



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ISMAEL COSÍO VILLEGAS

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA
DETERMINANTES ALERGÉNICOS DEL POLEN DE FRESNO Y TRUENO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA**

PRESENTA:

DR. ALFREDO PÉREZ MUÑOZ

TUTORES:

DR. JOSAPHAT MIGUEL MONTERO VARGAS

DR. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ



Ciudad de México, 2022



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.

Dr. Juan Carlos Vázquez García.

Director de Enseñanza.

Dra. María Del Carmen Cano Salas.

Subdirectora de Enseñanza.

Dra. Dayanna Lorelly Álvarez Monter.

Titular del Departamento de Formación de Posgrado.

Dr. Luis Terán Juárez.

Profesor Titular de La Especialidad
en Alergia e Inmunología Clínica

Dr. Josaphat Miguel Montero Vargas.

Asesor de Tesis.

AGRADECIMIENTOS.

Han pasado 14 años desde que inicie la carrera de medicina en la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Desde entonces no he dejado de aprender de las bondades que nuestra profesión nos faculta, indudablemente este camino recorrido ha sido de la mano de la gente que me motiva, mi familia y mis amigos más cercanos, pues ellos son quienes han nutrido mi alma con amor, entendimiento y consejos a través del tiempo y de las diversas adversidades. Son el común denominador de mi historia dentro y fuera del aspecto académico.

A mis padres, Alfredo Pérez Navarro y Adriana Yadiralia Muñoz Carmona, pues especialmente gracias a ellos debo quien soy y a donde he llegado, comprensivos y pacientes; lo que haga es por mi eterno amor y honor a las personas que más amo en este mundo. A mis hermanos Andrea y César, de quienes he aprendido de su perseverancia, responsabilidad y superación, siempre apoyándome en mis sueños por cumplir; en especial a mi hermano, el ser humano que más bello que me ha enseñado de esta vida, ejemplo de calidad humana y esmero, eso y más es lo que mi amado hermano Cesar Alonso representa.

A mis maestros, los doctores Luis Manuel Terán, Gandhi Pavón Romero y Fernando Ramírez, pues son el claro ejemplo de lo que un médico debe ser, a quienes admiro de forma honesta y de quienes aun tengo mucho que aprender, agradezco la oportunidad que me han dado de poder instruirme bajo su tutela, mi respeto a sus formidables personas, pues representan lo que deseo alcanzar.

A mis amigos, Rubén, Irving y Mario, sujetos irreverentes a su modo y manera particular, de quienes la vida me ha bendecido, quienes comprenden mis ausencias y mis carencias, les doy las gracias amigos, por siempre estar allí.

A mis compañeros de residencia, Alejandro, Jessica y Estivaliz, pues con ellos crecí en esta etapa de vida, mis colegas en lo subsecuente, siempre contarán con un amigo donde quiera que el destino les depare.

RESUMEN.

Introducción: Se estima que el 25% de la población mundial padece de alguna enfermedad inflamatoria alérgica, de ellos, entre el 40 a 60% es debida a proteínas contenidas los pólenes, provocando una respuesta mediada por IgE. En México, las Oleáceas son una familia de relevancia alérgica, especialmente el Fresno (*Fraxinus udhei*) y el Trueno (*Ligustrum lucidum*). La alergia es una condición multifactorial que está siendo estudiada desde diversos enfoques, entre ellos la proteómica ha ofrecido avances para su comprensión, en su haber existe la activa búsqueda de proteínas inmunorreactivas que desencadenan una respuesta alérgica, y es gracias a diversas metodologías desarrolladas que se ha logrado esta finalidad, hasta el momento se han registrado 987 alérgenos diferentes, de ellos 195 son aerotransportados y de origen vegetal. Sin embargo, no existe en la comunidad científica una metodología única que optimice el rendimiento, la calidad, y la diversidad de proteínas alérgicas y no alérgicas.

Objetivo: Evaluar diferentes métodos de extracción proteica, examinando los aspectos cuantitativos y cualitativos de los extractos, comparando la eficacia en la recuperación, cobertura y conservación de proteínas, a través de un flujo de trabajo que permita optimizar la obtención de determinantes alérgicos, validados por medio de inmunorreactividad con suero de pacientes alérgicos.

Materiales y métodos: Se trabajó con un pool de suero de cuatro pacientes con alergia a los árboles de Fresno y Trueno, usados para inocular mediante Western-blot proteínas de cada especie previamente tratadas a través de diversas metodologías de extracción proteica, para evaluar mediante análisis de varianzas sus eficacias en ruptura de los granos, calidad de las proteínas obtenidas, rendimientos proteicos, y capacidad en la detección de proteínas inmunorreactivas. Los pólenes empleados se adquirieron a través de un banco polínico, propiedad de nuestro servicio.

Resultados: Cada método ejecutado se realizó por duplicado para garantizar la correcta ejecución e interpretación de los resultados. En el caso de Fresno, el método más eficaz en la destrucción de la exina del polen fue el método E; en cuanto al rendimiento proteico obtenido, el método C fue el más eficiente; la mejor calidad se obtuvo con el método D^m, y éste último junto con el método E fueron los más útiles en la identificación de bandas inmunorreactivas. En el caso de Trueno, el método de mejor eficacia en la ruptura de los granos fue el método C; el mejor rendimiento de proteína se obtuvo con el método F; la mejor calidad proteica se logró con el método C; ambos métodos, C y F fueron los más eficientes en la identificación de proteínas inmunorreactivas.

Conclusiones: Existen diferencias en la cuantificación proteica, la calidad de las proteínas, y la identificación de alérgenos entre diferentes métodos de extracción proteica dentro de una misma especie. No existe un método universal para el estudio proteómico de los pólenes. Se sugiere realizar un tamizaje con diferentes métodos de extracción proteica, para analizar la eficacia de los mismos en los granos de cada especie.

ÍNDICE.

1. Marco teórico.	7
1.1 Polen.	7
1.2 Palinología.	7
1.3 Alergia al polen (polinosis).	8
1.3.1 Factores de riesgo para el desarrollo de alergia.	8
1.3.2 Fisiopatología.	10
1.4 Estructura del polen y su conformación.	13
1.4.1 Clasificación microscópica del polen.	14
1.5 Propiedades fisicoquímicas de los alérgenos del polen.	16
1.6 Homología entre alérgenos bacterianos y plantas.	16
2. Antecedentes.	17
2.1 Perspectiva mundial de la polinosis.	17
2.2 Perspectiva de la situación polínica y polinosis en la Ciudad de México.	18
2.3 Familia <i>Oleaceae</i> .	22
2.3.1 <i>Fraxinus</i> .	23
2.3.2 <i>Ligustrum</i> .	25
2.4 Heterogeneidad en la identificación de alérgenos.	27
2.4.1 Obtención del extracto crudo de las proteínas.	28
2.4.2 Precipitación proteica.	31
2.4.3 Cuantificación proteica.	32
2.4.4 Espectrometría de masas para la identificación de proteínas.	33
2.4.5 Nomenclatura de alérgenos.	34
3. Planteamiento del problema.	34
4. Justificación.	35
5. Objetivos.	35
6. Hipótesis.	35
7. Materiales y Métodos.	35
7.1 Universo de estudio.	36
7.2 Identificación de pacientes controles y de estudio.	36
7.3 Toma de muestra de pacientes.	38
7.4 Adquisición y preparación del polen.	38
7.5 Metodologías empleadas para la extracción proteica.	39
7.5.1 Flujo de trabajo de las metodologías.	41
7.6 Verificación de lisis de los granos de polen.	45
7.7 Cuantificación total de proteínas.	46
7.8 Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 13%.	47
7.9 Tinción de geles analíticos.	49
7.10 Western-blot.	50

7.11 Electroforesis bidimensional 2-DE en geles de poliacrilamida al 13%.	51
8. Resultados.	52
8.1 Ruptura del grano del polen.	52
8.2 Cuantificación proteica.	54
8.3 Electroforesis unidimensional.	58
8.4 Western-blot unidimensional.	61
8.5 Tinción de geles 2-DE.	65
9. Discusión.	68
9.1 Asociación entre la ruptura del grano de polen, rendimiento, calidad e inmunodetección de determinantes alérgicos.	68
9.2 Tinción y Western-blot en 2-DE.	73
10. Conclusiones.	75
11. Anexo A.	77
11.1 Cotejo de buffers a usar por cada método de extracción proteica.	77
11.2 Preparación de soluciones stock para metodologías de extracción proteica.	78
12. Anexo B.	79
12.1 Preparación de soluciones empleadas en la metodología.	79
13. Bibliografía.	82

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 POLEN.

En la atmósfera existen muchas partículas suspendidas, entre ellas el polen, que es el más relevante bajo el contexto de factores que condicionan la alergia en el ser humano. El polen se trata de gametofitos masculinos de las plantas que tienen la función biológica de fecundar a los óvulos femeninos para dar lugar a la reproducción y a la formación de semillas 1,2. A las plantas con semillas se les define espermatofitos, de los que se desprenden dos categorías, los gimnospermas “semilla desnuda” y las angiospermas “semillas vasculadas” 3,2.

Los granos de polen varían en su tamaño, desde 2 a 5 μm hasta 250 μm , los que polinizan a través del viento se les denomina anemófilos, y suelen medir entre 20 a 60 μm , y corresponden al 10% de los espermatofitos, este proceso de fertilización es el más importante en términos de la alergia 4,3. Entre los espermatofitos, se identifican los cuatro órdenes más dominantes, éstos son el orden de los *Fagales*, *Proteales*, *Pinales* y *Lamiales* 5. En este último, se encuentra la familia *Oleaceae*, que contiene géneros anemófilos como es el caso del Fresno (*Fraxinus*), Olivo (*Olea europeae*) y el Trueno (*Ligustrum*) 6,7. Este último poliniza principalmente mediante insectos, pero son facultativamente anemófilos 8 - 11. Las plantas que polinizan a través de vectores como los insectos son llamadas entomófilas, su polen suele ser más pesado, y no suelen constituir una causa significativa de la enfermedad alérgica 4,3,12. Algunas familias con polinización anemófila de gran relevancia alérgica son *Poaceae*, *Asteraceae* y *Betulaceae* 13. Cuando la polinización es mixta, se les denomina anfífilas 4.

Las emisiones de polen varían de un año a otro, dependiendo de factores ambientales como la velocidad y dirección del viento, la humedad relativa media, las precipitaciones, la temperatura ambiental, los contaminantes presentes en la atmósfera 6,7,14.

1.2 PALINOLOGÍA.

La Palinología, la rama de la botánica encargada del estudio biológico de los pólenes y esporas. Nehemias Grew (1628-1711) fue un pionero en la realización de descripciones morfológicas de los pólenes. Desde mediados del siglo XX se inició un enfoque ambiental en donde se llevaron a cabo los conteos polínicos, lo que dio lugar a la aeropalinología. Desde entonces, se han hecho diversos diseños de aparatos muestreadores de la atmósfera, denominados captadores, cuya finalidad es el estudio aerobiológico 15.

México cuenta con la Red Mexicana de Aerobiología (REMA) que realiza un monitoreo de partículas biológicas en el aire en diversas zonas del país, lo que ha dado lugar que en la Ciudad de México se haya reportado un calendario polínico 16. Y desde 1940 se han realizado estudios de asociación entre sensibilización a pólenes y enfermedades respiratorias alérgicas 17.

1.3 ALERGIA AL POLEN (POLINOSIS).

La primera definición científica la aportó el Dr. Bostock en 1819, tras publicar “Un caso de una afección periódica de los ojos y el tórax” durante la estación del heno entre los meses de junio y julio en Inglaterra, definido como “catarrhus aestivus”, o catarro de verano. Actualmente, la polinosis se define como un cuadro clínico de inflamación de la mucosa nasal, conjuntival y/o bronquial en respuesta a la exposición a los alérgenos presentes en los granos de los pólenes. Dichos alérgenos interfieren con el sistema inmune, dando lugar a una polarización de respuestas inmunológicas, implicando la diferenciación de los linfocitos T vírgenes (Th0) a linfocitos del tipo Th2, resultado en una hipersensibilidad mediada por IgE y una respuesta de tipo eosinofílica **15**. La sensibilización alérgica se define por la presencia de IgE dirigido a un alérgeno específico **13, 18**.

La alergenidad del polen es definida como la capacidad del polen para provocar una respuesta mediada por IgE en sujetos atópicos y esto es principalmente debido al tipo de alérgenos contenidos en el grano **18**. Los alérgenos más importantes en los granos de polen son las proteínas o los polipéptidos, aunque también los polisacáridos, los lípidos, las glucoproteínas y las lipoproteínas pueden estar asociados con este efecto **2, 3, 16**.

Los síntomas de la enfermedad alérgica se pueden agudizar en el periodo de polinización al que se es alérgico, pudiendo marcar una estacionalidad en sus síntomas **2, 12, 19, 20**.

De los fenotipos alérgicos, el concepto de enfermedad alérgica unificada de las vías respiratorias corresponde a la asociación de la inflamación de las vías aéreas superiores e inferiores, comprende la rinitis y asma alérgicas **19**. Las guías de la rinitis alérgica y su impacto en asma (ARIA) reconocen que alrededor del 80-95% de los pacientes con asma alérgica tienen rinitis alérgica y cerca del 40% de pacientes con rinitis alérgica desarrollan síntomas de asma **16, 21**.

Se puede presentar una inflamación cutánea, e incluso alergias alimentarias debido a homología estructural de alérgenos alimentarios con los alérgenos del polen **13**. Se ha descrito una secuencia temporal entre la alergia alimentaria que conduce al desarrollo de enfermedad alérgica respiratoria que se define como “marcha atópica”, iniciando con dermatitis atópica, seguida de alergia alimentaria, con posterior desarrollo de rinitis alérgica y asma; la polinosis también se ha descrito dentro del síndrome de alergia oral, con una primo sensibilización a alérgenos del polen y la presentación de síntomas orales tras consumir frutas o verduras mediante una reacción cruzada, con una prevalencia de 52% **6, 21**.

Siendo por lo tanto relevante el estudio proteómico de cada especie vegetal, específicamente su inmunoproteómica, que implica el uso de diferentes técnicas, como geles, espectrometría de masas, estudios de la interacción proteica de fuentes orgánicas con el sistema inmunitario como es el caso de la inmunorreactividad con el anticuerpo IgE **11**.

El diagnóstico de las enfermedades alérgicas debidas a pólenes se realiza mediante la identificación de signos y síntomas como rinorrea hialina, prurito nasal, estornudos en salva, obstrucción nasal, sibilancias pulmonares, sensación de opresión torácica, tos productiva, disnea, entre otros. El apoyo paraclínico se realiza mediante la identificación de la sensibilidad cutánea con la aplicación de extractos por pruebas de punción para aeroalérgenos, que tienen una sensibilidad del 85-100%, con una especificidad entre el 45-70%. Otro elemento disponible para apoyar la sensibilización es mediante la identificación de IgE específica, con una sensibilidad entre el 70-75% y una especificidad del 56% 22.

1.3.1 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ALERGIA RESPIRATORIA.

El componente genético tiene una importante participación en la generación de enfermedad alérgica 23. Existen personas con una predisposición a tener anticuerpos IgE elevados, con una mayor probabilidad a generar una sensibilización, a lo que se le denomina atopia 24. Se ha demostrado un aumento en la frecuencia de los genes poligénicos HLA clase II, específicamente los DR7 y DQ2 en pacientes con polinosis a Olivo, indicando una asociación positiva entre los alelos HLA-DRB1*0701/2 y HLA-DQB1*0201 con la respuesta de IgE a Ole e 1. Por el contrario, el HLA-DR4 se le considera un polimorfismo protector 25.

Por otro lado, la hipótesis de la higiene de Strachan postula que factores externos asociados al estilo de vida occidentalizado influyen en la susceptibilidad para generar enfermedades alérgicas. Entre ellos se encuentran la baja exposición a microbios, los cambios ambientales, la medicación, la dieta, las infecciones parasitarias, etc. Contrario a la mala nutrición, crecer cerca de granjas y la nutrición rica en fibra, que se les consideran como factores asociados a la inmunotolerancia 13.

Así como existen factores de riesgo que predisponen a la sensibilización a alérgenos, como es el caso de bajo peso al nacer, y un establecimiento tardío de la flora mucocutánea que correlacionan con atopia y alergia, también existen factores protectores como la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin que puede inhibir la enfermedad atópica 24. Contrario a la sensibilización alérgica en donde existe una IgE dirigida a un alérgeno específico, en los individuos sanos, prevalece una producción de anticuerpos específicos de tipo IgG1 e IgG4 1.

De modo que la sensibilización a un polen depende de la genética del huésped, factores ambientales, así como de las características intrínsecas de la fuente alérgica. Pasando a ser de un sujeto inicialmente tolerante, a un sujeto sensibilizado, y posteriormente a un sujeto con clínica compatible con una enfermedad alérgica 13, 18, como se representa en la Fig. 1.

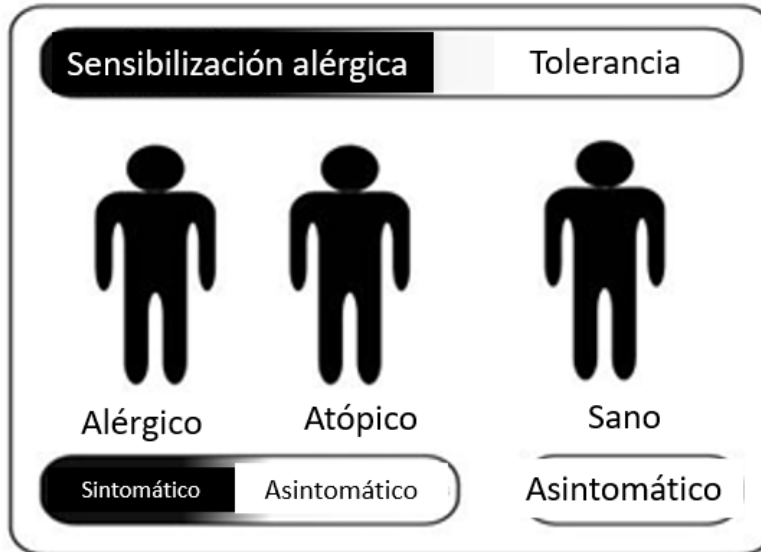


Figura 1. Representación de la dinámica clínica en respuesta a los efectos inmunológicos 13.

1.3.2 FISIOPATOLOGÍA.

El viento es clave para la sensibilización al polen, siendo la vía mediante la cual arriba a las mucosas. El polen se hidrata y libera un cóctel hidrofílico compuesto por proteínas alérgicas y no alérgicas, así como moléculas bioactivas, mediadores de lípidos, entre otros 13.

El proceso de la enfermedad alérgica es iniciado mediante una etapa de sensibilización tras una exposición a un alérgeno, que es detectado por un sistema compuesto por las células presentadoras de antígeno (CPA), específicamente células dendríticas, que se activan directamente por el alérgeno o indirectamente a través de las alarminas: IL-25, IL-33 y linfopoyetina del estroma tímico (TSLP). Éstas últimas, inducen la activación de células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) que generan un microambiente rico en IL-5 e IL-13, que provoca la expresión del ligando OX40L, un coestimulador de activación para linfocitos B (LB) y de supervivencia para linfocitos T (LT) CD4+, polarizando la diferenciación de Th0 a Th2; también se expresan ligandos jagged-1 y -2 cuya función se incluye en la vía de señalización Notch; se secretan quimiocinas CCL17 (un quimioatrayente de LT mediante su receptor CCR4), CCL22 (un quimioatrayente de LT, monocitos y células dendríticas mediante su receptor CCR4), CXCL13 (un quimioatrayente de LB mediante su receptor CXCR5, también presente en vénulas de endotelio alto), y se expresan receptores de quimiocinas CXCR5 y CCR7 (receptor presente en vénulas de endotelio alto que se une a ligandos CCL19 y 20). Con ello se programa su migración a ganglios linfáticos para activar a los Th0 13, 26 - 30.

En los ganglios linfáticos se genera un microambiente rico en citocinas que favorecen la polarización de los Th0 a Th2 gracias al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) y moléculas coestimuladoras, provocando la activación de los factores de transcripción STAT6 y

GATA3 que conllevan a la síntesis de interleucinas (IL) IL-4, IL-5 e IL-13. Las IL-4 e IL-13 tienen homología en sus funciones y en su afinidad con la cadena alfa de sus receptores, la IL-13 es el principal estimulante para la producción de moco, siendo proporcional al aumento de células caliciformes. La IL-5 es eosinopoyética, promueve la toxicidad y supervivencia de los eosinófilos. Dichas interleucinas activan la vía de señalización Notch, clave en la maduración, supervivencia y proliferación celular **13, 26, 31**.

Las IL-4 e IL-13 de los Th2 generan en los LB un cambio de isotipo, determinado por las cadenas pesadas ϵ de los anticuerpos, que resulta en el ensamblaje de IgE. También inducen en la superficie de los LB la expresión de MHC-II, B7 (CD80/86), CD40, CD23 (receptor de baja afinidad para IgE - $f\epsilon$), estas moléculas estimulan y modulan su maduración a célula plasmática. A su vez, se decrementa la síntesis de citocinas de tipo Th1 (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α). En los mastocitos hay una elevación de CD23 y su maquinaria se dirige a la producción de leucotrienos, así como a la liberación de moléculas preformadas **26, 32**.

La porción intrínseca del polen es rica en lípidos, que tienen la capacidad de ser presentados por células dendríticas y de activar a Th0, además regulan de forma positiva la expresión de CD1d, un receptor que funciona como presentador de lípidos a células T natural killer (NKT) **13**.

Los efectos que se producen a nivel endotelial son un favorecimiento en la permeabilidad vascular, la secreción de IL-8 (un quimioatrayente de neutrófilos) y la expresión de VCAM-1 que promueve la migración eosinofílica a focos del estímulo inflamatorio. Esto se asocia con un incremento en la reactividad cutánea ante una reexposición a los alérgenos tras la aplicación de pruebas cutáneas (SPT) **13, 32**.

Ante una reexposición al alérgeno, los mastocitos y basófilos cebados estarán facultados para desencadenar una liberación de mediadores inflamatorios como como la histamina, leucotrienos y citocinas contenidos en sus gránulos. Esto desencadena vasodilatación, un incremento en la hipersecreción glandular y el estímulo de nervios que culminan en la expresión clínica de signos y síntomas clásicos de la alergia **26**.

El polen contiene moléculas alergénicas y no alergénicas, agentes etiológicos en la fisiopatología de la alergia, su exposición crónica en los epitelios promueve una elevación en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), el estrés oxidativo estimula la expresión de receptores activados por proteasas (PAR), también sucede la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRR), los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de unión a nucleótidos de dominio de oligomerización (NOD). El daño epitelial conduce a la liberación de alarminas **13, 26**.

La mayoría del polen de árboles, pastos y malezas como la *Betula verrucosa*, el *Lolium perenne* y la *Ambrosia artemisiifolia* contienen proteasas de cisteína, serina y aspártico que rompen las

uniones entre las células epiteliales de forma irreversible. Algunas proteasas contenidas en el polen pueden tener su origen en microorganismos que lo habitan. Otras proteínas no consideradas proteolíticas (Ole e 1 y Bet v 1) interactúan y dañan la barrera epitelial; Bet v1, tiene la capacidad de unirse a fosfolípidos de las membranas celulares, lo que podría facilitar su cruce a través de la mucosa. Las pectatoliasas de *Cryptomeria japonica* conducen a la activación de PAR2 **1, 13**.

La inmunorreactividad del anticuerpo IgE a alérgenos no depende sólo de la cantidad, sino del tipo de alérgeno **18**. Existen diferentes factores extrínsecos e intrínsecos que comprometen la inmunodetección de IgE a las proteínas. Dentro de los factores extrínsecos/ambientales se encuentran los rayos UV, el CO₂, la lluvia/estrés hídrico, la temperatura, la época de polinización, los contaminantes como el PM 2.5, PM 10, NO₂ y O₃. Estos factores en el huésped pueden funcionar como adyuvantes al dañar el epitelio, con una subsecuente liberación de alarminas y una respuesta de tipo Th2. Dentro de los factores intrínsecos, se encuentran la nutrición de minerales, su biodisponibilidad, y la nitración de los alérgenos por contaminantes. En la Tabla 1 se muestran los componentes no alérgénicos intrínsecos del polen y su influencia en el sistema inmunológico, y en la Tabla 2 se muestran los componentes extrínsecos **1, 5, 13**.

Tabla 1. Componentes moleculares no alérgénicos del polen, porción intrínseca.	
Componente	Efecto inmunológico
Mediadores de lípidos asociados al polen (PALM) de pasto y abedul	Activan a las células inmunes innatas tipo 2 e inhiben Th1, atraen a eosinófilos y neutrófilos 3 .
Fitoprostano E1 (PPE1) derivado del polen	Inhibe la producción de IL-12 mediante el bloqueo de NF-κB, con supresión de la respuesta Th1 13 .

Tabla 2. Componentes moleculares no alergénicos del polen, porción extrínseca.

Componente	Efecto inmunológico
Gases irritantes y partículas de escape de diésel, ozono, dióxido de carbono y óxidos de nitrógeno	Pueden causar alteraciones en microbiota, modificaciones químicas, actuar como adyuvantes, dañar la barrera epitelial 1, 13 .
Niveles de O ₃ ambiental	Asociación con mayor sensibilización positiva a Bet v 1 13 .
Infección viral en la planta	Se desconoce su influencia como potencial sensibilizante 13 .

