation. *Inflammation Research* 58:631–638.
34. Costa DJ, Bousquet PJ, Ryan D, Price D, Demoly P, Brozek J, Schünemann HJ, Bousquet J. (2009 Dec) Guidelines for allergic rhinitis need to be used in primary care. *Prim Care Respir J*. 18(4):250-7
35. Zubeldia Ortuño José Manuel , María Luisa Baeza Ochoa de Ocariz, Ignacio Jauregui Presa y Carlos Jesús Senent Sánchez. (2012). Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. España: Fundación BBVA.
36. Platts-Mills, Woodfolk JA. (2011 Jul). Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunological Reviews*, 242 (1) , 51-68.
37. Terán, L. M., Haselbarth-López, M., & Quiróz-García, D. L. (2009). Alergia, pólenes y medio ambiente. *Gaceta Medica Mexicana*, 145, 215–222.
38. Weber RW. (2005) . Oaks. *Ann Allergy Asthma Immunol*;94(4):A-6; Simpson BJ. *A Field Guide to Texas Trees*. Houston, Gulf Publishing Co. 1999;260-301

39. Gomory D, Yakovlev I, Zhelev P, Jedinakova J, Paule L. (2001). Genetic differentiation of Oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe. *Heredity*;86(Pt 5):557-63
40. Ross AM, Corden JM, Fleming DM. (1996). The role of Oak pollen in hay fever consultations in general practice and the factors influencing patients' decisions to consult. *Br J Gen Pract*;46(409):451-5
41. Subiza J, Jerez M, Jimenez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S, Subiza E. (1995). Allergenic pollen pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol*;96(1):15-23
42. Hernandez Prieto M, Lorente Toledano F, Romo Cortina A, Davila Gonzalez I, et al. (1998). Pollen calendar of the city of Salamanca (Spain). Aeropalynological analysis for 1981-1982 and 1991-1992. *Allergol Immunopathol (Madr)*;26(5):209-22
43. Loria RC, Wilson P, Wedner HJ. (1989) Identification of potential allergens in White Oak (*Quercus alba*) pollen by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol*;84(1):9-18
44. Prados M, Aragon R, Carranco MI, Martinez A, Martinez J. (1995). Assessment of sensitization to holm Oak (*Quercus ilex*) pollen in the Merida area (Spain). *Allergy*;50(5):456-9
45. International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature: IUIS official list <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=566> Consultado el 2 Nov 2017
46. Ipsen H, Hansen OC. (1991). The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of Alder (*Alnus glutinosa*) *Aln g I*, birch (*Betula verrucosa*) *Bet v I*, hornbeam (*Carpinus betulus*) *Car b I* and oak (*Quercus alba*) *Que a I* pollens. *Mol Immunol*;28(11):1279-88
47. Niederberger V, Pauli G, Gronlund H, Froschl R, Rumpold H, et al. (1998). Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol*;102(4 Pt 1):579-91

48. Hauser M, Klinglmayr E, Wopfner N, Mutschlechner S, Mari A, Bohle B, Briza P, Ferreira F, Wallner M. (2007). Cloning, purification and characterization of Bet v 1 homologues from hornbeam (Car b 1) and oak (Que a 1). (Poster) 2nd Int Symp Molecular Allergol, Rome, Italy; April 22-24
49. Moverare R, Everberg H, Carlsson R, Holtz A, Thunberg R, Olsson P, Brostedt P, Hogbom E. (2008). Purification and characterization of the major oak pollen allergen Que a 1 for component-resolved diagnostics using ImmunoCAP. *Int Arch Allergy Immunol*;146(3):203-11
50. Wopfner N, Dissertori O, Ferreira F, Lackner P. (2007). Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*;27(1):29-44
51. Dohsaka Y, Maguchi S, Takagi S, Nagahashi T, Fukuda S, Inuyama Y. (1995). Effect of Oak pollen on patients with birch pollinosis. [Japanese] *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*;98(3):357-61
52. [Maeda Y, Ono E, Fukutomi Y, Taniguchi M, Akiyama K. (2008). Correlations between Alder specific IgE and Alder-related tree pollen specific IgE by RAST method. *Allergol Int*;57(1):79-81]
53. Shida T, Akiyama K, Hasegawa M, Maeda Y, Taniguchi M, Mori A, et al. (2000). Change in skin reactivity to common allergens in allergic patients over a 30-year period. Association with aeroallergen load. [Japanese]. *Arerugi*;49(11):1074-86
54. Schwartz J, Weiss ST. (1995). Relationship of skin test reactivity to decrements in pulmonary function in children with asthma or frequent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*;152(6 Pt 1):2176-80
55. Enriquez Palomec O, Hernandez Chavez L, Sarrazola Sanjuan DM, et al. (1997). Aeroallergens, skin tests and allergic diseases in 1091 patients. [Spanish] *Rev Alerg Mex*;44(3):63-6
56. Helbling A, Leuschner RM, Wuthrich B. (1985) Pollinosis. IV. Which pollens should be tested in allergology practice? Results of determinations of allergy-causing pollens in the Zurich air 1981-1984,

with reference to threshold concentrations. [German] Schweiz Med Wochenschr;115(34):1150-9