1.4 ESTRUCTURA DEL POLEN Y SU CONFORMACIÓN.

El grano de un polen se compone de dos capas externas, la sexina y la nexina, que en conjunto se denominan exina, que es resistente a la degradación y al calor. El polen tiene una capa interna denominada íntima, compuesta por celulosa, sensible a la acetólisis **4**. La ruptura del grano del polen sucede al contacto con soluciones hipotónicas como agua de lluvia o las lágrimas. Se ha descrito que existe diferente inmunorreactividad de IgE a sus componentes entre los pólenes del mismo orden taxonómico, posiblemente a diferencias como sus proteasas, sus características físicas, o debido a su biodisponibilidad (eficiencia de ruptura del grano de polen) **2, 5, 13**.

Las proteínas contenidas en la masa seca del grano de polen corresponden del 2.5% al 61% **33**. Su proteoma contiene proteínas alérgicas y no alérgicas. La OMS y la IUIS clasifican a una proteína como alérgeno cuando produce una respuesta específica de anticuerpos IgE en al menos 5 personas **1**. Sin embargo, pueden existir actividades sinérgicas entre proteínas alérgicas y no alérgicas para generar una respuesta inmunológica en el huésped **5, 13**.

El cóctel proteico del polen se distribuye en dos compartimientos principales, en uno interno, la matriz intrínseca, conformada por moléculas bioactivas como proteínas, carbohidratos, metabolitos y lípidos. Y de un compartimiento externo, compuesto por partículas contaminantes del aire, aerosoles y microbioma, como bacterias, hongos y virus **13**. Como se representa en la Fig. 2.

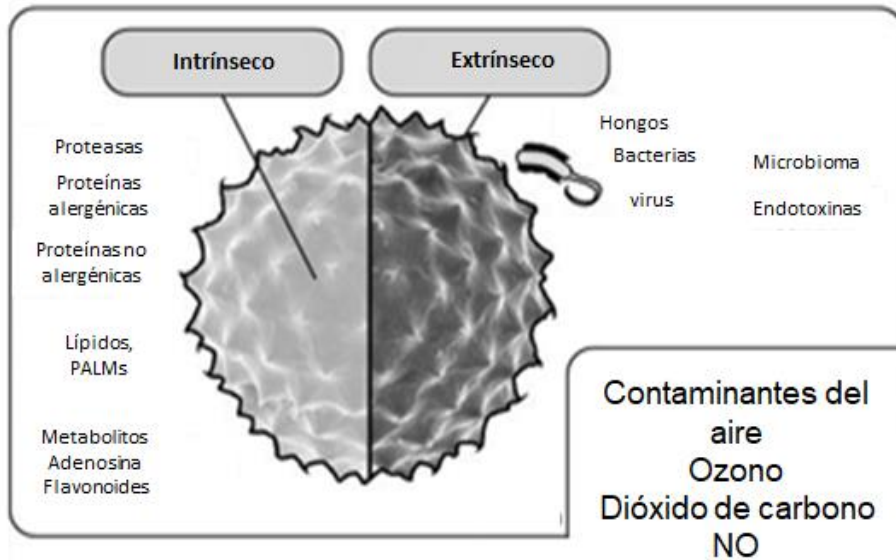


Figura 2. Representación gráfica de la composición interna y externa del polen **13**.

1.4.1 CLASIFICACIÓN MICROSCÓPICA DEL POLEN.

Los granos pueden clasificarse según su morfología, estructura, tamaño y sus características. Así, en su superficie externa yacen sus poros o colpos ubicados en sentido longitudinal del grano, así como una pared reticulada, que le da el aspecto de crestas que rodean lúmenes de más de 1 μm de anchura, ordenados conforme a las mallas de una red. La observación del polen puede realizarse por microscopía óptica o de barrido **3, 4, 17**.

Dentro del grupo de pólenes con mayor relevancia alérgica en México, se encuentran los Lamiales. Por ejemplo, *Fraxinus* y *Ligustrum*. Se presenta la observación de microscópica óptica en la Fig. 3 **9, 17**.

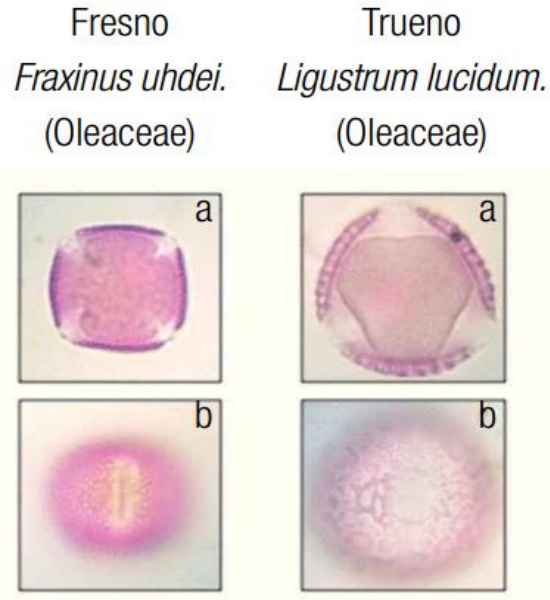


Figura 3. Microscopia óptica de Fresno y Trueno con tinción. A. Sección óptica, B. detalle de aperturas 17.

El grano del Fresno en su vista polar tiene una forma cuadrangular o pentagonal, esferoidal u oblato. En su vista ecuatorial es esferoidal u oblato. De superficie reticulada. Mide entre 20 a 27 y 30 μm . Entre otras características, tiene poros o aperturas fusiformes que dan aspecto tricolorado, el tamaño de la retícula es heterogénea y disminuye hacia las aperturas formando un margen. Se presenta la descripción y observación de microscopía de barrido en la Fig. 4 4, 17, 34.

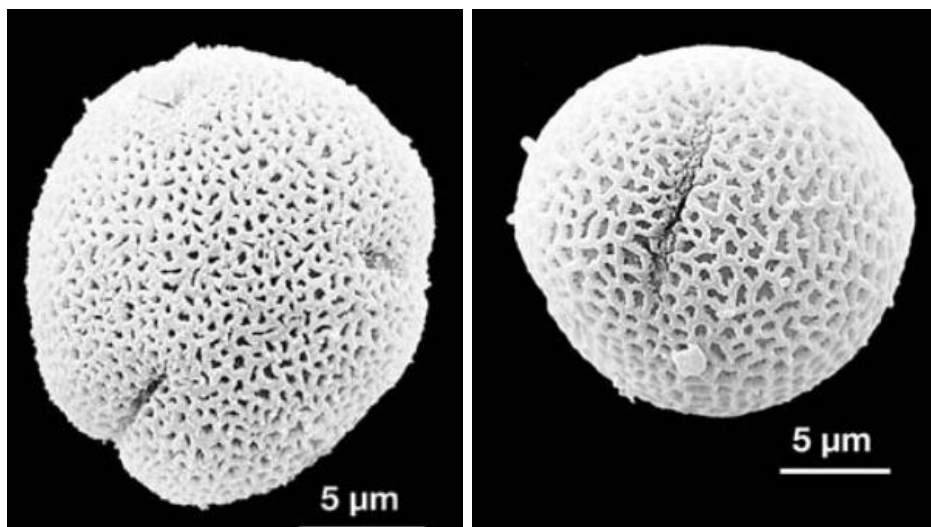


Figura 4. Microscopía de barrido del grano de Fresno, se observa su exina reticulada, con tres aperturas fusiformes que le dan aspecto tricolorado 34.

El grano de Trueno en su vista polar tiene una forma esferoidal y trilobulada. En su vista ecuatorial es esferoidal u oblato. En cuanto a sus aperturas, es tricolporado. Con una exina de superficie reticulada. Mide entre 26 – 30 μm . Entre otras características, el tamaño de la retícula disminuye hacia los colpos, con engrosamiento de la pared debajo de las aperturas formando oncos. Se presenta la observación microscópica de barrido en la Fig. 5 17.

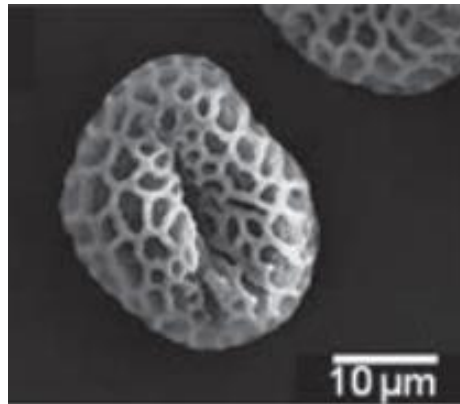


Figura 5. Microscopía de barrido del grano de Trueno 35.

1.5 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS ALÉRGENOS DEL POLEN.

Se ha demostrado que la mayoría de los alérgenos principales están cargados negativamente, usualmente con un peso molecular menor de 70 kDa, con hidrofobicidad y alta estabilidad. Suelen tener diversas funciones biológicas intrínsecas, por ejemplo: las proteasas, las pectatoliasas, los inhibidores de tripsina, o con otras funciones como: las proteínas de unión a calcio, las proteínas de transferencia de lípidos, y las proteínas de unión a actina 2, 36.

La actividad enzimática se asocia con la alergenicidad en general, como es el caso de las proteasas que se asocian con un aumento en la inmunodetección de IgE a sus componentes 1. Algunos ejemplos de estos alérgenos polínicos, es la pectatoliasa, que degrada la capa peptídica que permite la hidratación del polen y su gelificación con la finalidad de lograr un reconocimiento entre el polen y el estigma, dicha enzima es identificada como el grupo 1 de las *Cupresáceas*. Otro ejemplo es la poligalacturonasa del *Platanus acerifolia* (Pla a 2), que es reconocida por pacientes alérgicos a esta planta, biológicamente relacionada con la interacción y modificación de las pectinas, tanto de la intina como del estigma 2.

En el reino animal, las enzimas también suelen tener inmunodetección por las IgE en población sensibilizada. Un ejemplo es Der p 1 del ácaro, una cisteína proteasa con capacidad de escindir un fragmento de 25 kDa de CD23, dando lugar a una regulación positiva para la síntesis de IgE. Además de escindir la CD25 en los LT que interrumpe la regulación autocrina positiva para la síntesis de IL-2 y con ello inhibir una respuesta Th1. Otro ejemplo de proteasas es el veneno de los himenópteros, donde su hialuronidasa degrada las moléculas de adhesión celular permitiendo la penetración del cóctel proteico inmerso en su veneno hacia los tejidos 1.

Los lípidos son una parte importante de la exina, denominados mediadores lipídicos asociados al polen (PALM), que ayudan al tubo polínico a penetrar el estigma **3**. Las plantas al exponerse a agentes estresantes, incrementan la producción de PALMs, que funcionan como homólogos a PEG2 y pueden facilitar una activación de eosinófilos, neutrófilos e inducir una respuesta de tipo Th2. Se ha observado que la inmunodetección de IgE a los componentes polínicos no depende del componente genético de la fuente vegetal **1, 13, 16, 18**.

1.6 HOMOLOGÍA ENTRE ALÉRGENOS BACTERIANOS Y PLANTAS.

Se ha descrito que los alérgenos son proteínas de origen eucariota, que comparten poca homología con proteínas bacterianas mediante el análisis de BLAST, con pocas probabilidades de reactividad cruzada entre sus alérgenos y proteínas bacterianas. Las pocas homologías descritas se han realizado con Phl p 1, con 27% de identidad con proteoma bacteriano. Para Der p 1, se han descrito 42 homologías, con 22% de identidad con proteoma bacteriano. Para Amb a 1, con 76 homologías, con 22% de identidad con proteoma bacteriano. En este estudio no se analizó Fresno, y en el caso de Trueno, con respecto a sus alérgenos, no se encontraron homologías bacterianas, pero si más de 100 homologías de proteínas no alergénicas con proteínas bacterianas **37**.

2. ANTECEDENTES

2.1 PERSPECTIVA MUNDIAL DE LA POLINOSIS.

La primera descripción de polinosis fue en el siglo XIX, por John Bostock en Londres, como una afección periódica en los ojos, nasales y en el pecho que aparecía a mediados de junio y que se extendía a mediados de julio de cada año, definido como “catarrhus aestivus”, o catarro de verano, sin encontrar una explicación causal **3, 15, 17, 38**. En 1831, Elliotson le define como “la fiebre del heno” **3**. Después en 1873, Charles H. Blackley evidencia que el polen aeronavegante es la causa de la fiebre del Heno **2, 15**. Posteriormente en Berlín, en 1906, Alfred Wolff-Eisner reconoció que las proteínas del polen eran la causa específica de los síntomas. En 1911, Leonhard Noon y John Freeman fueron pioneros en la inmunoterapia específica de alérgenos, al usar una “inoculación profiláctica contra la fiebre del heno” utilizando extractos de polen de gramíneas **39**. En 1921, Prausnitz y Kustner descubren que la aplicación de suero de pacientes alérgicos en la piel de sujetos sanos puede transferir la sensibilidad al alérgeno, lo que condujo al descubrimiento de la IgE, inicialmente llamado reaginas **12, 20**.

Aunque en teoría cualquiera de los miles de variedades de especies productoras de polen puede producir alergia, sólo un grupo relativamente pequeño de pólenes tiene relevancia clínica **17**.

La OMS estima que a nivel mundial el 25% de la gente tiene alergia respiratoria, de ellos, la prevalencia de alergia al polen representa aproximadamente el 40-60% de los casos, y su

incidencia se ha duplicado en las últimas tres décadas. Actualmente ha condicionado una carga socioeconómica grave para la civilización occidental, es un problema de salud mundial **5, 13, 16, 33, 40, 41**.

La enfermedad alérgica unificada de las vías respiratorias que comprende las enfermedades crónicas más comunes entre adultos y jóvenes, más de 400 millones de personas tienen rinitis alérgica y más de 300 millones de personas tienen asma en el mundo **13, 19, 20**. En el 2013, en la tercera fase del Estudio Internacional de Asma y Alergia en la Infancia (ISAAC), se reportó que niños de entre 6 y 7 años tenían una prevalencia de asma de 11.7%, y una prevalencia de rinoconjuntivitis de 14.6%. En los adolescentes, la prevalencia de asma fue de 11.7%, y para rinoconjuntivitis de 8.5% **6, 21**.

2.2 PERSPECTIVA DE LA SITUACIÓN POLÍNICA Y POLINOSIS EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

En México, diferentes estudios se han centrado en la detección de polen desde el año de 1940. En ese mismo año, gracias a los trabajos del Dr. Mario Salazar Mallén, se demostró que la sensibilización a pólenes se asociaba a 31% de las alergias respiratorias en personas residentes en el Valle de México, demostrando la taxonomía de la flora alérgica más relevante en México **16, 17**.

La Ciudad de México se encuentra en un valle rodeado de montañas, el 45% está urbanizada y el 55% es zona rural, el suelo se usa para reservas ecológicas, silvicultura y agricultura. Se encuentra el Bosque de Chapultepec, la mayor área verde urbana de América Latina, contiene 105 especies, en particular: *Ligustrum lucidum*, *Fraxinus uhdei*, *Cupressus benthamii*, entre otros **16**.

En la Ciudad de México el porcentaje ocupado por espacios verdes es de 8.91%. Su variedad forestal es amplia, los árboles más comunes cultivados con fines ornamentales son el Fresno (*Fraxinus udhei*), Eucalipto (*Eucaliptus canaldunensis* y *E. globulus*), Trueno (*Ligustrum lucidum*), Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), Árbol de goma dulce (*Liquidambar styraciflua*), Casuarina (*Casuarina equisetifolia*) y Colorín (*Erythrina coralloides*) **42, 43**.

Estudios han reportado que la Ciudad de México tiene un problema grave de contaminación atmosférica, además de haber gran competencia entre sus plantas por plantarse con mucha cercanía entre ellas **42**. Es probable que el estrés ambiental en la planta pudiera condicionar una mayor variabilidad proteica y una mayor susceptibilidad de alergenidad **13, 18**.

En 1999, en un estudio realizado en población pediátrica con una edad entre 1 a 5 años, se demostró que la frecuencia de sensibilización mediante SPT a cualquier aeroalérgeno fue de

46.5%. En los menores de un año fue de 23%, a los cuatro años de 65%, convirtiéndose de monosensibles a polisensibles (más de dos alérgenos positivos en SPT). Siendo los alérgenos más frecuentes en toda la población los ácaros del polvo casero, igualándose en frecuencia a la sensibilización a pólenes a los cuatro años de edad **44**.

En el 2008 se creó la Red Mexicana de Aerobiología (REMA), que realiza un monitoreo de partículas biológicas en el aire en diversas zonas del país. Gracias a ello, en la Ciudad de México se ha reportado un calendario polínico. Se consideró como inicio del período de floración la fecha del primer día en que se obtiene una concentración de polen acumulado igual o mayor al 2.5%. Y como fin del período de floración la fecha del último día en que la concentración acumulada de polen es igual o inferior al 97.5%. En el calendario polínico, el Fresno polinizó todo el año, con picos entre los meses de diciembre a febrero (>200 granos de polen/ m^3), correspondiendo al 40.22% y en el caso de Trueno el 1.09% del polen aéreo recolectado a lo largo de un monitoreo de 8 años. Los tipos de polen más importantes según la alergenicidad fueron *Fraxinus* sp., Cupressaceae y Poaceae. Ver Fig. 6 **16**.

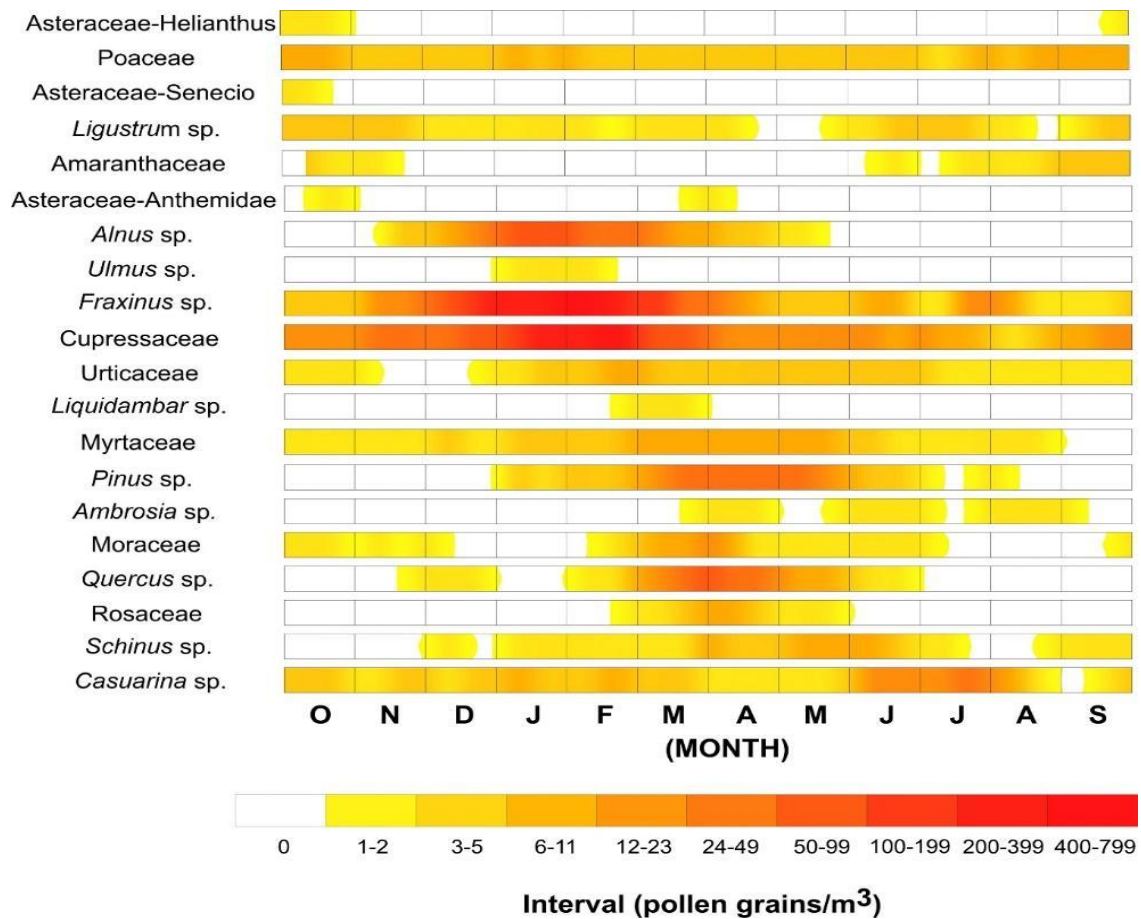


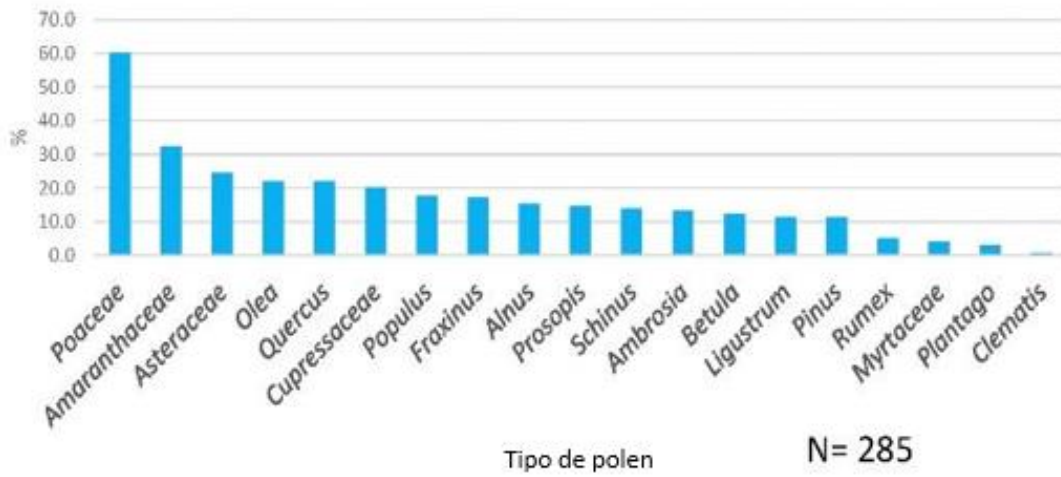
Figura 6. Calendario polínico de la delegación Miguel Hidalgo (en el parque Chapultepec), Ciudad de México, de 2008 a 2016 **16**.

Por otro lado, el árbol del Olivo es escaso en México, sin embargo, es positivo en un gran número de SPT (52.4%), posiblemente por la reactividad cruzada con los pólenes de su misma familia. Para *Fraxinus excelsior*, endémico de Norte América, se obtuvieron SPT positivas en el 43.3% y para *Ligustrum vulgare* positivas en el 36.6%; lo que puede conducir a síntomas crónicos en pacientes alérgicos 11. El Olivo es positivo en pacientes monosensibles sólo en un 5.5%. En la Fig. 7 se muestran las especies con mayor relevancia en la alergia en México 6, 45.

La sensibilidad de las pruebas cutáneas positivas entre Fresno y Trueno fue de 78.3%, entre Trueno y Olivo de 76.7%, mientras que entre Fresno y Olivo fue de 73.2% 6. Con frecuencia, se ha sugerido que los síntomas son debidos a reacción cruzada entre las especies de la familia *Oleaceae* 46. En la Fig. 8 se muestran las frecuencias de SPT positivas de tipos de pólenes que causan alergia en pacientes pediátricos, y en la Fig. 9 los fenotipos de polinosis en población pediátrica mexicana.

REINO	SUBREINO	SUPERDIVISIÓN	DIVISION	CLASE	SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO
Plantae	Tracheobionta	Spermatophyta	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Caryophyllidae	Caryophyllales	Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i>
							Chenopodiaceae	<i>Atriplex</i>
								<i>Chenopodium</i>
								<i>Salsola</i>
							Scrophulales	Oleaceae
					<i>Ligustrum</i>			
					Polygonales	Polygonaceae	<i>Rumex</i>	
					Plantaginales	Plantaginaceae	<i>Plantago</i>	
					Asteridae	Asterales	Asteraceae	<i>Ambrosia</i>
								<i>Artemisia</i>
								<i>Franseria</i>
								<i>Cosmos</i>
								<i>Helianthus</i>
					Hamamelidae	Casuarinales	Casuarinaceae	<i>Casuarina</i>
						Fagales	Betulaceae	<i>Alnus</i>
				Fagaceae			<i>Quercus</i>	
				Urticales	Ulmaceae	<i>Ulmus</i>		
				Rosidae	Fabales	Fabaceae	<i>Acacia</i>	
					Sapindales	Anacardiaceae	<i>Prosopis</i>	
							<i>Schinus</i>	
				Myrtales	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>		
				Dilleniidae	Salicales	Salicaceae	<i>Populus</i>	
							<i>Salix</i>	
Liliopsida	Commelinidae	Cyperales	Poaceae	<i>Cynodon</i>				
				<i>Lolium</i>				
				<i>Phleum</i>				
				<i>Holcus</i>				
				<i>Zea</i>				
Coniferophyta	Pinopsida		Pinales	Cupressaceae	<i>Cupressus</i>			
					<i>Juniperus</i>			
				Pinaceae	<i>Pinus</i>			

Figura 7. Taxonomía de las especies de plantas con mayor relevancia en la alergia en México 17.



INP, CMN, HIM, PHs

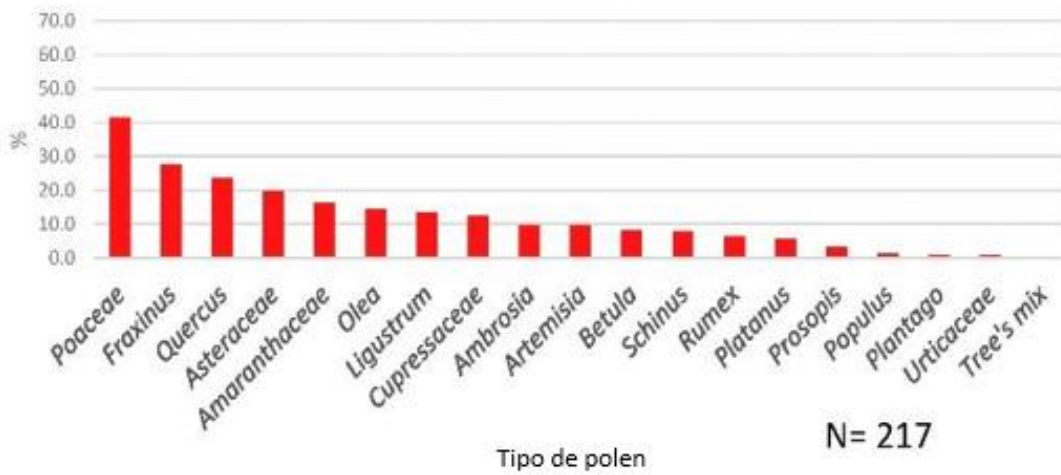


Figura 8. Porcentajes de tipos de pólenes que causan alergia en pacientes pediátricos, basado en pruebas cutáneas positivas en el hospital del Instituto de Oftalmología Conde de Valencia, INP, CMN, HIM y Hospitales privados de la Ciudad de México 16.

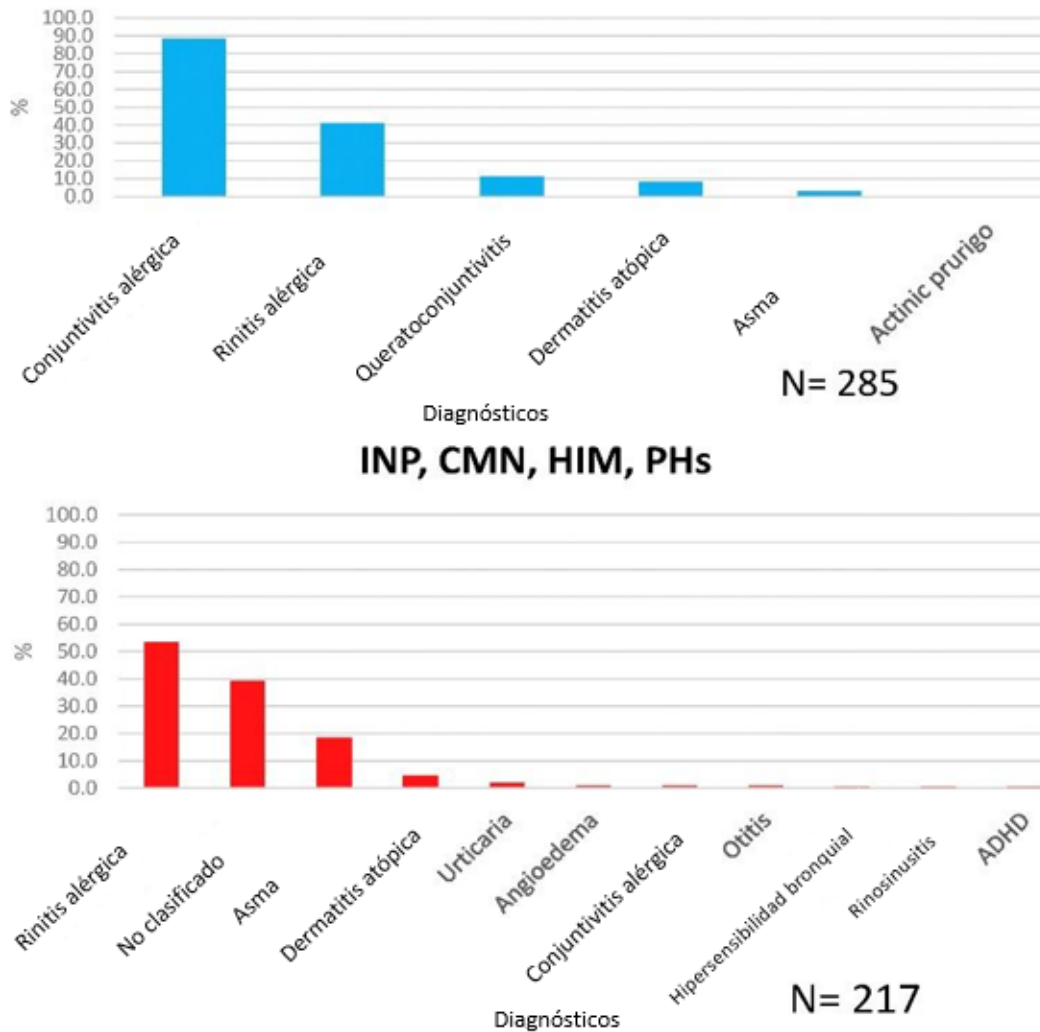


Figura 9. Porcentaje de fenotipos alérgicos asociados con polen en pacientes pediátricos en el hospital del Instituto de Oftalmología Conde de Valencia, INP, CMN, HIM y Hospitales privados de la Ciudad de México **16**.

2.3 FAMILIA OLEACEAE.

La familia *Oleaceae* incluye 27 géneros y más de 700 especies, ubicados en zonas con climas cálidos, que pueden crecer espontáneamente o pueden plantarse con fines ornamentales, medicinales o alimenticios. Sus pólenes son fuente de alergia en diferentes partes del mundo. Las especies con mayor relevancia alérgica son Olivo, Fresno y Trueno. El Olivo es un árbol perennifolio con una altura que oscila los 5-10 metros, con un tronco tortuoso, de corteza pardagrisácea, tiene hojas opuestas lanceoladas-oblongas, su fruto es la aceituna **34**. En algunos reportes españoles, el Olivo florece de enero a marzo **7, 14**. En reportes del área metropolitana de la Ciudad de México, el Olivo florece de abril a junio **6**. El alérgeno principal del Olivo es Ole e 1, presente en otras especies de la familia *Oleaceae* como Ole e 1-like, con reactividad

cruzada entre los homólogos pertenecientes a su familia y una baja reactividad cruzada con homólogos de otras especies no relacionadas como *Lolium perenne* (Lol p 11), *Chenopodium album* (Che a 1), *Phleum pratense* (Phl p 11) y *Plantago lanceolata* (Pla l 1). **6, 9, 11, 15, 33.**

El Olivo en términos de alergología, es la especie más representativa de esta familia, debido a que en la literatura se encuentra ampliamente estudiada en Europa. De esta especie, se han reconocido Ole e 1 (Grupo 1 común de olivo de 16 kDa) que se involucra en el crecimiento del tubo polínico, Ole e 2 (profilina de 15 kDa) que funciona como proteína de unión a la actina del citoesqueleto, Ole e 3 (polcalcina de 9 kDa) que se une a calcio, Ole e 4 (32 kDa) sin función descrita, Ole e 5 (superóxido dismutasa de 16 kDa), Ole e 6 (10 kDa) sin función descrita, Ole e 7 (nsLTP de 9.5 kDa), Ole e 8 (polcalcina-like, 4 E-helix-loopF-helix / mano-EF de 21 kD), Ole e 9 (1,3 beta glucanasa de 46 kDa), Ole e 10 (dominio X8 que contiene proteína de 10.8 kDa), Ole e 11 (pectina metilesterasa de 37.4 kDa), Ole e 12 (isoflavona reductasa de 37 kDa), Ole e 13 (Taumatina reductasa de 23 kDa), Ole e 14 (poligaracturonasa de 46.5 kDa), y Ole e 15 (ciclofilina de 19 kDa) **46 - 48.**

2.3.1 FRAXINUS.

El Fresno contiene aproximadamente 65 especies, miembro de la familia *Oleaceae*. Se planta principalmente para el uso de su madera. Crece ampliamente en áreas de Europa Central y del Norte, la alergia a su polen tiene una distribución mundial. Es un árbol caducifolio que alcanza los 10-15 metros de altura, de tronco recto y corteza gris, finamente fisurada, con hojas opuestas, compuestas de 3 a 5 pares en forma lanceolada **34.** Con polinización en el norte de Europa en los meses de marzo a mayo, en España se reporta polinización de diciembre a febrero **7, 14;** En reportes del área metropolitana de la Ciudad de México, el Fresno florece principalmente entre los meses de noviembre a marzo **16.** Se considera que, de los pacientes alérgicos al polen, casi el 20-34% están sensibilizados al Fresno. La Fig. 10 muestra la distribución mundial del Fresno **9, 41, 45, 46, 49.**

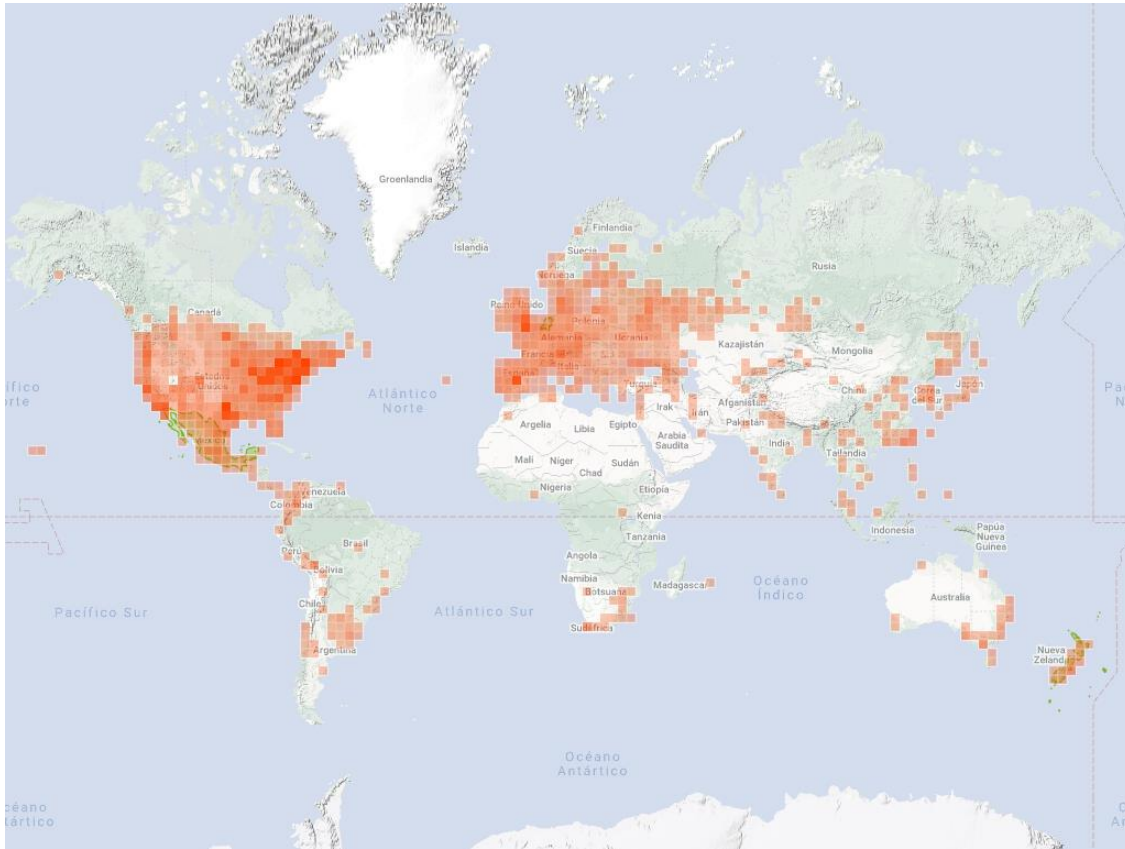


Fig. 10 Distribución mundial del género *Fraxinus*, basado en observaciones **50**.

Se ha descrito la violenta expulsión de proteínas resultante de la presión osmótica y la fuerte evaporación ambiental que conduce a una rápida dispersión atmosférica de partículas submicrónicas **14**.

Ya se han identificado previamente determinantes alergénicos de Fresno mediante el uso de un método duro basado en SDS-PAGE, entre ellos, se encuentran: Fra e 1 (Ole e 1-like), con una secuencia de identidad de 84-97% con Ole e 1. Es su determinante principal con peso molecular de 18-21 kDa, del que se han descrito hasta 15 isoformas debido a diferencias en sus glicosilaciones que le otorgan diferentes puntos isoeléctricos (pI) que oscilan entre 5 - 7; cuenta con los isoalérgenos Fra e 1.01 y Fra e 1.02, uno glicosilado y otro no glicosilado, con 20.1 y 17.5 kDa respectivamente **36, 46, 48, 51**.

Fra e 2, una profilina, panalérgeno con peso molecular de 13-16 kDa, con un pI entre 4 - 5.5. Fra e 3 es una polcalcina con motivos de unión al calcio y con peso molecular de 6-10 kDa, con pI de 4. Una proteína homóloga a Ole e 8, una proteína similar a la polcalcina 4 E-helix-loopF-helix / mano-EF de 20 kDa. La pectina esterasa, un alérgeno que comparte epítomos con el grupo 4 de pólenes de pastos, y malato deshidrogenasa **7, 41, 47, 49, 51**. Fra e 9, es una 1,3-beta-glucanasa, tipo de enzima ampliamente distribuida en plantas superiores, y comparte

epítomos inmunodominantes con Ole e 9 de 46 kDa, con similitud entre ellas del 39% **11, 14, 33**.

De igual forma se describen determinantes alergénicos de alto peso molecular, >30 kDa, positivos en más del 50% de las cohortes estudiadas, asociados a reactividades cruzadas con carbohidratos, de baja relevancia clínica, distribuidos en 4 áreas: dos no identificados, uno homólogo a β -galactosidasa, y uno identificado como proteína transportadora de azúcar **41, 47**.

Un estudio utilizó un método de extracción suave basado en PBS, con el que obtuvo la identificación de diversos alérgenos: un homólogo UTP-glucosa1-fosfato uridililtransferasa 51.8 kDa, una enzima citoplasmática llamada monodehidroascorbato reductasa de 46.5 kDa, pectinestera (Ole e 11.0102) de 39.6 kDa, adenosina quinasa 2 de 37.8 kDa, isopentenil-difosfato delta-isomerasa de 27 kDa, Dos proteínas con homología con Ole e 5 de 21.5 kDa: Os02g0778400 [de *Oryza sativa*], y una proteína no caracterizada de *Zea mays*; describen la identificación de una profilina (Fra e 2) de 21 kDa según lo expuesto **43**.

En general, la reactividad cruzada parece requerir más del 70 % de identidad de secuencia **7**. Se ha demostrado reactividad cruzada con especies relacionadas como el Olivo, con el que hay inhibición de inmunotransferencia con Fra e 1 y polcalcina; y en menor medida, con especies no relacionadas taxonómicamente (abedul, pasto Timothy, ambrosía), con los que hay inhibición de transferencia con sus profilinas y polcalcinas **7, 9, 41**.

La glicoproteína Ole e 1-like recombinante del Fresno (rFra e 1), ha sido clonada en *Escherichia coli* y producida en *Pichia pastoris*, posee un 91% de identidad con Lig v 1 **46**.

2.3.2 LIGUSTRUM.

El género *Ligustrum* contiene alrededor de 50 especies incluyendo *Ligustrum vulgare*, *L. lucidum*, *L. sinense.*, *L. japonicum*, *L. quihoui*, etc. *Ligustrum vulgaris* proviene de Asia **6, 11**. Habitualmente se planta por su uso ornamental. Son árboles caducifolios o perennifolios con hojas enteras, coriáceas, lanceoladas u ovaladas. Con flores pequeñas, blancas masculinas y femeninas. Con floración entre mayo y junio mediante polinización entomófila o anemófila. Crece predominantemente en áreas urbanas. En la Fig. 10 se muestra su distribución mundial **6, 7, 11**.



Figura 10. Distribución mundial de *Ligustrum vulgare* y *lucidum* **11**.

Se ha descrito la fragmentación de su polen resultante del choque osmótico durante tormentas eléctricas y en condiciones de elevada humedad **11**.

Hay registros de polinosis en el Mediterráneo, el sur de Asia, el Norte de Europa, en América del Norte, América del Sur, Sudáfrica y Australia. En 1992 Baldo *et. al.*, mediante el uso de métodos duros como detergente SDS, lograron identificar bandas de reconocimiento de IgE a proteínas del Trueno con un peso molecular aproximado de 18-19 kDa, 20 kDa, 40 kDa y 70 kDa. Con un rango proteico total con peso molecular entre 10 a 80 kDa **11, 52, 53**.

Su determinante alergénico principal es una Ole e 1-like, bajo la nomenclatura Lig v 1, una proteína glicosilada con peso molecular de 20.5 kDa, con una secuencia de identidad de 89% con Ole e 1; y una secuencia de identidad de 82-95% con las otras proteínas de la familia Ole e 1 pertenecientes a la familia *Oleaceae*, adicionalmente, dichos alérgenos tienen el mismo sitio de N-glicosilación en Asn-111. Cuenta con dos isoalérgenos, una variante glicosilada de 20 kDa y otra no glicosilada de 18.5 kDa, Lig v 1.0101 y Lig v 1.0102 respectivamente **7, 9, 10, 48, 52**.

Tiene una profilina identificada, bajo la nomenclatura Lig v 2, considerado como un panalérgeno, con un peso molecular de 14.8 kDa, implicada en la citocinesis **11, 33, 48**.

Otros determinantes alergénicos descritos son una enolasa, con un peso molecular de 37.38 kDa, con un 89% de homología con Hev b 9. Una β -1,3-glucanasa, que tiene homología del 100% con Fra e 9.01 y 9.02, posiblemente implicado en el crecimiento del tubo polínico. Poligaracturonasas, con peso de 43 kDa, con 88% de homología con Ole e 13.01, cataliza la

degradación del galacturonato polimérico, componente principal de la pectina en las paredes celulares de las plantas, también presente en otras especies no relacionadas como es el caso de la familia *Cupressaceae*. La alanina aminotransferasa, con 88% de homología con alérgenos del veneno de *Culex quinquefasciatus* (especie de mosquito). Y subunidades beta de la ATP sintasa, productoras de energía esencial para la planta, con la sugerencia de dos isoformas existentes en estudios previos con *L. lucidum* **11, 33**.

Se ha demostrado reactividad cruzada por inhibición de transferencia entre los componentes del polen del Olivo, el Fresno y el Trueno **7, 52, 54**.

La glicoproteína Ole e 1-like recombinante del Trueno (rLig v 1), ha sido clonada en *Escherichia coli*, presentó reactividad cruzada con Ole e 1, lo que sugiere que su reactividad no depende exclusivamente de los carbohidratos **10**.

2.4 HETEROGENEIDAD EN LA IDENTIFICACIÓN DE ALÉRGENOS.

En la primera mitad del siglo XX se sabía que el secreto del éxito terapéutico profiláctico consistía en la selección y preparación del alérgeno correcto, así como el método ideal para la preparación de extractos, siendo A. Coca quien describe el método más favorecedor de la época, mismo que fue adoptado por la mayoría de los alergólogos como la solución de Coca, dicha solución se basa en cloruro de sodio, bicarbonato de sodio y fenol, no cuenta con estudios adecuados que respalden su utilidad **39**.

Se han ejecutado diversos cribados proteómicos, de los cuales, dependiendo del método, se han observado diferencias en el rendimiento de la recuperación y cobertura de proteínas **5**. Dichos procesos se basan en la separación de los componentes proteicos al someterlos a fuerzas físicas e interacciones químicas que desnaturalizan a las proteínas, resultando en la identificación proteica, sin embargo, su desnaturalización conlleva a una reducción en su biodisponibilidad. La conservación de la estructura cuaternaria de los oligómeros de alérgenos influye en su alergenicidad al facilitar el entrecruzamiento del receptor de IgE, aumentando su estabilidad y protección contra proteólisis **1**. Adicionalmente, se ha observado que las conservaciones nativas de las proteínas de la fuente polínica originan maduración de células dendríticas, así como la polarización a Th2, como se ha observado en una comparativa entre proteínas recombinantes y proteínas nativas de Bet v 1, Phl p 5 y Amb a 1 en modelos in vivo **5, 13**.

Las partículas de polen son muy recalcitrantes, por lo que en la comunidad científica no se cuenta con un método universal para la proteómica del polen **1**.

La preparación de extractos proteicos de calidad es crítico para el éxito del análisis proteómico, dependiendo de las características de la fuente vegetal a estudiar se han ofrecido propuestas para su ejecución, por ejemplo, en el caso de especies con elevado contenido lipídico puede alterarse el efecto solvente de los detergentes sobre las proteínas, resultando

en un proceso deletéreo en la electroforesis, por lo que se han emitido propuestas que limiten este factor, como el aumentando de la dilución de las muestras, o mediante la delipidación química con disolventes orgánicos como cloroformo y acetona, opciones que comprometen el rendimiento de la cantidad proteica 55.

En las diversas metodologías empleadas por los investigadores, existen diferencias desde la cantidad de polen a estudiar, así como un espectro heterogéneo entre los tampones utilizados, diferentes mecanismos para la descomposición de la exina para la liberación proteica, variaciones en las técnicas de laboratorio, fluctuaciones en la temperatura, diferencias en los tiempos de centrifugación, entre otros. Un estudio prueba la eficacia de la liberación de proteína sin usar fracturación mecánica, haciendo una comparativa entre los buffer empleados, concluye que el tampón de hidróxido de sodio fue significativamente más eficiente en su rendimiento para la obtención proteica 56.

Según el método empleado, se obtienen diferencias en las proteínas alergénicas obtenidas, con heterogeneidad en el perfil proteico de los extractos solubles en agua y no solubles en agua, diferencias que pueden modificar la inmunorreactividad en los análisis 5, 57. Ya se ha reportado que el uso de una metodología con extracción en crudo de las proteínas basado en condiciones de lisis suaves en comparación con un método de extracción duro, tiene un mayor rendimiento en la adquisición de proteínas inmunorreactivas al IgE de pacientes sensibilizados 1. Los alérgenos responsables de la reacción alérgica de tipo inmediato se describen como proteínas solubles en agua que no dializan, por lo que se considera su extracción con soluciones acuosas 58.

La forma clásica para la identificación de candidatos a alérgenos consiste en la separación, identificación y caracterización de proteínas. Hasta el momento se han registrado 987 alérgenos diferentes, de ellos 195 son aerotransportados y de origen vegetal 13, 59, 60.

Para la caracterización de alérgenos del reino *Plantae*, es necesaria la obtención de las inflorescencias, la fuente polínica, su extracción proteica, su cuantificación, la realización de electroforesis bidimensional (2-DE), su tinción, un análisis de inmunotransferencia y finalmente un análisis comparativo con bancos de proteínas mediante espectrometría de masas, con la cual se puede dar una etiqueta e identificación de las proteínas en cuestión 61.

2.4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS PROTEÍNAS.

El principal objetivo de la extracción es adquirir el mejor rendimiento y calidad proteico, por lo que se debe elegir el método de extracción apropiado con base en el tipo de muestra 62.

Así mismo, de la finalidad, se puede buscar la preservación de la forma nativa de una proteína para determinar su actividad biológica, o estar desnaturalizada para el estudio de su estructura primaria. Las estrategias son diversas, sin embargo, la mayoría de ellas suelen ser modelos

que involucran métodos agresivos de extracción de proteínas recalcitrantes, en donde la solubilización de proteínas se logra con la ayuda de mecanismos físicos y químicos mediante el auxilio con detergentes **62 - 64**.

Para la extracción de proteínas existen métodos suaves (lisis osmótica, congelamiento, detergentes, enzimas) y métodos duros (sonicación/ultrasonido, homogeneización, mortero, molino de perlas, prensa francesa, pulverización con arena, choque osmótico, lisis enzimática, detergentes y solventes, tratamiento alcalino), en la Tabla 3 se exponen diferentes métodos de lisis celular, cuya finalidad es la extracción de proteínas intracelulares, dependiendo del tipo de tejido **62, 63 - 66**.

Tabla 3.		
MÉTODO	DESCRIPCIÓN	TIPO DE MUESTRA
Licuada	Trituración por cuchillas	Gran cantidad de tejido
Homogeneizador Dounce	Tubo de vidrio con pistón ajustado, moja células por acción de corte	Células tisulares, útil para protocolos de enriquecimiento de proteínas mitocondriales y nucleares
Homogeneizador de ultrasonidos/sonicación	Ondas de alta frecuencia emitidas por sonda para romper membranas celulares	Células de tejidos, bacterias
Pulverizador en nitrógeno líquido	Usando un mortero para pulverizar	Tejido animal y vegetal
Perlas de vidrio	Por agitación de perlas de vidrio con el material a estudiar	Levaduras

Para la dilución de las proteínas se requiere del uso de solventes orgánicos (metanol, acetona, fenol), agentes caotrópicos que refinan el efecto de los detergentes (urea y tiourea), detergentes (SDS, Tritón, Tween), o sales (Tris-HCL, acetato de amonio). Posteriormente mediante centrifugación se separan las impurezas de otros compuestos **62 - 66**.

Para la obtención de las proteínas intracelulares, es necesario lisar las células, en este proceso es imprescindible el uso de agentes que previenen la degradación proteica **63 - 66**. Algunos compuestos para prevenir la degradación son:

- Inhibidores de proteasas: PMSF, aprotinina.
- Agentes quelantes: EDTA, EGTA.
- Antioxidantes: mercaptoetanol, Ditioneitol (DTT).

- Amortiguador de pH adecuado en una relación 2-2.5 w/v.