57. Furuya K. (1970) Pollinosis. 3. The significance of Oak (genus Quercus) in pollinosis. [Japanese] Arerugi;19(12):918-30
58. Park HS, Chung DH, Joo YJ. (1994). Survey of airborne pollens in Seoul, Korea. J Korean Med Sci;9(1):42-6
59. Bucholtz GA, Lockey RF, Wunderlin RP, Binford LR, Stablein JJ, et al. (1991). A three-year aerobiologic pollen survey of the Tampa Bay area, Florida. Ann Allergy;67(5):534-40
60. Garcia-Mozo H, Galan C, Jato V, Belmonte J, de la Guardia C, Fernandez D, Gutierrez M, Aira M, Roure J, Ruiz L, Trigo M, Dominguez-Vilches E. (2006). Quercus pollen season dynamics in the Iberian peninsula: response to meteorological parameters and possible consequences of climate change. Ann Agric Environ Med;13(2):209-24
61. Potter PC, Berman D, Toerien A, Malherbe D, Weinberg EG. (1991). Clinical significance of aero-allergen identification in the western Cape. S Afr Med J;79(2):80-4
62. Dales RE, Cakmak S, Judek S, Coates F. (2008). Tree pollen and hospitalization for asthma in urban Canada. Int Arch Allergy Immunol;146(3):241-7
63. Bohadana AB, Massin N, Wild P, Toamain JP, Engel S, Goutet P. (2000). Symptoms, airway responsiveness, and exposure to dust in beech and Oak wood workers. Occup Environ Med;57(4):268-73
64. Heinzerling Lucie, Adriano Mari, Karl-Christian Bergmann, Megon Bresciani, Guido Burbach, Ulf Darsow, Stephen Durham, Wytke Fokkens, Mark Gjomarkaj, Tari Haahtela, Ana Todo Bom, Stefan Wöhrle, Howard Maibach and Richard Lockey. (2013) The skin prick test – European standards. Clinical and Translational Allergy 3:3
65. Humberto García Arellano y Rafael Vázquez Duhalt. Cuantificación de proteínas una revisión. Instituto de Biotecnología UNAM. Apartado postal 510-3, 62250, Cuernavaca, Morelos. México

66. Cui Y, Wang Q, Jia H. (2018 Apr 27). Consideration of methods for identifying mite allergens. *Clin Transl Allergy*.;8:14
67. F. C. van Erp, R. J. B. Klemans, Y. Meijer, C. K. van der Ent, and A. C. Knulst. (2016). Using Component-Resolved Diagnostics in the Management of Peanut-Allergic Patients. *Curr Treat Options Allergy*.; 3: 169–180.
68. M. C. Calderón-Ezquerro. Guerrero-Guerra. Martínez-López. Fuentes-Rojas. Téllez-Unzueta. D. López-Espinoza. E. Calderón-Segura. Martínez-Arroyo. M. Trigo-Pérez. (2016) . First airborne pollen calendar for Mexico City and its relationship with bioclimatic factors. *Aerobiologia*. Volume 32, Issue 2, pp 225–244.
69. Calderon-Ezquerro, M.C., Guerrero-Guerra, C., Galán, C., Serrano-Silva, N., Guidos-Fogelbach, G., Jiménez-Martínez, M.C., Larenas-Linnemann, D., López Espinosa, E.D., Ayala-Balboa, J. (2018). Pollen in the atmosphere of Mexico City and its impact on the health of the pediatric population. *Atmospheric Environment*.
70. Thomas Dresselhaus, Andreas Lausser and Mihaela L. Márton. (2011). Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses. *Annals of Botany* 108: 727–737, 2011
71. Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang XC, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA. (2010 Jan 14). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 463(7278):178-83.
72. Cosgrove, D. J., Bedinger, P., & Durachko, D. M. (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6559–6564.