A continuación, se enlistan las soluciones muestra empleados durante una electroforesis 2-DE, incluye detergentes suaves y duros **67**. Tabla 4.

Tabla 4.			
Componente o producto	Papel en la solución	Rango de concentración	Comentarios
Urea	Caotrópico	5-9.5 M	Presente durante isoelectroenfoco (IEF).
Tiourea	Caotrópico	2 M	Usualmente usado en combinación con urea 7 M, tiourea 2 M; más efectivo que la urea sola para solubilizar moléculas hidrofóbicas o proteínas de elevado peso molecular.
CHAPS	Detergente	1-4% (w/v)	Detergente zwitteriónico (ion dipolar) que puede mejorar solubilidad proteica con mínimo efecto disruptivo en 2-DE.
CHAPSO	Detergente	1-4% (w/v)	Detergente zwitteriónico similar a CHAPS.
NP-40	Detergente	0.5-1% (w/v)	Detergente neutral usado en 2-DE; ampliamente reemplazado por CHAPS.
Triton X-100	Detergente	0.5-1% (w/v)	Detergente neutral, similar a NP-40, también usado para la preparación de muestra para 2-DE.
SB 3-19	Detergente	1-2% (w/v)	Detergente zwitteriónico, en algunos casos mejor solubilizador que CHAPS; insoluble en elevadas concentraciones de urea y generalmente usado con urea 5 M, tiourea 2 M.
ASB-14	Detergente	1-2% (w/v)	Detergente zwitteriónico desarrollado como solubilizador de proteínas de membrana para analizarse en 2-DE.
ASB-C8 Θ	Detergente	1-2% (w/v)	
Duodecil sulfato de sodio (SDS)	Detergente	>2% (w/v) durante preparación de la muestra, no mayor a 0.2% (w/v) durante IEF	Detergente aniónico, ampliamente usado en preparaciones de muestra para electroforesis, útil para solubilizar proteínas; inactiva proteasas y otras enzimas indeseables. Incompatible en IEF, a menos que esté diluido a 0.2% o menos.
Dithiothreitol (DTT)	Reductor	20-60 mM	Reductor sulfhidrido mayoritariamente empleado para 2-DE.

B-Mercaptoetanol	Reductor	1-5% (v/v)	Reductor sulfhidrilo usado para 2-DE, debe usarse en concentraciones relativamente elevadas, puede causar perturbaciones en IEF, por lo que es raramente usado.
Tributilfosfina (TBP)	Reductor	2 mM	Reductor fosfina, efectivo a bajas concentraciones, mejora la solubilización de muestras recalcitrantes. Es poco soluble en agua y es inestable, por lo que se recomienda como único reductor en IEF.
Tris-carboxietilfosfina (TCEP)	Reductor	2-40 mM	Reductor fosfina que puede ser útil durante la preparación de las muestras, es altamente cargado, y no se recomienda como único reductor durante IEF.
Tris	Base	10-40 mM	Base sin buffer, usada en las preparaciones para elevar el pH a un rango donde la proteólisis es mínima y las proteínas son óptimamente solubles. Debe diluirse a 20 mM o menos para la IEF.
Anfolitos de BIO-Lyte	Acarreador de anfolitos	0.2-1.0% (w/v)	Acarreador de anfolitos, puede ser usado durante la preparación de muestra para mejorar la solubilidad proteica. También usado en IEF y tiras de IPG para optimizar la resolución. Usa pH de 3-10.

2.4.2 PRECIPITACIÓN PROTEICA.

La mayoría de los estudios de proteómica ejecutados en tejidos vegetales usan procedimientos de precipitación proteica con ácido tricloroacético (ATC) o acetona. Con el primero, se tiene un rendimiento intermedio respecto a la cantidad de proteína, por este método hay mayor precipitación de ADN. En el caso de la acetona, se tiende a precipitar lípidos con proteínas, es el método con menor rendimiento proteico **60, 61**.

Entre otros métodos, existen los métodos basados en fenol, que han demostrado mayor rendimiento en la extracción de glicoproteínas recalcitrantes y de macromoléculas contaminantes residuales no deseables, así como mayor extracción de pectinas que se unen a proteínas cargadas positivamente e interfieren con la migración durante la 2-DE **60**.

2.4.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA.

La cuantificación proteica sirve para monitorear los rendimientos y las pérdidas de proteínas durante los procedimientos de aislamiento y purificación de proteínas **68**.

Para la cuantificación de las proteínas totales existen los métodos de Bradford, BCA o de Lowry. Para su visualización es necesario el uso de tinciones especiales como Coomassie Brilliant Blue G-250, plata o rojo Ponceau/ acid red 112. Su clasificación se basa en las propiedades físicas, por medio de su punto isoeléctrico, tamaño y peso **69**.

El método de Bradford tiene una variedad de ventajas, entre ellas, es rápido y sencillo, sus reactivos son estables durante largos periodos de tiempo, el ensayo puede realizarse en microtitulación de 96 pocillos, el método es compatible con reactivos reductores (usados para estabilizar a las proteínas suspendidas en solución), también es compatible con bajas concentraciones de detergentes, puede automatizarse, puede detectar desde un 1 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. A la vez tiene desventajas, entre ellas, la unión del colorante depende del contenido de aminoácidos básicos que puede variar entre proteínas, hay interferencia con detergentes como SDS, por lo que el método es destructivo para las proteínas, es decir, una vez que la muestra de proteína ha reaccionado con el tinte, la proteína no puede usarse para otros ensayos **68**.

El ensayo de Bradford se basa en el cambio en la absorbancia máxima del colorante Coomassie, debido a la tinción proteica con colorante el azul brillante G en ácido fosfórico y metanol, dicha tinción genera un cambio en la absorbancia máxima entre 465 y 595 nm. Es originalmente marrón-rojo, se torna azul al unirse a proteínas. Cuando esto sucede pasa a una absorción máxima de rojo (470 nm), azul (590 nm), verde (650nm), esto sucede porque interactúan los ácidos sulfúricos de la tinción con los grupos amino de las proteínas de arginina, lisina e histidina, la Fig. 11 representa la absorbancia y el espectro del color respectivamente. La absorción es proporcional a la cantidad de proteína presente. El rango de concentración lineal es 0.1-1.4 mg/mL de proteína, usando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar. **68 - 71**.

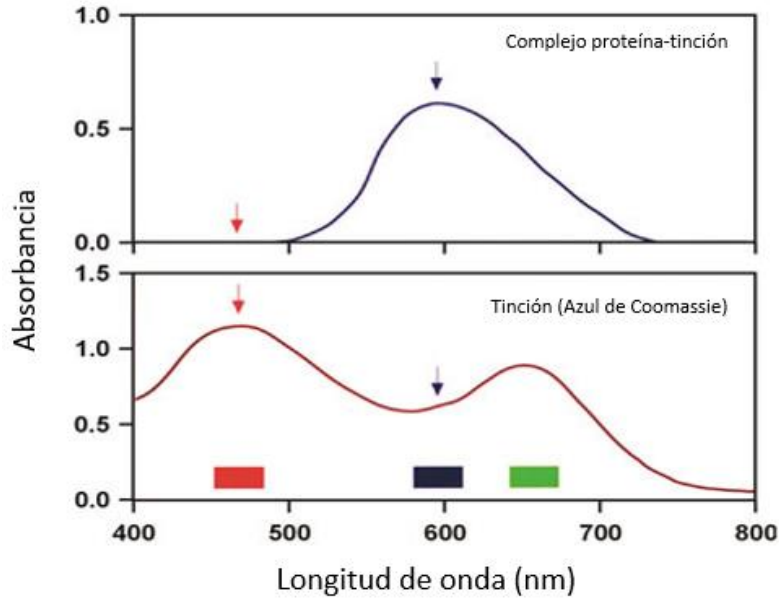


Figura 11. Espectros del complejo proteína – colorante y del colorante solo **70**.

En el proceso, se requiere de una curva estándar, la cual se logra usando BSA a diferentes diluciones, un “blanco” equivalente a 0 $\mu\text{g/mL}$, y las muestras en estudio **68, 69**.

Se mide la densidad óptica a 595 nm. Donde primero se mide la solución pura sin proteína en su contenido (0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Después se mide un estándar de concentración de BSA en diferentes concentraciones, lo que genera una curva lineal que aumenta de forma proporcional con la concentración de proteínas. Finalmente se mide la solución con proteína en estudio, con cálculos de extrapolación según la ecuación lineal de la curva de calibración y se emite una concentración de proteína (basado en la absorbancia con respecto a los controles estandarizados diluidos) en $\mu\text{g/mL}$ **68 - 70**.

2.4.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Es una técnica analítica que detecta la presencia de péptidos usando su masa y carga neta. Sólo puede analizar iones gaseosos, por lo que los péptidos en fase líquida deben someterse a ionización por electropulverización (ESI), bombeándose por una apertura de un μm con elevado voltaje de 2 a 4 kV, convirtiendo las moléculas neutras a iones cargados eléctricamente, con lo que se aceleran a través de placas eléctricas por una cámara, posteriormente entran en un campo magnético por el cual dependiendo de su masa tendrán una desviación de movilización, separándose según su relación masa/carga eléctrica (m/z), entre más masa, una menor desviación y viceversa; los iones son aislados por el cuadrupolo y fragmentados por colisión con gases inertes (N_2 , Él o Ar). Lo que provoca una ruptura de los enlaces de energía, obteniendo un espectro de fragmentación (MS/MS). Posteriormente es son analizados por medio de un software que identifica los múltiples péptidos, usando una comparación con una

"biblioteca de péptidos". Se puede graficar, en el eje de las x la masa/carga eléctrica (m/z), y en el eje de las y la intensidad relacionada con la cantidad/abundancia de los iones en porcentaje o intensidad relativa, Fig.12. **72 - 74.**

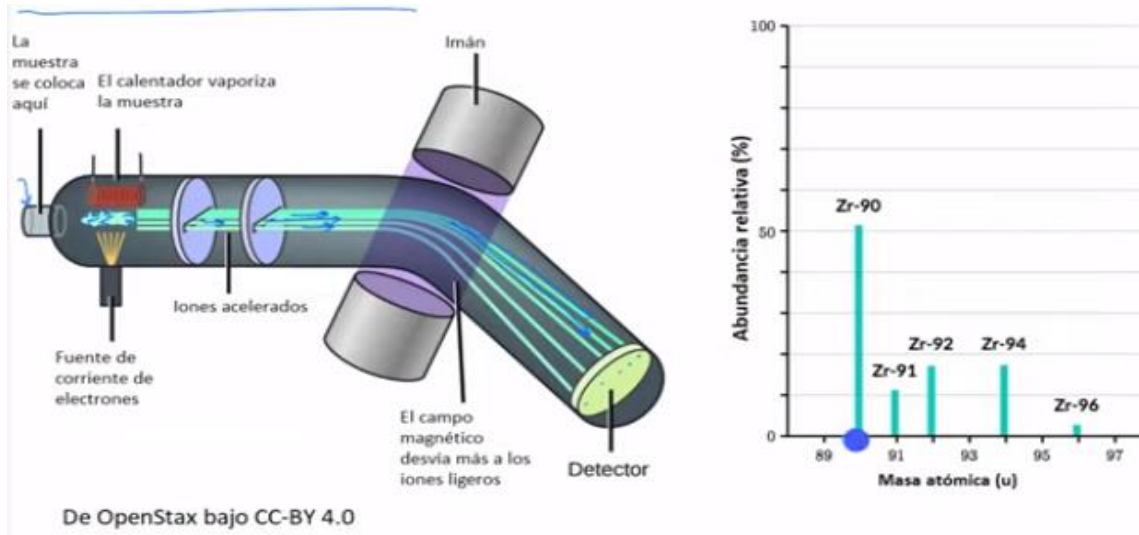


Figura 12. Esquemas representativos, se observa un espectrómetro de masas, con sus tres componentes fundamentales: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector. **73, 74.**

2.4.5 NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS.

La nomenclatura de los alérgenos se respalda por un subcomité de nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS). Definiendo como isoalérgenos de una especie única cuando se tiene 67% de identidad en la secuencia de aminoácidos, pero menos del 90%, identificándose en la nomenclatura como dos cifras adicionales precedidas por un punto. El banco de alérgenos respaldado por el subcomité de la OMS/IUIS se puede consultar en esta fuente www.allergen.org. Así mismo, existen bancos de datos de proteínas en general, como es el caso del banco de datos RCSB www.rcsb.org **36, 48.**

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existen diferentes enfoques metodológicos en la proteómica de los pólenes, ya sea para la extracción proteica, su cuantificación, la identificación en su calidad, así como la identificación de alérgenos. Dichas variaciones en las metodologías condicionan diferencias en la conservación de la estructura molecular de los oligómeros de alérgenos, e influyen en los resultados y su interpretación.

4. JUSTIFICACIÓN.

En la proteómica, no se ha logrado un protocolo único que logre captar la totalidad del proteoma, y aún menos que optimicen el rendimiento en la identificación de los alérgenos. En la comunidad científica no se cuenta con un método universal para la proteómica del polen. Sugerimos realizar un proceso comparativo entre diferentes métodos de extracción proteica con dos especies de polen clínicamente relevantes en la Ciudad de México como son *Fraxinus* (Fresno) y *Ligustrum lucidum* (Trueno).

5. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Este estudio fue diseñado para evaluar diferentes metodologías de extracción proteica en el polen de dos especies de árboles alergénicos y taxonómicamente relacionados en la Ciudad de México. Examinando los aspectos cuantitativos y cualitativos de los extractos.

Objetivos Específicos.

- Comparar la eficacia en la recuperación, cobertura y conservación de proteínas del polen mediante diferentes estrategias de extracción y aislamiento proteico.
- Lograr un flujo de trabajo que permita optimizar la obtención de determinantes alergénicos.
- Validar los determinantes alergénicos por medio de inmunorreactividad con suero de pacientes alérgicos.

6. HIPÓTESIS.

Existen diferencias en la cuantificación proteica, la calidad proteica, y la identificación de alérgenos entre diferentes métodos de extracción proteica dentro de una misma especie, homologando la cantidad de polen y buffer de rehidratación utilizados respectivamente.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

El protocolo B07-21 fue aprobado por los comités de investigación y ética humana del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 1983) y fue consistente con las Guías de Buena Práctica Clínica. En la Fig. 13 se describe de manera global los pasos de nuestra metodología.

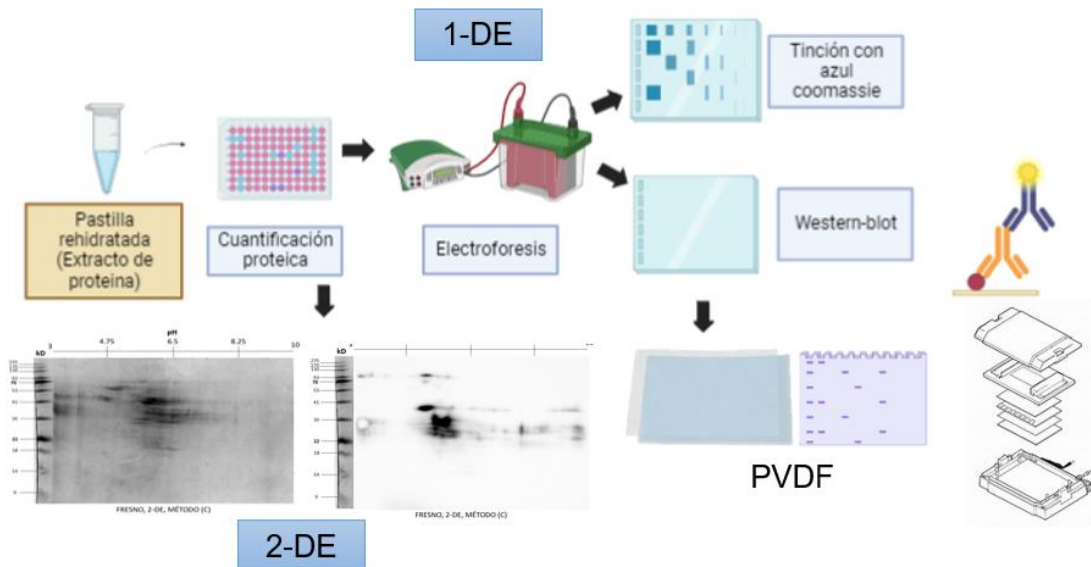


Figura 13. Los extractos obtenidos de metodologías diferentes de extracción proteica de Fresno y Trueno fueron cuantificados, posteriormente se corrieron electroforesis unidimensionales y bidimensionales por duplicado para su tinción y realización de Western-blot respectivamente.

7.1 UNIVERSO DE ESTUDIO.

La población fue reclutada de la clínica de alergia ambulatoria para la ejecución de nuestro estudio, resultó en un total de 11 de pacientes, con edades entre 23 a 36 años, con una edad promedio de 28.9 años, 3 mujeres, 8 hombres. En ellos, se realizó la prueba cutánea por punción (SPT) para la determinación de sensibilidad, para ello, ninguno de los pacientes estaba tomando antihistamínicos, corticosteroides o inmunoterapia en el momento del estudio. De igual forma se realizó un interrogatorio para determinar si los pacientes contaban con antecedentes de síntomas sugerentes de patología alérgica.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CONTROLES Y DE ESTUDIO.

Las pruebas cutáneas se realizaron con un panel de 48 alérgenos (ALK), entre los que se incluyeron acaro, cucaracha, epitelios, arboles, malezas y pastos. Aplicadas en el antebrazo de los sujetos y se pinchó la piel con una lanceta. Se consideró una prueba de punción cutánea positiva a aquella roncha ≥ 3 mm a los 20 minutos respecto al control negativo (solución salina).

De los 11 pacientes reclutados, tres sujetos (6, 8, 9) se catalogaron como controles por historia clínica no compatible con enfermedad alérgica, así como SPT negativas. Cuatro pacientes fueron incluidos en nuestro estudio como pacientes alérgicos por historia clínica compatible con polinosis y con co-sensibilización a Fresno y Trueno (2, 3, 4, 10). Los demás pacientes fueron descartados del estudio al no ser sensibles al polen de interés (1, 5, 7, 11). (Tabla 5).

TABLA 5

Px	Edad	Sexo	Alérgenos positivos en pruebas cutáneas (SPT)	Cuadro clínico alérgico
1	23	F	<i>Liquidambar styraciflua, Schinus molle, Eucalyptus sp, Atriplex wrightii</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica
2	34	M	<i>Medicago sativa, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Cupressus arizonica, Alnus verrucosa, Populus tremuloides, Juniperus californica, Ligustrum vulgare, Eucalyptus sp, Quercus alba, Olea europeae, Acacia, Morus rubra, Artemisa tridentata, ambrosia trifida, Salsola kali, Amaranthus palmeri, Diente de leon, Atriplex wrightii, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Quercus rubra</i>	Rinitis alérgica Dermatitis por contacto alérgica (<i>Cannabis Sativa</i>)
3	24	M	<i>Dermatophagoides pteronyssinus, cucaracha, perro, conejo, Zea mays, Triticum aestivum, Medicago sativa, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Ligustrum vulgare, Cupressus arizonica, Alnus verrucosa, Schinus molle, Juniperus californica, Eucalyptus, Quercus alba, Olea europeae, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Salsola kali, Amaranthus palmeri, Taraxacum officinale, Atriplex wrightii, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Ulmus americana, Carya ovate, Quercus rubra, Acer negundo, Populus deltoides.</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica Asma
4	35	M	<i>Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, cucaracha, pelo de gato, Zea mays, Triticum aestivum, Prosopis sp, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Juniperus virginiana, Ligustrum vulgare, Cupressus arizonica, Populus alba, Eucalyptus sp, Olea europeae, Acacia sp, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Platanus occidentalis</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica
5	23	M	cucaracha, perro, pelo de gato, <i>Medicago sativa, liquidambar, juniperus virginiana, alnus verrucosa, Olea europeae, Fraxinus excelsior</i> , malezas mix	Rinitis alérgica.
6	36	M	-	Rinitis no alérgica
7	25	F	<i>Medicago sativa, mezquite, Populus alba, Casuarina sp, Liquidambar styraciflua, Alnus verrucosa, Schinus molle, Juniperus californica, Eucalyptus sp, Quercus alba, Olea europeae, Morus rubra, Artemisa tridentata, Ambrosia trifida, Salsola kali, Taraxacum officinale, Atriplex wrightii, Fraxinus Excelsior Betula verrucosa, Olmo, nogal, Quercus rubra, Platanus Occidentalis, Hacer negundo, Populus deltoides</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica Asma
8	31	M	-	-
9	29	F	-	Rinitis no Alérgica
10	31	M	<i>Liquidambar styraciflua, Artemisa tridentata, Betula verrucosa, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa.</i>	Dermatitis atópica.
11	27	M	pelo de gato, <i>Medicago sativa, Prosopis sp, Populus alba, Casuarina sp, Olea europea, Fraxinus excelsior, Betula verrucosa, Carya ovate, Acer negundo.</i>	Conjuntivitis alérgica Rinitis alérgica

7.3 TOMA DE MUESTRA DE PACIENTES.

Se recolectaron un total de 11 muestras sanguíneas. Se permitió la coagulación en un lapso de 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C). Posteriormente se centrifugaron a 1,600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de reducir la contaminación con plaquetas. Se recuperó el sobrenadante correspondiente al suero, se depositó en tubos separadores de suero sin aditivos. Se usaron alícuotas de pacientes con SPT positivas a Fresno y Trueno, preparadas en un pool de suero y, que se almacenó a -80°C para su posterior uso en la inmunodetección mediante Western-blot, en la Fig. 14 se representa un diagrama de flujo de la metodología para la adquisición de suero de pacientes **75, 76**.

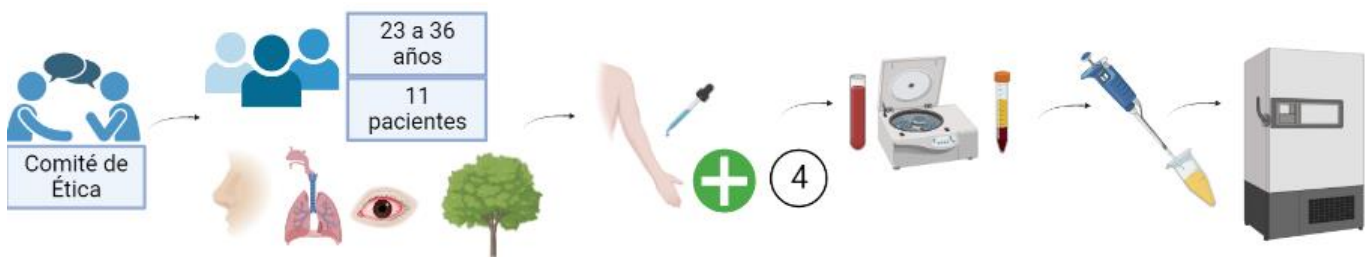


Figura 14. Diagrama de flujo para la obtención de suero de pacientes con clínica compatible con polinosis por Fresno y Trueno, con pruebas cutáneas positivas a extractos de dichas especies, con posterior obtención de muestra sanguínea, su centrifugación y resguardo del suero en congelación.

7.4 ADQUISICIÓN Y PREPARACIÓN DEL POLEN.

Se colectaron 68 muestras de inflorescencias recientes de las especies *Fraxinus uhdei* y *Ligustrum lucidum*, de la familia Oleaceae, en la Ciudad de México. Se dejaron secar a temperatura ambiente. Se obtuvieron las anteras pasándolas por un tamiz normal, y se separaron los granos de polen con un tamiz de prueba estándar USA (150 µm), Fig. 15.

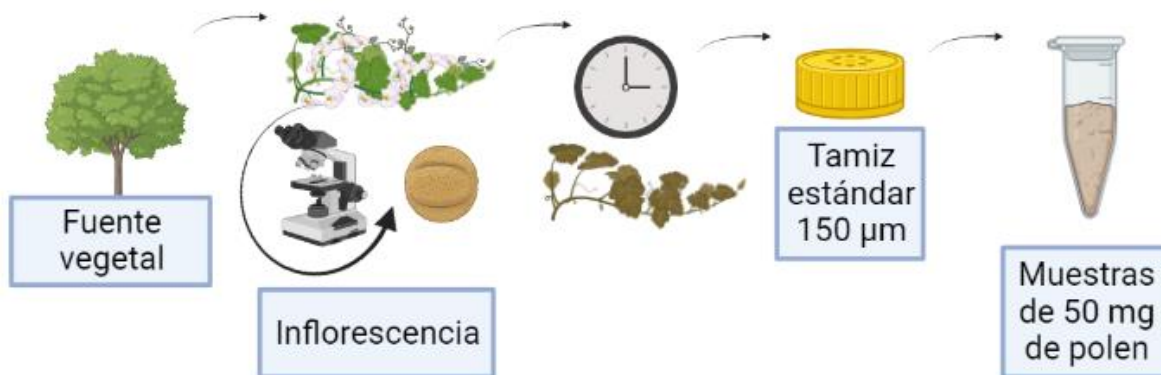


Figura 15. Diagrama de flujo realizado para la obtención de muestra de polen, se realizaron recolecciones de inflorescencias de Fresno y Trueno en la Ciudad de México, se prepararon 50 mg de polen en tubos Eppendorf.

En el caso de *Fraxinus uhdei*, se utilizó una mezcla de polen colectada con anterioridad, obtenida de diversos especímenes de la misma especie, distribuidos en la Ciudad de México.

En el caso de *Ligustrum lucidum*, se obtuvo de un banco de polen colectado en la Ciudad de México, se hizo una mezcla del polen con mayor inmunorreactividad, esto se logró tras realizar una extracción proteica según BIO-RAD por lisis celular de plantas, con la aplicación de un Western-blot y su inmunodetección mediante el software ImageJ, seleccionando las quince muestras con mayor rastreo de las 68 colectadas originalmente, con lo que se procedió con el estudio.

7.5 METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN PROTEICA.

Se analizaron diferentes métodos de extracción, todos por duplicado, se homogenizó la cantidad de polen a trabajar en 50mg para Fresno y Trueno.

Los buffer de extracción emplean las siguientes soluciones, cuyas propiedades facultan la preservación de las proteínas, así como su solvencia: el SDS es un detergente aniónico que solubiliza las proteínas e inactiva proteasas, el 2 mercapto-etanol (ME) es un antioxidante que previene la degradación, Tris-HCl es una base que aumenta el pH a un rango donde la proteólisis es mínima y las proteínas son óptimamente solubles, Triton X100 es un detergente suave que no desnaturaliza, EDTA es un quelante que previene la degradación, el fenol es un solvente orgánico, DTT es un reductor sulfhidrilo, los inhibidores de proteasas 1x inhiben enzimas, el fosfato salino tamponado (PBS) es un buffer suave de liberación proteica sin fracturación, ácido tricloroacético ATC 20% en acetona que precipita proteínas, y NaCl regula la molaridad en la solución 5, 56, 60, 61, 63-67.

El método de extracción proteica con buffer de extracción SDS, compuesto por SDS al 20%, ME, y Tris-HCL, definido por la letra **(A)** Tabla 6 40.

El método por calentamiento utiliza como buffer de extracción una solución compuesta por Tris-HCL 1M, Triton X100, EDTA 500mM e inhibidores de proteasa, definido por la letra **(B)** Tabla 7 52.

El método por homogenizador utiliza un buffer de extracción idéntico al método B, se adiciona un mecanismo físico de ruptura polínica, definido por la letra **(C)** Tabla 8 77.

El método por fenol definido por la letra **(D)** Tabla 9 33, 78. Su buffer de extracción es fenol equilibrado, y Tritón X100. Al trabajarse con Trueno, en donde se conservó el sobrenadante después de exponer el polen con el buffer de fenol equilibrado y terminar con el proceso, se obtuvo una pastilla muy pequeña, corroborándose tras realizarse por triplicado, por lo que procedimos a unir las tres pastillas en una sola, definido como **(D°)**. Por lo referido, decidimos excluir el sobrenadante y conservar los pólenes de que estuvieron expuestos con fenol equilibrado, y procedimos en tratar al polen con el buffer de extracción por método de lisis celular de BIO-RAD, al estar más familiarizados con dicho método en nuestro laboratorio, definido como **(D^m)**.

El método de proteoma soluble en agua mediante condiciones de lisis suaves, utiliza PBS y Triton X100, definido por la letra **(E)** Tabla 10 5.

El método BIO-RAD extracción proteica por lisis celular de plantas, utiliza en su buffer DTT 1M y ATC al 20%, definido por la letra **(F)** Tabla 11 67.

Para la precipitación se emplearon cuatro volúmenes de ATC al 20% en acetona fría. Los lavados se realizaron con acetona fría al 100%, con la finalidad de remover los pigmentos, generar un descenso en la polaridad del disolvente y una indirecta deshidratación el soluto suspendido, provocando su agregación y precipitación, solubilizando las proteínas 60, 61.

La centrifugación tuvo por finalidad obtener las proteínas solubles. Para el secado, se usó un desecador de aire seco y vacío, hasta la formación de un gránulo (polvo de acetona seca).

Como buffer de rehidratación, se empleó una solución compuesta por: Urea 7M y Tiourea 2M (agentes caotrópicos-optimiza el efecto disolvente), CHAPS 2% (detergente dipolar que mejora la solubilidad proteica con mínimo efecto disruptivo en 2-DE), e inhibidores de proteasa (inhibición de enzimas para la preservación proteica) 63 - 67. La Fig. 16 muestra un diagrama de flujo que ejemplifica en general el desarrollo de los métodos empleados en este estudio.

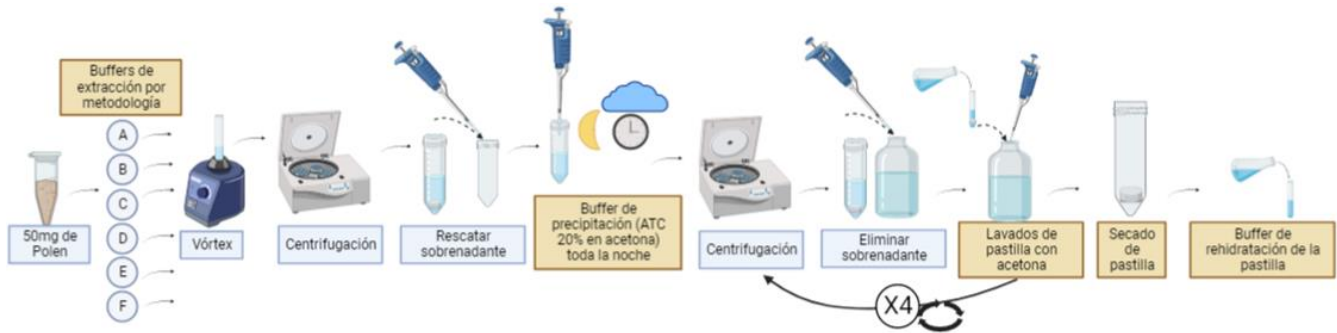


Figura 16. Para cada especie, se aplicaron diferentes métodos de extracción, se homogeniza el proceso al mezclar y centrifugar, con posterior rescate del sobrenadante, la aplicación de un buffer de precipitación por toda la noche, su centrifugación, eliminación de sobrenadante y formación de pastilla, misma que se rehidrata para su uso subsecuente.

7.5.1 FLUJO DE TRABAJO DE LAS METODOLOGÍAS.

Tabla 6.

Método Por método de extracción con buffer SDS (A)	50 mg de polen	BUFFER DE EXTRACCIÓN N	PRECIPITACIÓN				LAVADO	SECADO	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Poner en tubo Falcon de 15mL - Poner en 3 mL de Buffer SDS sacarosa (y fenol)	Pasar a Baño de sonicación por 480s, después - Agitar en vórtex por 3min y 3min en hielo 2x - Hacer 6 veces	Agregar 3 mL de Fenol equilibrado (con Tris-HCL 10 Mm)	Agitar en vórtex por 3 min - Centrifugar 25 min a 3900 g a 4°C	Recuperar la fase fenólica en tubos nuevos - Agregar 4 volúmenes de tricloroacético al 20% en acetona * - Mezclar suavemente y dejar toda la noche a -20°C	Centrifugar 20 min a 3900 x g a 4°C - Desechar sobrenadante y recuperar el sedimento en tubos de 15mL	Lavar con acetona fría y con acetona 4 mL al 100%, Una vez - Centrifugar 5 min a 3900 x g a 4°C y desechar sobrenadante - Repetir con 1 mL de acetona 4x, centrifugado y descarte de sobrenadante en cada lavado.	Y Secar a temperatura ambiente. - O secar en miVac por 5 min - Conservar a -80°C hasta su uso	Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa: 200µl - Sonificar por 480s 6x Dejar hidratando toda la noche a 4°C - Sonificar por 480s 6x y centrifugar antes de cuantificar - Almacenar a -80°C hasta su uso o cuantificación de proteínas.

Tabla 7.							
POR CALENTAMIENTO (B)	50 mg de polen	BUFFER DE EXTRACCIÓN	PROCESO		BUFFER DE PRECIPITACIÓN	SECADO	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)
		1	2	3	4	5	6
		Poner en un tubo Eppendorf de 1.5 mL - Poner 1mL de BUUFER DE EXTRACCION PARA METODO B Y C: (Tris-HCL 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 2Mm, Triton X1000 0.5%, Inhibidor de proteasa 1x)	Vortex de agitación para homogenizar - Realizar un agujero con una aguja en tapa para evitar explosión - Colocar en el Thermomixer Y Calentar a 95°C por 5 min a 800rpm - Pasar a hielo	Centrifugar a 11,000 rpm a 4°C por 5 min - Pasar sobrenadante a nuevo tubo	Agregar 4 volúmenes de tricloroacético al 20% en acetona - Dejar a -20°C toda la noche Centrifugar 20 min a 3900 x g a 4°C y Eliminar sobrenadante - La pastilla que se formó pasarla a tubo de 15mL. Y Lavarla con 4mL de acetona fría al 100% Volver a centrifugar Y eliminar sobrenadante. - Lavar con acetona fría 4x, esta vez con 1 mL y repetir centrifugación y descarte de sobrenadante en cada lavado.	Dejar secar la pastilla por unos 10-15min al vacío a temperatura ambiente	Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa:200µl - Sonificar por 480s 6x Dejar hidratando toda la noche a 4°C - Sonificar por 480s 6x y centrifugar antes de cuantificar - Almacenar a -80°C hasta su uso o cuantificación de proteínas.

Tabla 8.							
POR HOMOGENIZADOR (C)	50 mg de polen	BUFFER DE EXTRACCIÓN	PROCESO		BUFFER DE PRECIPITACIÓN	SECADO	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)
		1	2	3	4	5	6
		Poner en un tubo Eppendorf de 1.5 mL - Poner 500 µl de BUUFER DE EXTRACCION PARA METODO B Y C: (Tris-HCL 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 2Mm, Triton X1000 0.5%, Inhibidor de proteasa 1x)	Colocar en un homogenizador de 5mL pre-enfriado. Y agregar otros 500 µl DE BUFFER DE EXTRACCION. - Dar golpes procurando no hacer tanta espuma	Pasar muestra a un tubo Eppendorf nuevo - Centrifugar a 11,000 rpm a 4°C por 5 min - Pasar sobrenadante a tubo nuevo	Agregar 4 volúmenes de tricloroacético al 20% en acetona - Dejar a -20°C toda la noche - Centrifugar a 3900 x g a 4°C por 25 min Y Eliminar sobrenadante - La pastilla que se formó lavarla 4 veces con acetona fría para eliminar los pigmentos - Volver a centrifugar en caso de que se desprenda la pastilla del fondo	Dejar secar la pastilla por unos 10-15min al vacío a temperatura ambiente	Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa: 200µl - Sonificar por 480s 6x Dejar hidratando toda la noche a 4°C - Sonificar por 480s 6x y centrifugar antes de cuantificar - Almacenar a -80°C hasta su uso o cuantificación de proteínas.

Tabla 9.

		BUFFER DE EXTRACCIÓN	PROCESO Y PRECIPITACIÓN		LAVADO	SECAR	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)
POR FENOL (D°)	50 mg de polen	1	2	3	4	5	6
			Poner en un tubo Eppendorf de 1.5 mL - Poner 1 mL de Buffer de fenol equilibrado - Mezclar a temperatura ambiente por 5 min	Centrifugar a 11, 000 rpm a 4°C por 5 min - Pasar sobrenadante a un tubo falcon de 15mL nuevo -	Conservar el polen que se encuentra en el fondo tras centrifugación** - Agregar 4 volúmenes de tricloroacético al 20% en acetona a sobrenadante rescatado y a polen decantado tras centrifugación - Dejar a -20°C toda la noche	- Centrifugar a 3900 x g a 4°C por 20 min Y Eliminar sobrenadante - La pastilla que se formó lavarla 4 veces con 800 µl de acetona fría para eliminar los pigmentos - Volver a centrifugar en caso de que se desprenda la pastilla del fondo	Dejar secar la pastilla por unos 10-15min al vacío a temperatura ambiente

Del **D°**, tras rescatar el sobrenadante después de su exposición con buffer de fenol equilibrado y la precipitación con ACT al 20%, se obtuvo una pastilla pequeña, por lo que se hizo por triplicado para Trueno, uniéndolas en una pastilla. Procedimos con lavados con 1 mL de acetona fría en cuatro ocasiones. Su rehidratación se hizo con buffer de rehidratación.

Se hizo una modificación (D^m**), al conservar el polen que estuvo expuesto con fenol equilibrado, con posterior aplicación de buffer de precipitación ATC al 20% y lavados con acetona fría, después se centrifugó a 13,500 rpm a -10°C por 15 min eliminando el sobrenadante. Se agregó 1 mL de solución de extracción (ATC al 20% con DTT al 0.2%) y se dejó incubando por 1 hora. Descartando el sobrenadante tras una centrifugación a 13,500 rpm a -10°C por 15 min. Posteriormente se lavó con 1 mL solución de acetona 100% hasta aclaramiento. Se secó al vacío y se agregó buffer de rehidratación.

Tabla 10.

Método de proteoma soluble en agua, mediante preparación del polen con condiciones de lisis suaves PBS (E)	50 mg de polen	BUFFER DE EXTRACCIÓN	PROCESO		BUFFER DE PRECIPITACIÓN Y LAVADO	SECAR	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)
		1	2	3	4	5	6
		Poner en un tubo Falcon de 15 mL - Agregar 3 mL de Buffer PBS con 0.1% Triton X-100 - Mezclar toda la noche a temperatura ambiente	Centrifugar 3900 g a 4°C por 20 min -	Pasar sobrenadante a tubo nuevo	Agregar 4 volúmenes de tricloroacético al 20% en acetona - Dejar a -20°C toda la noche - Centrifugar a 3900 x g a 4°C por 20 min Y Eliminar sobrenadante - La pastilla que se formó lavarla 4 veces con 800 µl de acetona fría para eliminar los pigmentos - Volver a centrifugar en caso de que se desprenda la pastilla del fondo	Dejar secar la pastilla por unos 10-15min al vacío a temperatura ambiente	Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa:200µl - Sonificar por 480s 6x Dejar hidratando toda la noche a 4°C - Sonificar por 480s 6x y centrifugar antes de cuantificar - Almacenar a -80°C hasta su uso o cuantificación de proteínas.

Tabla 11.

POR BIO-RAD EXTRACCION PROTEICA POR LISIS CELULAR EN PLANTAS (F)	50 mg de polen	BUFFER DE EXTRACCIÓN	LAVADO		PROCESO	SECADO	BUFFER DE REHIDRATACIÓN (BH)
		1	2	3	4	5	6
		Poner en tubo Eppendorf 1.5mL - Poner en 1 mL de solución de extracción (ATC al 20% con DTT al 0.2%) - Dejar incubando por una hr a -20°C, remover solución ocasionalmente.	Centrifugar a 13,500 rpm a -10°C por 15 min - Descarta el sobrenadante - Agregar 1mL solución de lavado (acetona 100%), - centrifugar	Repetir el paso 2 hasta que la solución se torne de oscura a color verde claro - Centrifugar a 13,500 rpm a -10°C por 15 min - Remuevo sobrenadante	Obtenemos pastilla	Tapar con parafilm envolvente y colocar 5-6 agujeros - Colocar en un desecador y aplicar vacío hasta que se seque la pastilla - Dejar secar la pastilla por unos 10-15min al vacío a temperatura ambiente	Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa: 200µl - - Sonificar por 480s 6x Dejar hidratando toda la noche a 4°C - Sonificar por 480s 6x y centrifugar antes de cuantificar - Almacenar a -80°C hasta su uso o cuantificación de proteínas.

7.6 VERIFICACIÓN DE LISIS DE LOS GRANOS DE POLEN.

Posterior a la extracción, el polen se dejó secar a temperatura ambiente en tubos Eppendorf y resuspendido en PBS, se homogenizó con el uso de un vórtex por 5 minutos y se colocó una gota sobre un portaobjetos para su tinción. Se empleó una solución de Caberla que usa fucsina para teñir de forma permanente la exina del grano, impartiendo un color rosa a rojo. La fucsina ácida es un colorante aniónico que reacciona a la carga positiva de las proteínas 4, 17. Se coloca un cubreobjetos y se dejaron en tinción toda la noche. Al día siguiente se visualiza mediante microscopía óptica Fig. 17.

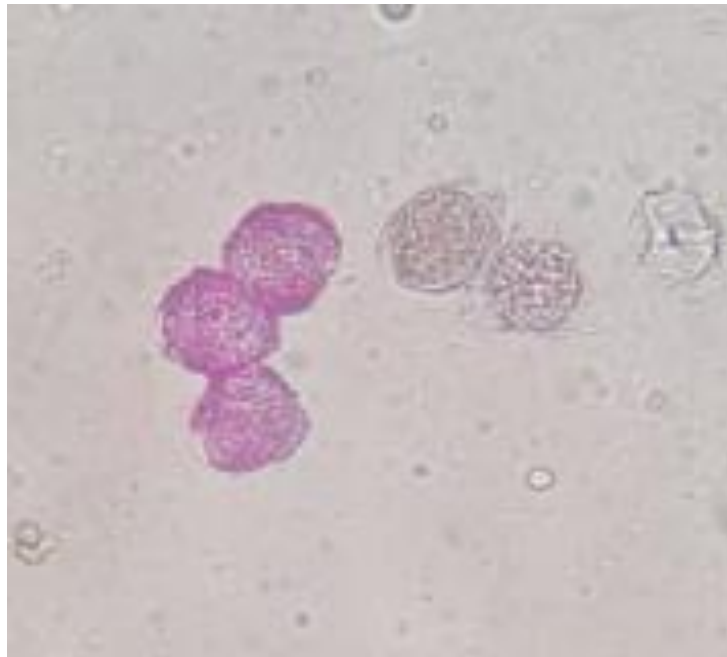


Figura 17. Granos de *Ligustrum* con estructura conservada, observados a un aumento 40x tras la tinción con Fucsina, comparado con granos no teñidos.

Se realizaron 8 observaciones a un aumento de 40x por campo para cada metodología de extracción empleada. Se realizó un recuento de los granos de polen roto, considerando como 100% la totalidad de los granos observados por campo. Finalmente se calculó un promedio de los porcentajes emitidos por cada observación.

Definimos como polen roto o destruido a los granos que presentaron una franca disrupción de su exina, así como la salida parcial o total de su citoplasma, la Fig. 18 muestra granos de polen destruidos.

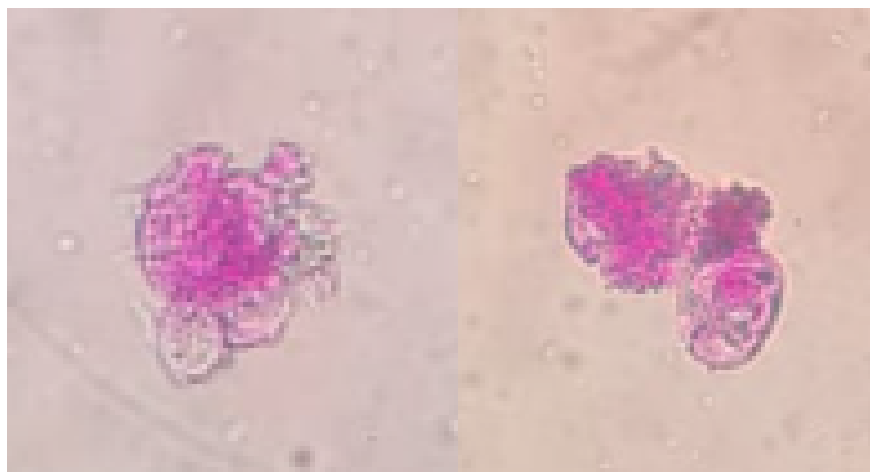


Figura 18. Granos de *Ligustrum* rotos, observados a un aumento 40x.

7.7 CUANTIFICACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS.

Tras la obtención del extracto proteico por los 6 métodos ya descritos, se procedió a la cuantificación proteica. Para esta finalidad, nuestro estudio se basa en el método de Bradford Coomassie blue G-250, con el cual fue compatible **68 - 70**. La metodología se basó según la ficha técnica mediante Bradford **71**. En la Tabla 12 se muestra la preparación de los viales para la realización de la curva estándar. En la Fig. 19 se expone la curva obtenida.

PROCESO:

Preparación de la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA), concentraciones de 0.1-1.4 mg/mL, rango en el que es confiable la determinación de la absorbancia para la cuantificación proteica:

Tabla 12.			
Viales	Diluyente (μl)	BSA (μl)	Concentración final (mg/mL)
A	0	300	2
B	150	350 de A	1.4
C	200	200 de A	1
D	200	200 de B	0.70
E	200	200 de C	0.5
F	200	200 de E	0.250
G	200	200 de F	0.125
H	200	0	0 "Blanco"

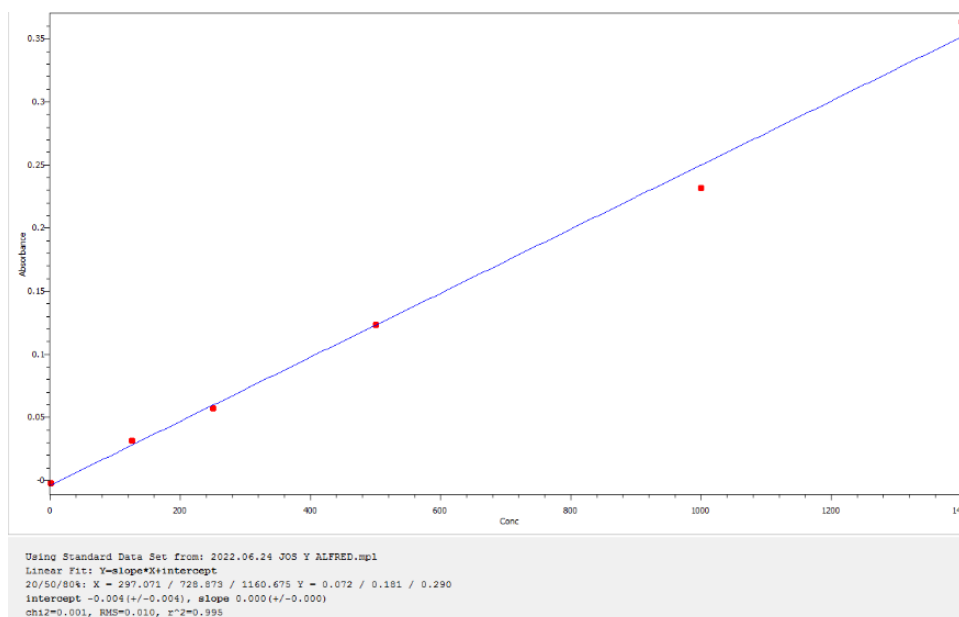


Figura 19. Curva estándar que se obtuvo al correr absorbancia a 595 nm, con $r^2=0.995$.

El protocolo utilizado fue el ensayo de placas de pocillos, a temperatura ambiente. Usando $5\mu\text{l}$ de muestra de proteína, proteína estándar y muestra blanco. Posteriormente se agregaron $250\mu\text{l}$ del reagente de Bradford en cada pocillo, se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente, después se pasó a un agitador por 30 segundos y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm, siendo necesaria la lectura antes de 60 minutos, tiempo en el que es estable el complejo proteína-tinción.

En este estudio intentamos correr la cuantificación de muestra por BCA, protocolo basado según lo descrito por la ficha técnica **79**, sin embargo, encontramos que no hay compatibilidad con el Buffer de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% con inhibidores de proteasa), debido a la presencia del grupo sulfuro contenido en la Tiourea, verificado al descartar Tiourea en una nueva reconstitución de buffer de rehidratación.

7.8 ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 13%.

Se corre electroforesis en gel de poliacrilamida al 13%, en un extremo tiene pozos donde se colocaron las proteínas o moléculas a separar. Se sumergió en un Buffer de corrida (agua con sal/solución tamponada) que mantiene el pH en un rango, conservando estable la carga eléctrica. Se aplicó una carga eléctrica mediante electrodos en todo el sistema, gracias a ello se dio lugar a la migración proteica independientemente de su longitud, el gel funcionó como una malla/filtro, entre más migraron las moléculas, fueron más pequeñas, y entre menor migración, mayor longitud; A mayor concentración del gel, poros más estrechos. De modo que sirve para conocer el tamaño relativo de los fragmentos. Para una medición más precisa, se corrió una solución estandarizada comercial (BLUEstain Protein Ladder) por una de las

columnas del gel de agarosa, de esta solución estándar ya se conocen los kDa correspondientes. Para nuestro proyecto, se usaron geles al 13%. Su preparación se basa en las guías técnicas **59, 80 - 84**.

Para la preparación de los geles, se colocaron por pares las bases de vidrio en los soportes con clips Bio-Rad, en el espacio que existe entre los dos cristales se vertió la solución del gel revelador, tras su gelificación, se vertió el gel concentrador, y finalmente se colocaron los moldes para la formación de 10 pocillos de 1mm.

Se realizó por duplicado la electroforesis, con la finalidad de tener un gel analítico para teñir y un gel preparativo para la inmunotransferencia.

Ya preparados los geles para electroforesis SDS-PAGE 1-D **80**, procedimos a la preparación proteica para su carga en cada pocillo de los geles, se consideró como rango homogéneo cargar a 20 µg, procurando respetar la capacidad volumétrica del pocillo a volumen máximo de 37.5 µl. Considerando que el pocillo originalmente tiene una capacidad de 44 µl, por lo que se dejó un margen libre de 2.5 µl con la finalidad de tener un margen de trabajo. Se trabajó con el estándar BLUEstain Protein Ladder **85**.

En algunos casos fue necesario que se cargara basado en 30 µl de volumen y no basado en la concentración proteica, pues las soluciones de extractos proteicos resultantes fueron más diluidas que entre los demás métodos. En el caso de Fresno, con el método B, basado en una carga de 30 µl de volumen, se obtuvo una concentración proteica de 5.6µg. Para el método D° basado en una carga de volumen similar se cargaron 11 µg de proteína.