73. Radauer C., Breiteneder H. (2006) Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J. Allergy Clin. Immunol.*;117:141–147.
74. Méndez Huerta Bellanti Ovilla Escobar. (2008) *Alergia. Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos*. México: Ed. Médica americana. P 71.
75. Srimathi P. Bogamuwa Jyan-Chyun Jang. (2014) Tandem CCCH Zinc Finger Proteins in Plant Growth, Development and Stress Response. *Plant Cell Physiol.* 55(8): 1367–1375

ANEXO

Reactivos utilizados para las determinaciones ELISA.

Placas

Placas para ensayo ELISA de 96 pocillos removibles Thermo Fisher Scientific.

Solución reguladora de fosfatos 10x (PBS) pH 7.4

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 40g

Fosfato monobásico de potasio 1g

Fosfato dibásico de sodio 6g

Cloruro de potasio 1g

Disolver en 300mL de agua Milli Q, ajustar pH y llevar a un volumen de 500mL con agua Milli Q

Solución reguladora de carbonato/bicarbonato (CBS) pH 9.6

Pesar exactamente:

Carbonato de sodio 0.40g

Bicarbonato de sodio 0.70g

Disolver en 100mL de agua Milli Q, ajustar pH y llevar a un volumen de 250mL con agua Milli Q

Solución reguladora de fosfatos 1x PBS-Tween 0.05% pH 7.4

Medir exactamente:

PBS 100mL

Agua Milli Q 800mL

Tween 500µL

Llevar a un volumen de 1000mL con agua Milli Q

Solución de bloqueo (leche descremada al 2%)

Pesar exactamente:

Leche Svelty® Nestle en polvo 0.2g

Disolver en 5mL de agua Milli Q y llevar a un volumen de 10mL.

HCl 1N

Reactivo de Quimioluminiscencia

Kit de quimioluminiscencia para detection en Western Blot marca GE Healthcare Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents

Reactivos e insumos usados en la Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot.

Gel de acrilamida

Geles Bio-Rad

4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ “Precast Protein Gels” de 15-pocillos con una capacidad máxima de 15 µL

Regulador de corrida Electroforesis

Pesar exactamente:

Tris-Base	3.03g
SDS 0.1%	1.00g
Glicina 0.192 mM	14.40g
EDTA 0.1 mM	0.372g

Pesar tris-base, glicina y EDTA. Disolverlos en 800mL de agua mQ. Agregar el SDS y continuar agitando. Aforar a 1L con agua mQ

Regulador de transferencia

Pesar exactamente:

Glicina 0.192 mM	14.40g
Tris-Base	3.03g

Disolver 800mL de agua bidestilada y agregar 100mL de Isopropanol para llevar a 1L con material volumétrico.

Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés)

Sigma-aldrich de un tamaño de poro de 0.2 µm

Placas fotográficas para revelado de Western Blot

Kodak

BioMax Light Film

Standard-Chemiluminescent

Reactivos, equipos e insumos usados en cromatografías

Acetonitrilo y ácido Trifluoroacético al 0.1%

A 500mL de acetonitrilo añadir 0.5 mL de ácido trifluoroacético

H₂O miliQ

H₂O miliQ y ácido Trifluoroacético al 0.1%

A 500mL de agua miliQ añadir 0.5mL de ácido trifluoroacético

Metanol

Columna para cromatografía HPLC

Columna ZORBAX SB-C18 Agilent 5µm 2.1x50mm

Cromatografía para purificación de proteínas

General Electric Healthcare: ÄKTA pure

Columna para exclusión molecular.

Superdex™ 75 10/300 GL GE Healthcare

*Todas las soluciones preparadas para las cromatografías se filtraron al vacío con una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm

Técnicas de análisis de proteínas de polen

Algunas de las técnicas utilizadas para el análisis y la identificación de las proteínas de alérgenos actualmente son: Isoelectroenfoque (IEF-Isoelectric focusin) que separa a las proteínas por su carga; Inmunoelectroforesis cruzada (CIE) separa a las proteínas por su carga y antigenicidad; Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y Electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) que separan proteínas por carga, tamaño y peso molecular; Inmunobloting IgE que determina la capacidad antigénica del complejo extracto-anticuerpo monoclonal y la técnica de ELISA que permite medir el conteo de los alérgenos mayores y se basa en la captura de un alérgeno mayor por medio de un primer anticuerpo y una posterior adición de un segundo anticuerpo que se suma al mismo antígeno mayor, formando de este modo un "sándwich", Posteriormente se agrega una enzima que genera color al complejo antígeno-anticuerpo, el cual está relacionada a la concentración del antígeno, obteniéndose la cantidad de alérgeno.

Méndez Huerta Bellanti Ovilla Escobar. *Alergia. Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos* Ed. Médica americana. México 2008. Pag. 71.