En el caso del Trueno, los métodos en los que se tuvo que cargar basado en un volumen de 30 µl, se obtuvo una cantidad proteica para el método A de 14.5 µg, para el método B una concentración de 3.3 µg, para el método D° una carga de 1.6 µg, y para el método E 15.6 µg de proteína.

Para la preparación de los extractos proteicos de cada metodología, se adicionó buffer Laemmli al 1x, el cual tuvo por intención llevar a condiciones reductoras a las proteínas, el glicerol que contiene provocó que las proteínas fueran más densas, para que, al momento de la carga en el pozo, precipitaran. El Tris – HCL base es un buffer con el que aumentó el pH en donde la proteólisis es mínima y las proteínas son óptimamente solubles **67, 82**.

En las Tablas 13 y 14, se exponen los procesos empleados en la preparación de los extractos proteicos para cada metodología, tanto para Fresno y Trueno respectivamente.

Tabla 13. PREPARACIÓN DE EXTRACTO PARA CARGA DE FRESNO				
MÉTODO	Volumen (µl) necesario para cargar 20 µg	Basado en vol. µg en 30 µl	Volumen buffer Laemmli 1X	Volumen PBS para llevar VT a 37.5 µl
Estándar	5 µl			
A	14 µl		3.5 µl	20 µl
B		5.6 µg	7.5 µl	-
C	2 µl		0.5 µl	35 µl
D ^m	13 µl		3 µl	21.5 µl
D ^o		11.0 µg	7.5 µl	-
E	22 µl		5.5 µl	10 µl
F	3.6 µl		1 µl	33 µl

Tabla 14. PREPARACIÓN DE EXTRACTO PARA CARGA DE TRUENO				
MÉTODO	Volumen (µl) necesario para cargar 20 µg	Basado en vol. µg en 30 µl	Volumen buffer Laemmli 1X	Volumen PBS para llevar VT a 37.5 µl
Estándar	5 µl			
A	-	14.5 µg	7.5 µl	-
B		3.3 µg	7.5 µl	-
C	8 µl		2 µl	27.5 µl
D ^m	29 µl		7 µl	1.5 µl
D ^o		1.6 µg	7.5 µl	
E		15.6 µg	7.5 µl	-
F	6 µl		1.5 µl	30 µl

Al finalizar su preparación, procedimos a hervir a 95°C por 5 minutos, con la intención de desnaturalizarlas. Después se cargó cada método de cada especie en los pocillos de los geles, así como la solución estandarizada.

Para el gel concentrador, se corrió la electroforesis a 15 mA por cada gel, por 20 minutos. Para el gel resolutivo, se corrió a 25 mA por cada gel, por 60 minutos.

7.9 TINCIÓN DE GELES ANALÍTICOS.

La tinción de las proteínas contenidas en el gel analítico se realizó con Azul Coomassie, proceso basado en **86, 77**. Con dicho proceso, se pueden detectar bandas de proteínas contenidas en solución desde 0.2 µg; se dejaron geles en la tinción toda la noche.

Al día siguiente, enjuagamos los geles en agua desionizada con una pequeña sacudida por 5 minutos para remover el Buffer SDS, después se colocan en solución para desteñir en tres tiempos: por 5 min, 20 min y 40 minutos. Finalmente, se realiza un lavado con agua desionizada.

Después de desteñir, se analizó el gel con los hardware y software de ChemicDoc Imaging System e Image Lab 6.1 de BIO RAD para su revelado y documentación.

7.10 WESTERN-BLOT.

La electrotransferencia proteica se llevó a cabo a través de Western-blot, con el Semi-Dry Transfer cell **81 - 84, 87 - 90.**

PROCEDIMIENTO:

Utilizando el gel preparativo, se equilibró en Buffer de transferencia por 15 minutos. Se cortó una membrana de unión proteica (PVDF) y dos filtros para realizar un sándwich, debiendo coincidir sus dimensiones con el gel preparativo.

Activamos la membrana PVDF con metanol al 100% por 2-5 minutos; tras su activación, colocamos la membrana en buffer de transferencia, por al menos 5 minutos.

Después de equilibrar el gel preparativo y de la activación de la membrana de transferencia PVDF, procedimos a colocar en el siguiente orden, a modo de sándwich: filtro – membrana – gel preparativo- filtro. Se colocó en el Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell, se inició la corrida a 15V por 60-70 min.

Posteriormente, colocamos la membrana en PBS para lavar por 5 a 10 minutos para remover el exceso de buffer de transferencia. E incubamos con 30 mL de BSA al 5% toda la noche, o con solución de bloqueo EveryBlot Blocking Buffer de BIO-RAD por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Se incubó la membrana con anticuerpo primario, usando un pool de IgE de cuatro pacientes sensibilizados a Fresno y Trueno, en agitación a 4°C toda la noche.

El pool de IgE se diluyó con PBS con BSA al 1%, o con EveryBlot Blocking Buffer de BIO-RAD, ambos en una relación 1:25, considerando como volumen total 8 mL. Por lo que se prepararon alícuotas de 308 µl de pool de suero de pacientes sensibilizados a Fresno y Trueno para sus usos posteriores.

Después se lavó tres veces con PBS-Tween y una vez con PBS, se incubó con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa 1:1000 por una hora. Se usó anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón contra IgE humano.

Se lavó cuatro veces con PBS-Tween y una vez con PBS por 5 minutos cada uno. Se preparó el sustrato de unión Thermo-Scientific a un volumen de 4 mL para la activación de la señal de marcaje de los anticuerpos secundarios. Usando 2 mL de sustrato de unión por membrana, se dejó 5 minutos.

Finalmente, se colocó a la membrana entre dos micas de acetato, evitando contener burbujas durante el proceso. Se pasó la membrana a su revelado, con el uso del hardware y software de ChemicDoc Imaging System e Image Lab 6.1 de BIO RAD.

7.11 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2-DE EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 13%.

Técnica enfocada para separar proteínas en dos dimensiones, para la obtención del punto isoeléctrico, y una segunda dimensión basado en el molecular de las proteínas, ampliamente usado para distinguir isoformas de proteínas 61, 67, 91.

Se realizaron por duplicado, con la finalidad de tener un gel analítico para teñir y un gel preparativo para la inmunotransferencia. La metodología se basó en 83, 92, 94 - 97.

PROCESO:

Se usó el sistema PROTEAN i12 IEF para el enfoque isoeléctrico de la proteínas en tiras con pH inmovilizado de 3 a 10 con una longitud de 7 cm. Se cargaron 200 µg de proteína total por tira, previamente se mezclaron con el buffer de carga IEF para un volumen total de 125 µL que se esparció a lo largo de la celda del sistema. Posteriormente se desprendió la capa plástica que cubre al gel de la tira IEF, cuidadosamente se colocó en contacto con el extracto proteico, para evitar su evaporación se cubrió con aceite mineral, y se dejó hidratando toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, a temperatura de 25°C se realizó el IEF bajo las siguientes condiciones: 300 V por 40 minutos, 1000 V durante 300 Vh, 5000 V hasta 4000 Vh, y 5000 V constante por 30 minutos. Después se agitaron por 15 minutos en buffer de equilibrio I y II cada uno.

Para realizar la segunda dimensión, las tiras se colocaron en la parte superior del gel resolutivo entre los vidrios que le contienen. Su orientación respetó los polos eléctricos del sistema de electroforesis. Como marcador de peso molecular se coloca en un extremo BLUEstain Protein

Ladder con la ayuda de un papel filtro. Se corre la segunda dimensión según lo descrito para dicho proceso técnico.

8. RESULTADOS

8.1 RUPTURA DEL GRANO DEL POLEN.

Con la finalidad de poder contrastar los diferentes métodos de extracción de proteínas con su capacidad de destrucción de la exina de los granos, se realizaron observaciones mediante microscopía óptica, reportando el porcentaje de lisis polínica para cada metodología en Fresno y Trueno.

Para cada especie, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y evaluar si los porcentajes promedio de ruptura observados por metodología son diferentes.

Para el método D^o, tras resultar con mal rendimiento cuantitativo y de calidad en ambas especies, se hicieron observaciones sólo en la especie de Trueno, al ser considerado como un grano recalcitrante **53**.

En los pólenes de Fresno se obtuvo un mayor porcentaje de lisis celular con los métodos E y C, con una ruptura del 48.7% y 32.7% respectivamente. Seguidos de los métodos B y D^m con ruptura del 19.1% y 18.2% respectivamente. Los otros métodos de mayor a menor eficacia en la fragmentación fueron F y A, con 11.9% y 8.6% respectivamente, Tabla 15.

Tabla 15. PORCENTAJE DE LA RUPTURA DEL POLEN POR CADA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN EN FRESNO.		
MÉTODO	MEDIA (%)	DE
A	8.6	16.4168
B	19.1	13.2843
C	32.7	17.0142
D ^m	18.2	15.7888
E	48.7	30.5994
F	11.9	9.735

Si bien para Fresno, el método E resultó ser el mejor método de destrucción del grano polínico, seguido de C como el segundo más eficaz, con base en un análisis de la varianza por metodología, se encontró que el método E fue significativamente mejor sobre los métodos A, B, D^m y F; el método C no tuvo una diferencia significativamente mejor, análisis expuesto en la Tabla 16.

TABLA 16. COMPARACIONES METODOLOGICAS CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA RUPTURA DE FRESNO.	
COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS	Valor-p
E – A	0.000171
E – B	0.01774
E - D ^m	0.01324
E – F	0.0006883

En los pólenes de Trueno se obtuvo un mayor porcentaje de lisis celular con los métodos C y D^m, con la ruptura del 44.1% y 43.0% respectivamente. Seguidos de los métodos A y B con ruptura del 24.7% y 22.7% respectivamente. Los métodos con menor eficacia en la fragmentación de mayor a menor fueron E, D^o y F, con 17.7%, 8.11% y 8.9% respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17. PORCENTAJE DE RUPTURA DEL POLEN POR CADA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN EN TRUENO.		
MÉTODO	MEDIA (%)	DE
A	24.7	13.6549
B	22.7	15.9139
C	44.1	20.6605
D ^o	8.11	7.9267

D ^m	43.0	18.5483
E	17.7	16.9838
F	8.9	11.2811

Si bien para Trueno, el método C resultó ser el mejor método de destrucción del grano polínico, seguido del método D^m como el segundo más eficaz, con base en un análisis de la varianza por metodología, se encontró que C fue significativamente mejor sobre B, D^o, E y F. En el caso de D^m, fue significativamente mejor que D^o, E y F, análisis expuesto en la Tabla 18.

TABLA 18. COMPARACIONES METODOLOGICAS CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA RUPTURA POLÍNICA DE TRUENO.	
COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS	Valor-p
C – B	0.0422
C - D ^o	0.00004177
C – E	0.00506
C – F	0.00006056
D ^m - D ^o	0.0008516
D ^m – E	0.03398
D ^m – F	0.001205

8.2 CUANTIFICACIÓN PROTEICA.

Con la intención de realizar una comparativa entre los métodos de extracción proteica y su rendimiento en la obtención de proteínas mediante la cuantificación de Bradford, se ejecutaron 3 réplicas cuantitativas por metodología, se calculó el promedio y su porcentaje de rendimiento considerando 50 mg de polen tratado.

Se observó que los mejores procesos de rendimiento de extracción proteica para Fresno fueron los métodos C y F, con un rendimiento del 17.38% y 11.34% respectivamente. Seguidos de los métodos D^m y A con rendimiento del 5.02% y 4.90% respectivamente. Los métodos con peor rendimiento fueron E, D^o y B, con 3.10%, 0.69% y 0.44% respectivamente (Tabla 19), y en la Fig. 20 se expone una gráfica del rendimiento promedio, así como sus desviaciones estándar.

Tabla 19. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA DE FRESNO.			
Método	Promedio (µg/mL)	(% de rendimiento)	DE
A	2,468.24	4.90	2.9345
B	222.14	0.44	0.127
C	8,691.26	17.38	1.1156
D ^o	345.70	0.69	0.0458
D ^m	2,511.51	5.02	1.7929
E	1591.16	3.10	1.5798
F	5,674.12	11.34	2.5719

D^o, método descrito de forma original por **33, 78**

D^m, método modificado.

Resultados se muestran tras cálculo con factor de dilución correspondiente.

Con base en un análisis de varianza se compararon los porcentajes promedios de cuantificación proteica por cada método, encontrando que el método C, siendo el mejor en rendimiento, fue significativamente mejor que A, B, D^m, D^o, E y F. En el caso de F, siendo el segundo mejor en rendimiento de cantidad, se encontró que fue significativamente mejor que A, B, D^o y E expuestas en la Tabla 20.

TABLA 20. COMPARACIONES METODOLOGICAS CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA CUANTIFICACIÓN DE FRESNO.	
COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS	Valor-p
C – A	0.000227
C – B	0.0000001843
C - D ^m	0.00000115
C - D ^o	0.00000006138
C – E	0.000000006565

C – F	0.007295
F- A	0.01112
F – B	0.00003093
F – D°	0.00001743
F – E	0.0002338

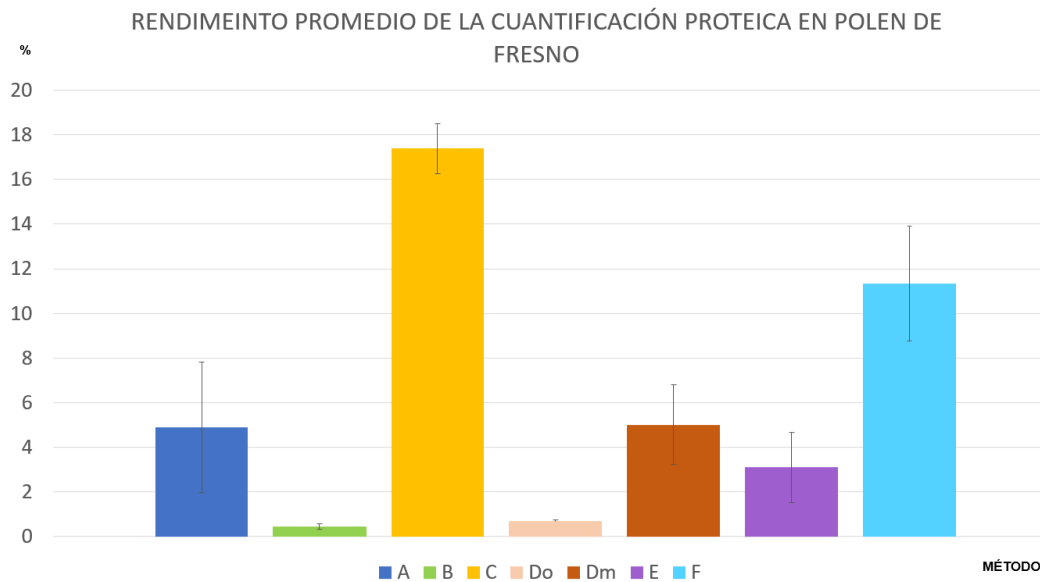


Figura 20. Gráfico del porcentaje del rendimiento promedio de proteína extraída por método en Fresno

En el caso de Trueno se observó que los mejores rendimientos de extracción proteica fueron los métodos F y C, con un rendimiento del 11.68% y 8.71% respectivamente. Seguidos de los métodos D^m y E con rendimiento del 2.44% y 2.43% respectivamente. Los métodos con peor rendimiento fueron A, B y D^o, con 1.24%, 0.21% y 0.16% respectivamente (Tabla 21), en la Fig. 21 se expone una gráfica del rendimiento promedio, así como sus desviaciones estándar.

Tabla 21. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA DE TRUENO.			
Método	Promedio µg/mL	Rendimiento (% de proteína en 50 mg/300 µl de polen)	DE
A	415.37	1.24	0.1762
B	69.01	0.21	0.1127
C	2,905.41	8.71	2.8555
D ^o	54.55	0.16	NA
D ^m	814.14	2.44	0.8873
E	811.02	2.43	1.2849
F	3,895.21	11.68	4.3283

D^o, método descrito de forma original por **33, 78**

D^m, método modificado.

Resultados se muestran tras cálculo con factor de dilución correspondiente.

Con base en un análisis de varianza, se encontró que el método C fue significativamente mejor que A, B, D^m, D^o y E. El método F fue significativamente mejor que los métodos A, B, D^m, D^o, y E. Diferencias significativas, expuestas en la Tabla 22.

TABLA 22. COMPARACIONES METODOLOGICAS CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN LA CUANTIFICACIÓN DE TRUENO.	
COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS	Valor-p
C – A	0.01155
C – B	0.004186
C - D ^m	0.02493
C – D ^o	0.0479
C – E	0.03785
F – A	0.0007506

F – B	0.0002534
F - D ^m	0.001193
F - D ^o	0.005842
F – E	0.002035

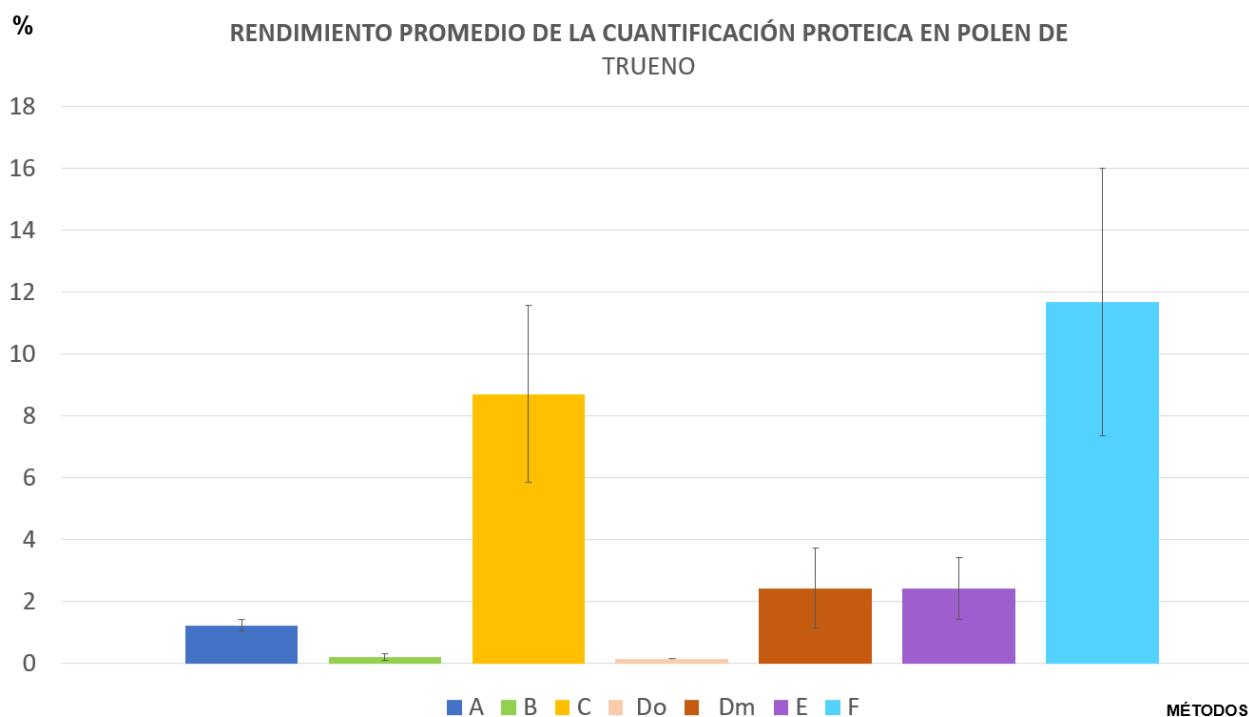


Figura 21. Gráfico del porcentaje del rendimiento promedio de proteína extraída por método en Trueno.

8.3 ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL.

Con la intención de identificar las proteínas totales para ambas especies, se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida al 13% para su separación por peso molecular utilizando cada método de extracción proteica, se tiñeron con azul Coomassie. Los geles se cargaron con 22 µg de proteína por pocillo, sin embargo, para los métodos B y D^o se cargó con base en base en un volumen de 37.5 µl debido a su dilución. La tinción de los geles de Fresno se muestra en la Fig.22 y en la Fig. 23 se exponen los geles de Trueno.

Tras la realización de 1-DE se observó una identificación de proteínas desde los ~170 kDa hasta los 9 kDa en general. Los métodos C, D^m y E presentan una buena resolución en la delimitación de las bandas proteicas de alto peso molecular. La mejor identificación de bandas proteicas con menor peso molecular en orden de jerarquía fueron los métodos D^m, E, C, F y A.

Con los protocolos de F y A se detectaron proteínas de bajo peso molecular, sin presentar una marcada delimitación en bandas, a diferencia de D^m y E en los que se observa una mejor resolución de bandas en bajos pesos moleculares.

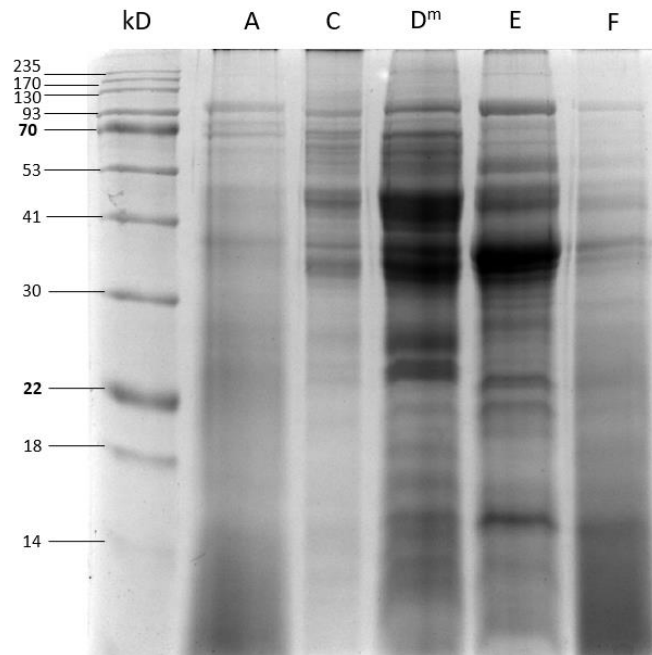


Figura 22. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Fresno teñidas con azul de Coomassie: A: método por buffer SDS. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

En el caso de trueno, todos los métodos presentan una buena resolución en la delimitación de las bandas proteicas de elevado peso molecular. El espectro detectable en general fue ~170 kDa a <9 kDa. D^m y E tuvieron bandas a partir de ~170 kDa, en el caso de las demás metodologías, se observaron a partir de ~93 kDa. Los métodos con mayor espectro de calidad se observaron en orden jerárquico con C, D^m, F, E y A; siendo C, D^m y F en los que se observa una mejor resolución en bandas con bajos pesos moleculares.

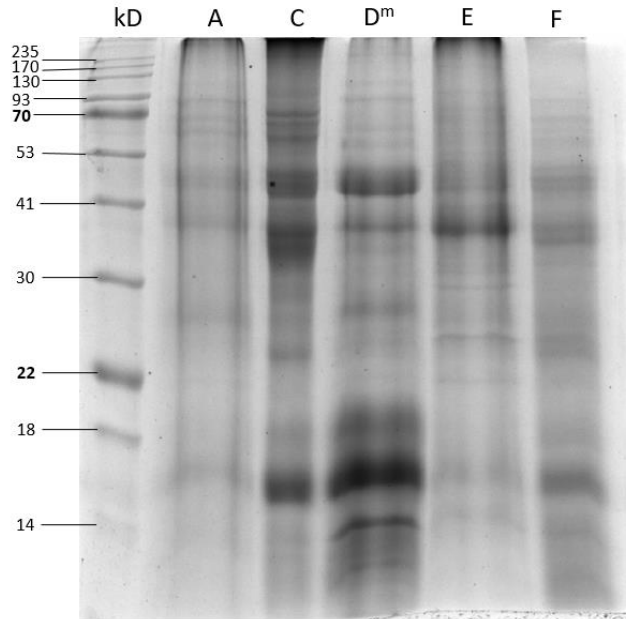


Figura 23. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Trueno teñidas con azul de Coomassie.: A: método por buffer SDS. B: por calentado. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

Tanto para Fresno y Trueno, se descartaron los métodos B y D^o para reproducciones experimentales subsecuentes, debido a ser los peores en rendimiento de cantidad y por sus nulos rendimientos en calidad proteica. En seguida se expone una electroforesis con el método B en Trueno, en donde ya se había excluido D^o (Fig. 24).

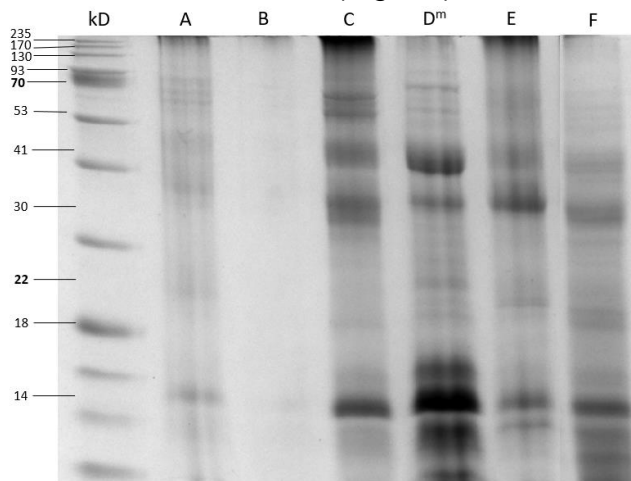


Figura 24.

Patrón electroforético de la proteína obtenida de Trueno teñidas con azul de Coomassie.: A: método por buffer SDS. B: por calentado. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

8.4 WESTERN-BLOT UNIDIMENSIONAL.

Con la intención de identificar las proteínas con inmunorreactividad con el suero de pacientes alérgicos, se procedió a realizar Western-blot.

En ambas especies, no incluimos los primer Western-blot, debido a la nula identificación de anticuerpos inmunorreactivos. Esto probablemente por un error técnico en donde se realizaron lavados con PBS-Tween al 5% y no al 0.05%. También se procedió a la renovación de los buffers necesarios para crear geles de poliacrilamida. Adicionalmente hicimos uso de micas de acetato para la preservación de las membranas PVDF durante su revelado.

Durante el proceso de la experimentación, se aprecia una curva de aprendizaje para la ejecución técnica de inmunotransferencia, se exponen las imágenes obtenidas tras revelar las bandas de anticuerpos reactivos, mostrando los resultados desde la segunda experimentación (Fig. 25); y una tercera réplica en donde pueden observarse las diferencias resultantes en la calidad de la ejecución (Fig. 26).

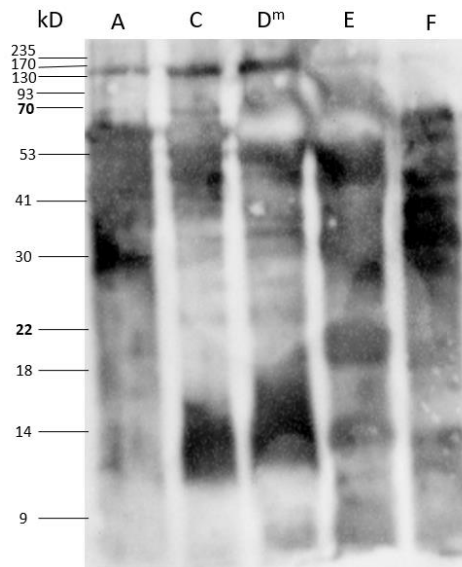


Figura 25. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Fresno con inmunotransferencia, segunda réplica. A: método por buffer SDS. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

En Fresno, tras realizar Western-blot. se observó un mejor rendimiento en la identificación de bandas de bajo peso molecular los métodos en orden jerárquico D^m, E y F.

En la línea A, se detectaron bandas desde ~95 a 20 kDa, con bandas de proteínas con intensa reactividad entre los ~60 a ~30 kDa, con buena resolución en ~95 kDa.

En la línea C, se detectó un espectro de bandas entre los ~95 a 30 kDa, con una banda de proteínas altamente reactivas entre los ~53 a ~34 kDa, con buena resolución en ~95 kDa.

En la línea D^m observamos una identificación de bandas entre los ~93 a 9 kDa, con una banda con proteínas intensamente reactivas entre los ~57 a 22 kDa, con bandas en ~95 kDa, ~34 kDa, ~22 kDa. ~13 kDa y ~9 kDa.

En la línea E, se observan bandas entre ~95 a 9 kDa, una mancha de proteínas intensamente reactivas entre los ~53 a 37 kDa, con bandas de ~95kDa, ~22 kDa, ~13 kDa. En F, ~46 kDa, ~41 kDa, ~37 kDa, ~30 kDa, ~ 9 kDa.

Se modificó la saturación de escala de grises con la intención de observar mejor las bandas de menor peso molecular para los métodos D^m, E y F en la Fig. 27.

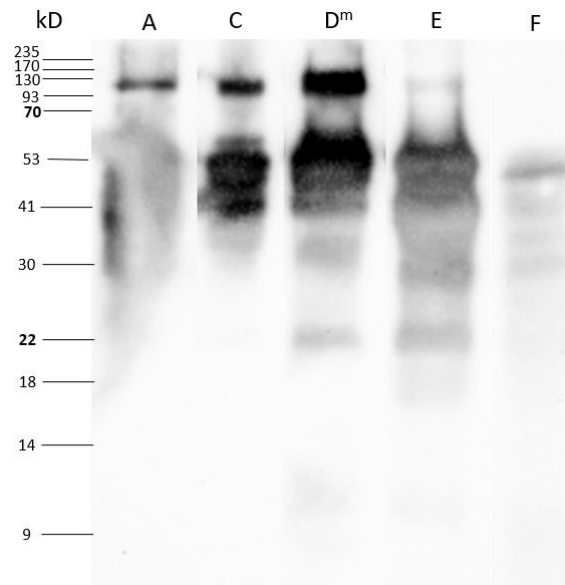


Figura 26. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Fresno con inmunotransferencia, tercer réplica. A: método por buffer SDS. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

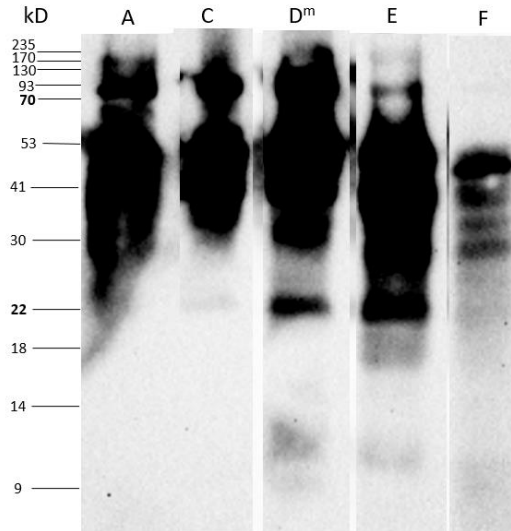


Figura 27. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Fresno con inmunotransferencia, tercer réplica. Visualización con mayor saturación de escala de grises, imagen obtenida de forma tardía, se observan mejor las bandas de menor peso molecular para los métodos D^m, E y F.

En el caso de Trueno tras realizar Western-blot, se obtuvo todos los métodos una buena resolución, sin embargo, el rendimiento en la identificación de bandas fue superior en los métodos en orden jerárquico C, F y D^m.

En la línea A se detectan tres bandas, una de ~41-43 kDa, ~37 kDa y ~12 a 13 kDa.

En la línea C se obtuvieron bandas desde ~170 a 9 kDa, observándose bandas con los pesos moleculares de ~41-43 kDa, ~35-37 kDa, ~28 kDa, ~22 kDa y ~12 a 13 kDa.

En la línea D^m con identificación de bandas con peso de ~43 a 9 kDa, presenta bandas con buena resolución de ~34 kDa, ~22 kDa y ~12 a 13 kDa.

En la línea E se observan bandas desde ~53 - 41 kDa, con una banda de buena resolución de ~41 kDa y ~22 kDa.

En el caso del método F, se obtuvo un espectro de bandas desde ~53 a 18 kDa, con identificación de bandas con adecuada resolución en ~53 kDa, ~41 kDa y ~18 a 22 kDa.

En la Fig. 28, se muestra la imagen del segundo experimento, en este caso hubo una contaminación entre los pocillos al cargar las proteínas, corroborado al visualizar inmunorreactividad en el carril correspondiente al marcador estandarizado. Pueden verse las diferencias en la calidad resultante en la tercera experimentación, Fig. 29.

Se modificó la saturación de escala de grises con la intención de observar mejor las bandas de menor peso molecular para los métodos A, C, D^m en la Fig. 30.

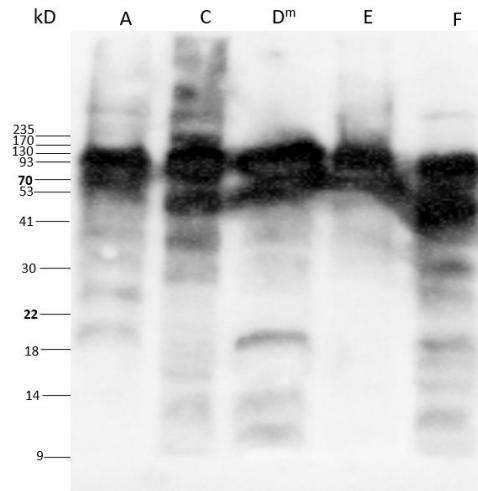


Figura 28. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Trueno con inmunotransferencia, segunda réplica. A: método por buffer SDS. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

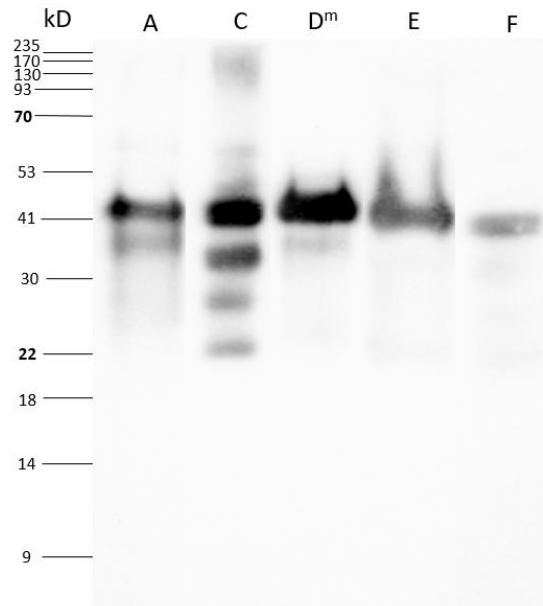


Figura 29. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Trueno con inmunotransferencia, tercer réplica. A: método por buffer SDS. C: por homogenizador. D^m: Fenol modificado. E: por PBS. F: por método de lisis celular de BIO-RAD.

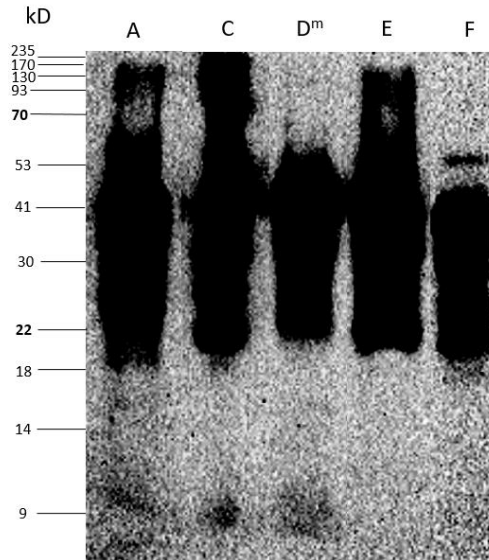


Figura 30. Patrón electroforético de la proteína obtenida de Trueno con inmunotransferencia, tercer réplica. Visualización con mayor saturación de escala de grises, imagen obtenida de forma tardía, se observan mejor las bandas de menor peso molecular para los métodos A, C, D^m.

8.5 TINCIÓN DE GELES 2-DE.

Se hizo una electroforesis en dos dimensiones, con la finalidad de separar las proteínas y así distinguir sus posibles isoformas, con la primer dimensión se obtuvo una primer separación mediante su punto isoeléctrico, y una segunda dimensión basado en la separación según su peso molecular. Se realizaron por duplicado, un gel empleado para su tinción con azul de Coomassie, y una membrana PVDF para Western-blot.

De los métodos trabajados, se emplearon para ambas especies los métodos C y E, esta decisión se ve respaldada con base en el análisis de los resultados obtenidos tras la verificación de la ruptura del grano, su cuantificación, e inmunotransferencia en 1-DE. El método C por su mejor eficacia cuantitativa tanto para Fresno y el segundo mejor para Trueno; el método E debido a ser el método más eficaz en la destrucción polínica del Fresno, y por ser el de mejor rendimiento en detección de bandas inmunorreactivas en Fresno, además de confrontar lo descrito en la literatura, donde se expone que los alérgenos son principalmente solubles **5, 58**.

En el caso de Fresno, con el método C se observó una distribución de proteínas con pI entre ~3 a ~8.25, siendo predominante entre ~4.75 a ~7.0. Con un espectro de peso ~70 kDa y ~18 kDa. En su inmunotransferencia se pudieron identificar puntos en los siguientes pesos moleculares con sus respectivos márgenes de pI: De ~93 kDa con ubicación en pI de ~3.0 a 3.4, y de ~4.8 a 6.2. Otras manchas de ~43 a 36 kDa con pI de ~4.75 a 6.2, de ~6.5 a 7.2, y de 8.4 a 10. Puntos de ~30 a 41 kDa con pI de ~4.75 a 7.2, y de ~7.0 a 10. Puntos presentes entre

~28 a 22 kDa con distribución de pI similar a los puntos detectados a ~30 kDa. Manchas de ~22 kDa con pI de distribución entre ~4.75 a 6.4. Otros puntos de ~18-21 kDa con pI de ~5.0 - 6.5 (Fig. 31).

Con el método E en polen de Fresno se observó una distribución de proteínas con pI entre ~3 a ~10, siendo predominante entre ~4.75 a ~8.25. Con un peso molecular entre los ~93 a 9 kDa. Respaldo lo que ya se observaba desde el 1-DE, con presencia de una mejor resolución de bandas en bajos pesos moleculares. En su inmunotransferencia se observaron puntos con los siguientes pesos moleculares y pI: De ~41 kDa con pI entre ~6 a 6.7, y de ~8.2 a 9.0. Puntos de ~32 a 28 kDa con pI entre ~6 a 6.7, y de ~8.2 a 9.0. Puntos de ~35 kDa con pI de 3.7. Y puntos de ~35 a 41 kDa con pI de 5 (Fig. 32).

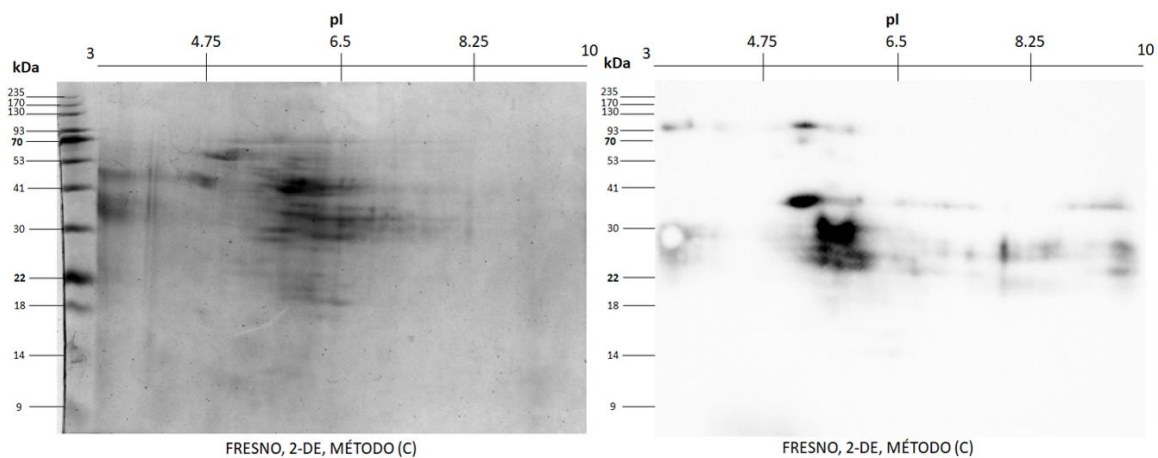


Figura 31. Patrón 2-DE de la proteína obtenida con método C de Fresno, teñido con azul Coomassie y Western-blot.

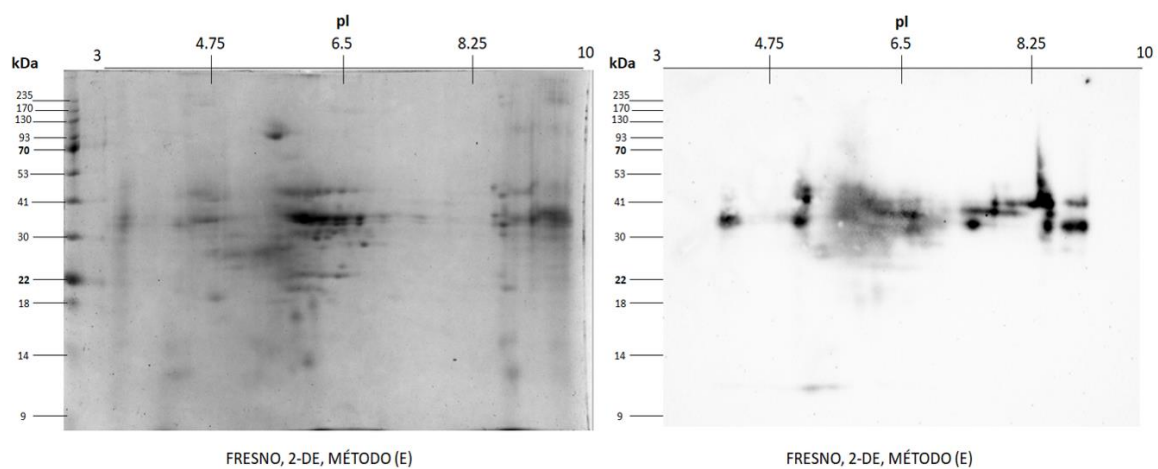


Figura 32. Patrón 2-DE de la proteína obtenida con método E de Fresno, teñido con azul Coomassie y Western-blot.

Para el caso de Trueno, con el método C, se observa una distribución de proteínas entre el pI de ~3 a ~10, siendo predominante entre pI de ~4.0 a ~7.0. Con un espectro de peso entre ~70 a 10 kDa. Tras realizar inmunotransferencia se pudieron observar puntos con los siguientes pesos moleculares y pI: De ~43 a 41 kDa con pI entre ~5 a 6.5. Puntos de ~41 kDa con pI ~6.7. Puntos de 30 kDa con pI ~5.7. Puntos de ~43 a 41 kDa Puntos de ~19 a 20 kDa con pI entre ~5 a 6.5. (Fig. 33).

En E, se observa una distribución de proteínas entre el pI de ~4.5 a ~8.25, siendo predominante entre pI de ~4.0 a ~8.0. Con un espectro de peso entre los ~235 a 9 kDa. En su inmunotransferencia se observaron escasos puntos, descritos a continuación: De ~38 kDa con pI en ~4.7, ~5.5 a 6.3, y ~8.00 (Fig. 34).

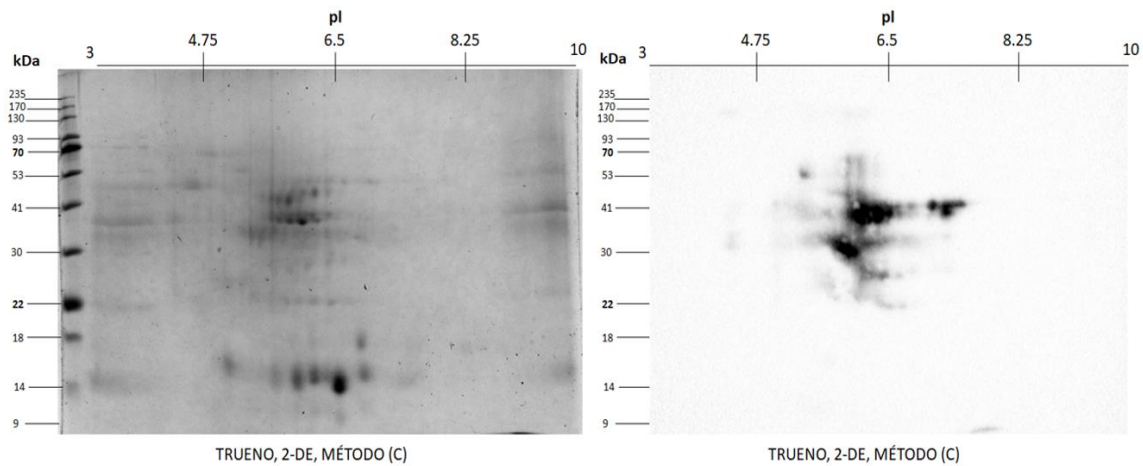


Figura 33. Patrón 2-DE de la proteína obtenida con método C de Trueno, teñido con azul Coomassie y Western-blot.

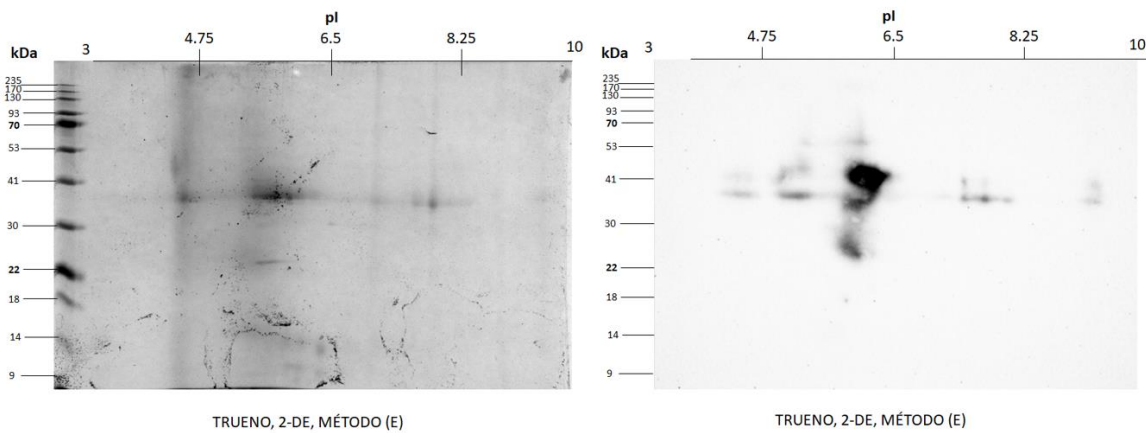


Figura 34. Patrón 2-DE de la proteína obtenida con método E de Trueno, teñido con azul Coomassie y Western-blot.

9. DISCUSIÓN

9.1 ASOCIACIÓN ENTRE LA RUPTURA DEL GRANO DE POLEN, RENDIMIENTO, CALIDAD E INMUNODETECCIÓN DE DETERMINANTES ALERGÉNICOS.

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de extracción de determinantes alérgicos, así como identificar los métodos que proporcionen una mejor cobertura de los mismos, confrontamos nuestros hallazgos de este estudio en Fresno y Trueno.

En el caso de Fresno, en la Tabla 23 se ordenaron jerárquicamente los métodos A, B, C, D^o, D^m, E y F según los resultados obtenidos en las variables medidas (ruptura de polen, rendimiento, calidad e inmunotransferencia), asignándose un puntaje. Conforme a mayor puntaje, mejor rendimiento en general. En el caso de B y D^o, pese a no haberse reproducido para la inmunotransferencia, se les asignó el puntaje mínimo en dicha área para poder homologar la calificación final.

Fresno.

Método C.

Un método duro que implica fuerzas físicas por medio de un homogenizador. Este método junto con E fueron los más eficaces para la lisis polínica, en este caso se obtuvo 32.7% de eficacia. Resultó ser el método más eficaz para el rendimiento de extracción proteica, requiriendo un factor de dilución X6 para una cuantificación precisa. Se obtuvo un rendimiento de 17.38%. Sin embargo, la proteína extraída resultó ser el tercer mejor método respecto a la calidad proteica total detectable en 1-DE, y es el peor método en la detección de bandas inmunorreactivas a IgE de pacientes alérgicos. Por lo que la ruptura polínica del Fresno parece ser proporcional con la cantidad proteica total, pero en un enfoque inmunológico no se perfila como la mejor elección en la búsqueda de alérgenos.

Método E.

Es un método suave, su buffer de extracción se basa en el empleo de PBS y Tritón X100. El método E junto con el C fueron los mejores métodos en ruptura de la exina del polen, en este caso con un 32.7% de ruptura. Sin embargo, el método E resultó ser el sexto en la cuantificación proteica total, con rendimiento del 3.10%; pero el extracto proteico resultante al correrlo en electroforesis 1-DE demostró ser el segundo mejor en calidad, así como ser el segundo mejor método en el rendimiento de detección de bandas proteicas inmunorreactivas a IgE de pacientes alérgicos. Estos hallazgos pueden ser respaldados por lo referido en la literatura, considerando que el polen de Fresno es dependiente del viento para su dispersión, donde al exponerse a diferentes presiones osmóticas y a una fuerte evaporación ambiental sufre una violenta expulsión de sus proteínas con su siguiente dispersión de partículas submicrónicas a la atmósfera. El método E se basa en el uso de fosfato salino tamponado con Tritón, un detergente suave, no iónico, no tan potente como para desnaturalizar a las proteínas, aproximándose a las condiciones existentes en la naturaleza, evitando la descomposición de

su conformación nativa, con su subsecuente preservación de los alérgenos contenidos en su grano, aumentando las probabilidades de una mayor gamma de reconocimiento antigénico **5, 14, 63, 64, 66.**

Método D^m.

Método en el que inicialmente se empleó el buffer de extracción con fenol equilibrado (Fenol y Tritón X100), a diferencia del método D^o, excluimos el sobrenadante y tratamos al polen con buffer de extracción empleado en método F. Seguido de los métodos E, C y B, el método D^m fue el siguiente en rendimiento de destrucción del grano polínico, con un 18% de eficacia. Después de C y F, el método D^m fue el siguiente en rendimiento de cuantificación, requiriendo un factor de dilución X4, con rendimiento de 5.02%. Al correr el extracto proteico obtenido, demostró tener el mejor patrón en el rendimiento de calidad en electroforesis 1-DE. Y resultó ser el método con mejor rendimiento en la detección de bandas inmunorreactivas. Lo que refuerza que, al parecer, no hay una relación directa entre la lisis celular del polen y el favorecimiento de la detección de proteínas alergénicas, como en el caso del método B, en donde a pesar de haber sido el tercer mejor método en la ruptura del grano, fue el peor método en la obtención de calidad y cuantificación proteica, lo que llevó en este estudio a su exclusión en pruebas posteriores.

Método F.

Metodología que emplea en su buffer de extracción DTT y ATC 20%, descrito por Bio-Rad. Este método junto con el método A fueron los peores métodos en la liberación del contenido del grano polínico corroborado por microscopía, en este caso con 11.9% de eficacia, sin embargo, el método F junto con el método C, fueron los mejores métodos en la cuantificación de proteína con 11.34% de rendimiento proteico total. El patrón obtenido tras realizar electroforesis 1-DE con su extracto proteico demostró tener una mala calidad, y resultó después de los método D^m, E y C el mejor en la inmunodetección de proteínas reactivas a IgE. Dicho método preservó la integridad del polen, lo que sugiere que la proteína cuantificable y la detectada en inmunotransferencia podrían tratarse de proteínas extrínsecas al polen.

Método A.

El método A basa su buffer de extracción en SDS 20%, ME y Tris-HCL fue el peor en lograr una disrupción en la integridad de la exina del polen con eficacia de 8.6%-Como método de extracción proteica tuvo un rendimiento de 5.02%, después de los métodos C, F y D^m. al correr sus proteínas extraídas en 1-DE, su patrón proteico fue el peor en calidad. Resultó ser el peor en la identificación de bandas inmunorreactivas.

Métodos B y D^o.

El método B que basa su buffer de extracción en Tris-HCL, Tritón X100, EDTA e inhibidores de proteasa, pese a haber sido después de E y C el mejor método en rendimiento de lisis celular

con ruptura de 19.1%, fueron ser junto con D° los peores métodos en la recuperación proteica con rendimiento de 0.44% y 0.69% respectivamente, además ambos resultaron en una nula detección de proteínas en tinción con azul Coomassie, por lo que se descartaron para experimentaciones en inmunodetección.

Los métodos C, D^m y E reconocieron bandas con peso molecular ~46 kDa, conforme a la literatura, podría corresponder al alérgeno Fra e 9, una 1,3 beta glucanasa, o con monodehidroascorbato reductasa de 46.5 kDa **43, 46 - 48**.

Los métodos A, C, D^m, E y F reconocieron bandas de >30 kDa, en la literatura se han descrito antígenos no identificados con dicho peso molecular, distribuidos en cuatro áreas: dos no identificados, uno homólogo a β-galactosidasa, y uno identificado como proteína transportadora de azúcar; otra posibilidad es que se encuentre en este grupo la 39.6 kDa pectinesterasa (Ole e 11.0102) con 39.6 kDa, o la adenosina quinasa 2 de 37.8 kDa **43, 46 - 48**.

En D^m y E hubo reconocimiento de bandas de ~22 kDa, que, según lo descrito por la comunidad científica, podrían corresponder con Fra e 1, con peso molecular de 18-21 kDa, así como una proteína previamente descrita homóloga a Ole e 8, similar a la polcalcina 4 E-helix-loopF-helix / mano-EF de 20 kDa, otra posibilidad son dos proteínas descritas como homólogas a Ole e 5: Os02g0778400 [de *Oryza sativa*] y una proteína no caracterizada de *Zea mays*, ambas con peso de 21.5 kDa. En estos mismos métodos, hubo identificación de bandas con peso molecular de ~13 kDa, que podría corresponder con Fra e 2, descrito con peso de entre 13 – 16 kDa **46 - 48**.

En el método D^m, E y F, tras la saturación de grises en imágenes obtenidas de forma tardías se pudieron observar bandas de ~ 9 kDa, posiblemente corresponde con Fra e 3, descrito con peso aproximado entre 6 – 10 kDa **41, 47**.

Tabla 23. EFICACIA ENTRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA FRESNO.						
	Ruptura de polen	Cuantificación	Calidad 1-DE	Inmunodetección 1-DE	Puntaje final	
7	E	C	D ^m	D ^m , E	C	24
6	C	F	E	C	E	23
5	B	D ^m	C	F	D^m	23
4	D ^m	A	F	A	F	18
3	F	E	A		A	13
2	A	D°	B y D°		B	9
1	D°	B		B y D°	D°	6

Jerarquización de los métodos según el rendimiento estudiado y puntuación asignada.

Trueno.

Al igual que con Fresno, en la Tabla 24 se ordenaron jerárquicamente los métodos A, B, C, D^o, D^m, E y F según los resultados obtenidos en las variables medidas (ruptura de polen, rendimiento, calidad e inmunotransferencia), asignándose un puntaje. En el caso de B y D^o, pese no haberse reproducido para la inmunotransferencia, se les asignó el puntaje mínimo en dicha área, para poder homologar la calificación final.

Método C.

Tras el análisis de la ruptura del grano de Trueno, el mejor método para dicha finalidad fue el método C con 44.1% de eficacia, dicho método se fue el segundo mejor en rendimiento de cantidad, requiriendo un factor de dilución X2 para una cuantificación más certera, con rendimiento de 8.71%. El patrón de bandas en 1-DE con su extracto proteico, resultó ser el de mejor rendimiento de calidad. Así mismo, fue el método con mejor rendimiento en reconocimiento de bandas inmunorreactivas. Es probable que la lisis celular se optimice con la aplicación de fuerzas mecánicas externas como el homogenizador en este caso, posiblemente compatible con la naturaleza del polen al considerarse como un grano recalcitrante y cuya polinización es principalmente entomófila y facultativamente anemófila, exponiéndose con mayor probabilidad a fuerzas físicas que lo lesionen en la naturaleza. Por otro lado, la literatura ha descrito su fragmentación con choque osmótico durante tormentas eléctricas y en condiciones de elevada humedad 11.

Método F.

El método F fue el método con menor capacidad de destrucción polínica con 8.9% de eficacia, sin embargo, se perfiló como el mejor método en rendimiento de cantidad de proteína cuantificable, requiriendo un factor de dilución X2 para una cuantificación confiable, con rendimiento de 11.68%. Cuando se corrió su extracto proteico en 1-DE, resultó ser después de C y D^m, el tercero en calidad de patrón teñido con azul de Coomassie. Cuando se hizo inmunotransferencia, se ubicó como el segundo mejor en la detección de bandas inmunorreactivas después de C. Lo que sugiere que las proteínas contenidas en la superficie de su exina tengan capacidad inmunogénica, dado a su propiedad recalcitrante, posicionándose como el segundo mejor método en reconocimiento de bandas reactivas a IgE.

Método D^m.

El método D^m se perfiló como el segundo mejor método en la ruptura de polen, después de C, con una capacidad de lisis celular de 43%. Y fue después de C y F el tercer mejor método en la obtención de proteínas cuantificables, con un rendimiento de 2.44%. Al correr su extracto proteico, el patrón resultante en electroforesis 1-DE lo posicionó como el segundo en calidad después de C, y el tercer mejor método en la identificación de proteínas reactivas a IgE después de C y F.

Métodos E y A.

El método E fue después de C, D^m, A y B, el quinto mejor método en destruir la exina de polen con rendimiento de 17.7%. El método A resultó ser el tercer mejor método en destruir el grano con eficacia de 24.7%. En cuanto a la recuperación proteica, ambos métodos tuvieron un rendimiento del 2.43% y 1.24% respectivamente. Respecto al patrón obtenido en 1-DE realizado con el extracto de sus proteínas, sus resultados fueron similares en su rendimiento de calidad, siendo superados por C, D^m y E; de igual forma en la inmunotransferencia, donde en ambos casos, sus bandas reactivas fueron de baja resolución.

Métodos B y D°.

El método B y D° en rendimiento de lisis celular resultaron ser el cuarto y sexto mejores métodos en ruptura de exina polínica con eficacia de 22.7% y 8.11% respectivamente. Ambos métodos resultaron ser los peores en la recuperación proteica, con rendimiento del 0.20% y 0.16% respectivamente. Además de haber tenido una nula detección de proteínas en tinción con azul Coomassie tras su electroforesis en 1-DE, por lo que se descartaron para reproducciones de inmunodetección.

Los métodos A, C, D^m, E y F fueron eficientes en la detección de bandas de ~41-43 kDa, posiblemente correspondiente con las poligalacturonas descritas con un peso de 43 kDa **11, 33.**

Con los métodos C, F y A se detectaron bandas de ~35 a 37 kDa, posiblemente correspondiente con una enolasa, descrita con peso de 37.38 kDa **11, 33.**

Los métodos C, F, D^m y E al realizar inmunodetección, detectaron bandas de ~22 kDa, posiblemente correspondientes con Lig v 1 con un peso descrito de 20.5 kDa **7, 9, 10, 48, 52.**

Con el método F, se detectaron bandas tenues con peso molecular de ~18 kD, posiblemente correspondiente con los isoalérgenos de Lig V 1, de 20 kDa y 18.5 kDa respectivamente **7, 9, 10, 48, 52.**

En los métodos A, C y D^m tras la saturación de grises en imágenes obtenidas de forma tardías se pudieron observar bandas de ~12 a 13 kDa, siendo probable que se traten de Lig v 2 con peso descrito de 14.8 kDa **11, 33, 48.**

El uso de acetona tiende a precipitar lípidos con proteínas, por lo que se le ha considerado por la literatura como el método con menor rendimiento proteico **60, 61.** Sin embargo, usamos acetona fría para la precipitación en todas las metodologías, teniendo resultados similares a otros estudios que han descrito alérgenos en Fresno y Trueno.

En ambas especies, la eficacia en la calidad proteica sugiere la posibilidad de una adecuada identificación de proteínas inmunorreactivas, pues parece ser proporcional con la eficiencia en la detección de bandas tras realizar Western-blot, en un enfoque inmunológico se perfila como un predictor en la búsqueda de alérgenos.

Control negativo.

Se realizó un Western-blot en ambas especies, utilizado en las metodologías en cuestión con suero de un sujeto sin clínica compatible con polinosis, con prueba cutánea negativa, y sin sensibilización a ningún aeroalérgeno convencional por SPT. Se observó la existencia de inmunorreactividad de IgE con proteínas de Fresno y Trueno, sin inmunodetección a BSA (control), corroborándose la ausencia de uniones inespecíficas de los anticuerpos, siendo probable que el paciente se encuentre inmunomodulado al tener adecuados títulos de IgG1 e IgG4, lo que lo convierte en un individuo sano, sensibilizado y no en un paciente alérgico 1.

Tabla 24. EFICACIA ENTRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA TRUENO.						
	Ruptura de polen	Cuantificación	Calidad 1-DE	Inmunodetección 1-DE	Puntaje final	
7	C	F	C	C, F	C	27
6	D ^m	C	D ^m	A, D ^m	D ^m	23
5	A	D ^m	F	E	F	20
4	B	E	E		A	17
3	E	A	A		E	16
2	D ^o	B	B, D ^o		B	9
1	F	D ^o		B, D ^o	D ^o	6

Jerarquización de los métodos según el rendimiento estudiado y puntuación asignada.

9.2 TINCIÓN Y WESTERN-BLOT EN 2-DE.

Fresno.

En el método C, se pudieron observar distribuciones en un espectro de los siguientes pesos moleculares con sus respectivos márgenes de pl: de ~93 kDa, con ubicación en pl de ~3.0 a 3.4, y de ~4.8 a 6.2. Seguido de puntos de ~43 a 46 kDa, con ubicación en pl de ~4.75 a 6.2, de ~6.5 a 7.2, y de 8.4 a 10, los alérgenos descritos más próximos para dichas propiedades son un homólogo de UTP-glucosa1-fosfato uridililtransferasa con 51,8 kDa, el Fra e 9 con 46 kDa, y monodehidroascorbato reductasa, una enzima citoplasmática de 45.5 kDa. Un grupo de puntos entre los ~30 a 41 kDa, en pl de ~4.75 a 7.2, de ~7.0 a 10, empatando con lo informado en otros estudios, podría correlacionar con la presencia de proteínas >30 kDa correspondientes a un homólogo a β -galactosidasa, una proteína transportadora de azúcar y dos proteínas identificadas, pectinesterasa (Ole e 11.0102) con peso de 39.6 kDa, y adenosina quinasa 2 de 37.8 kDa 41, 43, 47. Conjunto de puntos presentes entre ~22 kDa a 28 kDa, con distribución de

pl similar a los puntos detectados a ~30 kDa, y manchas con pl entre ~4.75 a 6.4 en donde podría encontrarse una proteína isopentenil difosfato delta isomerasa de 27 kDa. Entre ~18-21 kDa con distribución entre pl de ~5.0-6.5, en este conjunto es posible que exista el correspondiente a Fra e 1 y sus posibles isoformas Fra e 1.01 y Fra e 1.02, de 20.1 y 17.5 kDa respectivamente **36, 46, 48, 51**. De igual forma, es probable que se ubiquen las proteínas Os02g0778400 [de *Oryza sativa*] y proteína no caracterizada de *Zea mays*, ambas homologas con Ole e 5 de 21.5 kDa. Sin puntos que hagan sospechar de la detección de Fra e 2 de 13-16 kDa, ni de Fra e 3 de 6-10 kDa.

Con el empleo del método E, se observan los siguientes puntos: ~41 kDa con pl entre ~6 a 6.7, y de ~8.2 a 9.0, los alérgenos descritos más próximos para dicha descripción son el Fra e 9 con 46 kDa, monodehidroascorbato reductasa de 46.5 kDa, un homólogo de UTP-glucosa 1-fosfato uridiltransferasa de 51.8 kDa. Un conjunto de manchas de ~32 a 28 kDa con pl entre ~6 a 6.7, y de ~8.2 a 9.0, podrían corresponder con isopentenil-difosfato delta-isomerasa de 27 kDa, también podrían corresponder a lo descrito con las proteínas de >30 kDa: un homólogo a β -galactosidasa, una proteína transportadora de azúcar y dos no identificados; así como pectinesterasa (Ole e 11.0102) de 39.6 kDa, y una adenosina quinasa 2 de 37.8 kDa. Puntos de ~41 a 35 kDa con pl de 5 y ~35kDa con pl de 3.7, en donde podría corresponder la proteína adenosina quinasa de 37.8 kDa. Sin puntos de ~18 a 21 kDa que sugieran la ubicación de Fra e 1 que pesa entre 18-21 kDa, así como poca probabilidad de presencia de las dos proteínas homólogas a Ole e 5: Os02g0778400 [de *Oryza sativa*], y una proteína no caracterizada de *Zea mays* de 21.5 kDa **41, 43, 47**.

Con el empleo del método C encontramos una mayor asociación con lo descrito en la literatura en donde suelen emplearse métodos duros, con hallazgo de puntos reactivos en un espectro de pl que oscila predominantemente entre ~4 y 6.5. Sin embargo, con el método E obtuvimos una mayor gamma de puntos inmunorreactivos con un espectro de pl oscilante entre ~6.5 a 9, mostrando una clara diferencia en los puntos de proteínas reactivas entre ambos métodos, proteínas que podrían ser susceptibles a su reconformación estructural con el método duro por homogenizador.

Trueno.

En Trueno, con el método C, se pudieron observar distribuciones en un espectro de los siguientes pesos moleculares con sus respectivos márgenes de pl: ~43 y 41 kDa con pl entre ~5 a 6.5, así como ~41 kDa con pl ~6.7, en donde posiblemente corresponda a la poligalacturonasa con peso de 43 kDa. Puntos de 30 kDa con pl ~5.7, correspondiente probablemente con Lig v 1 con peso de 29.5 kDa. Puntos de ~19-20 kDa con pl entre ~5 a 6.5, que podría corresponder a Lig v 2, de 14.8 kDa, **7, 9 - 11, 33, 48, 52**.

En el método E, se observan escasos puntos, descritos a continuación: ~38 kDa con pI en ~4.7, ~5.5 a 6.3, y ~8.00, que podría corresponder a la enolasa de 37.38 descrita previamente en polen de Trueno **11, 33**.

En el caso de Trueno, se obtienen por 2-DE más proteínas inmunorreactivas con el método C, respaldando la posibilidad de la necesidad de efectos físicos de gran potencia para la liberación de proteínas alergénicas. Sin embargo, con el método E, pudo ser posible la recuperación de lo que pudiera corresponder a su enolasa, no presente en el método C. Lo que sugiere que pudiera ser necesario el empleo de ambas metodologías para extender las probabilidades de hallar alérgenos gracias a la diversidad de propiedades proteicas que puedan preservarse a lo largo de los diferentes procesos.

10. CONCLUSIONES.

El empleo de la eficacia de la ruptura polínica por método empleado en ambas especies, resulta en su utilidad para la identificación de proteínas en cuestión, ya sea para el proteoma total o el proteoma extrínseco de los granos de polen, además de analizar la naturaleza recalcitrante.

Para Fresno y Trueno, se observó un buen rendimiento con el método C, por posible aumento en la disponibilidad proteica debido a la destrucción de los granos tras someterse a la fuerza mecánica del homogenizador. Lo que posiciona al método C como la mejor opción cuando se busque el mejor rendimiento de proteína total extraída para ambas especies. El método F puede ser otra opción para dicha finalidad.

En ambas especies el método F fue ineficiente en la destrucción de los granos, pero fue uno de los métodos más eficientes en cuantificación proteica total; en Trueno, el mejor junto con C para la identificación de bandas inmunorreactivas. Lo que sugiere que F es el mejor método para el estudio de proteínas extrínsecas del polen en ambas especies, y una opción para el estudio de proteínas inmunorreactivas para Trueno además de C.

En el polen de Fresno, en 1-DE se observó que los métodos E y D^m tuvieron una mayor eficacia en el reconocimiento de bandas inmunorreactivas, superando a C. Lo que los posiciona con opciones para estudios posteriores en la búsqueda de mayor rendimiento en la identificación de bandas inmunorreactivas para esta especie.

En el Trueno, los métodos C y F fueron los mejores en rendimiento de inmunoreactividad. Sin embargo, en el método F fue necesaria una lectura más tardía y edición en la saturación de grises para la identificación de las bandas. En el caso de C, no hubo necesidad de lectura tardía ni de edición para una clara identificación en la mayoría de sus bandas. Por lo que el método C podría tener ventaja sobre F para su uso en búsqueda de proteínas inmunorreactivas a IgE.

En Trueno, para los métodos C y F, fue necesaria una lectura tardía, así como la edición con saturación de grises para la identificación de bandas de bajo peso molecular. Por lo que se sugiere realizar estas estrategias para optimizar la identificación de bandas reactivas en cualquier reproducción de Western-blot.

En Fresno al correr las electroforesis 2-DE, existieron diferencias en la identificación de los puntos reactivos, en conjunto el método C y E tienen cobertura de proteínas inmunorreactivas en pI entre ~4 a 9, sin aparente diferencia entre los pesos moleculares. En el método E, sin puntos entre ~18 a 21 kDa que sugieran Fra e 1, ni homólogos de Ole e 5. Demostrando la importancia de hacer comparaciones entre diferentes metodologías dentro de la misma especie, en este caso se amplía el margen de proteínas inmunorreactivas, por lo que se sugiere adicionalmente el empleo de ambas metodologías (método duro y suave) para esta especie.

En Trueno tras correr 2-DE, existieron diferencias en la identificación de los puntos reactivos, se obtuvieron más proteínas inmunorreactivas con el método C, siendo en toda la extensión el mejor método a emplear para el estudio de esta especie, ya sea para su rendimiento proteico, estudio de calidad e inmunoreactividad al contrastarse con los demás métodos, pues en este caso el método C fue eficaz con el grano recalcitrante. Sin embargo, con el método E, pudo ser posible la probable recuperación de lo que pudiera corresponder a su enolasa. Por lo referido, se respalda la sugerencia de realizar diversas metodologías comparativas dentro de una misma especie.

Nuestro estudio tuvo dos debilidades, la primera fue no haber realizado 2-DE con su correspondiente tinción y realización de Western-blot para mejorar la precisión de nuestros análisis. El segundo punto fue la falta de ejecución de espectrometría de masas, con la finalidad de confirmar las supuestas proteínas en cuestión empatadas en nuestra discusión con lo referido por la literatura.

Se confirma que existen diferencias en la cuantificación proteica, la calidad de la proteína, y la identificación de alérgenos entre diferentes métodos de extracción proteica dentro de una misma especie.

No existe un método universal para el estudio proteómico de los pólenes. Se sugiere realizar un tamizaje con diferentes métodos de extracción proteica, y así analizar la eficacia de los mismos en los granos de cada especie.

11. ANEXO A.

11.1 COTEJO DE BUFFERS A USAR POR CADA MÉTODO DE EXTRACCIÓN PROTEICA.

Por método de extracción con buffer SDS (A).

- Buffer de extracción SDS sacarosa Fenol
- Buffer de precipitación ATC al 20% en acetona
- Lavado acetona fría
- Buffer de hidratación Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, con inhibidores de proteasa

Por método de calentado (B).

- Buffer de extracción con EDTA
- Buffer de precipitación ATC al 20% en acetona
- Buffer de rehidratación: Urea 8M –CHAPS 4%) con inhibidores de proteasas

Por método homogenizador (C).

- Buffer de extracción con EDTA
- Buffer de precipitación ATC al 20% en acetona
- Buffer de rehidratación: Urea 8M –CHAPS 4% con inhibidores de proteasas

Por fenol equilibrado (D°).

- Buffer de fenol equilibrado
- Buffer de precipitación ATC al 20% en acetona
- Lavado con acetona fría
- Buffer de rehidratación: Urea 8M-CH
- 4% con inhibidores de proteasas

Por método de proteoma soluble en agua, mediante preparación del polen con condiciones de lisis suaves PBS (E).

- Buffer PBS con triton al 0.1%
- Buffer de precipitación ATC al 20% en acetona
- Lavado con acetona fría
- Buffer de rehidratación: Urea 8M-CHAPS 4% con inhibidores de proteasas

Por lisis celular y extracción proteica. BIO-RAD. Flujo de trabajo 2-D (F).

- Buffer de extracción Ácido tricloroacético al 20% en acetona con Dithiotreitol (DTT) 0.2%
- Solución de lavado acetona con 0.2% DTT
-

11.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA METODOLOGIAS DE EXTRACCIÓN PROTEICA.

Solución de lavado: Acetona 100 % fría, refrigerar 120 mL de acetona a -20°C.

Phosphate buffered saline (PBS) preparado: 1 tableta x c/200 mL de gua deionizada: en un litro 5 tabletas.

SDS al 20%: a preparar 10 mL.

- SDS: 2 g
- H₂O: 10 mL

Tris-HCL 1M: a preparar 20 mL

- Tris-HCL: 3.152 g
- DiH₂O: 20 mL

NaCL 1M: a preparar 20 mL

- NaCL: 1.168 g
- diH₂O: 20 mL

EDTA 500 mM: a preparar 20 mL

EDTA tiene una molaridad de 372.2 M (372.2 g/L) $\square 372.2 \div 2$ para que quede medio soluto molar en 1L diluido = 186.1M (a 500mM)

186.1 M-----1000 mL

X M-----20 mL

X= 3.722g a diluir en 20 mL de agua.

Inhibidor de proteasa 5X:

- 1 tableta de inhibidor de proteasa
- 2 mL de H₂O estéril

Buffer de precipitación a preparar 200 mL: Ácido tricloroacético al 20% en acetona.

- ATC: 40 mL o 40 g
- Acetona: aforar a 200 mL
- Refrigerar a -20°C

Buffer de hidratación (BH) a preparar 20 mL: Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, con inhibidores de proteasa

- H₂O: 20 mL
- Urea: 8.414 g
- Tiourea: 3.044 g
- CHAPS: 0.4g

- Inhibidor de proteasa: 2 tabletas
*1 tableta por cada 10 mL de solución. (son 20 mL de volumen proyectado)
- Preparar alícuotas de 1 mL (20 alícuotas)
- Almacenar a -20°C

Buffer's que pueden resguardarse:

Buffer fenol equilibrado con triton al 0.1% (para método D) Fenol: <u> </u> mL Triton X100: <u> </u> mL	Buffer PBS con triton al 0.1% (para método E). Hacer 10mL Fosfato Salino Tamponado: <u>10 mL</u> Triton X100: <u>10 µl</u>
---	--

Buffer's que deben prepararse al momento "En fresco":

SDS-Sacarosa-Fenol (para método A) SDS 20%: <u>1 mL</u> DiH ₂ O: <u>aforar a 10 mL</u> Sacarosa: <u>3 g</u> 2 mercapto-etanol (ME): <u>0.2 mL</u> Tris-HCL: <u>0.121 g</u>	Buffer de extracción (para método B y C) [Vol:2mL] Tris-HCL 1M pH 7.5: <u>100 µl</u> NaCL 1M: <u>300 µl</u> Triton X100 al 100%: <u>10 µl</u> EDTA 500mM: <u>8 µl</u> Inhibidores de proteasa 5X: <u>100 µl</u> H ₂ O: <u>1,492 µl</u>
---	---

Solución de extracción ATC al 20% y DDT 0.2% (método F) vol total 10ml

ATC 20%: 10 mL
 DTT 1M: 20 µl

12. ANEXO B.

12.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA METODOLOGÍA.

Laemmli buffer 5X, para preparar 15 mL.

1.5 M Tris-HCL, pH 6.8	4 mL
Glicerol	10 mL
SDS 20%	2 g
Azul bromofenol 1%	1 mL

Solución de tinción Coomassie; 0.1% Azul Coomassie R250 w/v. 40% metanol, 10% ácido acético.

Azul brillante Coomassie R250	1.0 g
Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	400 mL
diH ₂ O	1 litro

Solución para desteñir.

Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	300 mL
diH ₂ O	1 litro

Buffer de corrida 10x SDS-PAGE. 250 mM Tris-HCL, 1.92 M glicina, SDS 1%, pH 8.3.

Tris base	30.30 g
Glicina	144.10 g
SDS	10.00 g
diH ₂ O	1 L

Buffer de corrida 1x. Para preparar 500 mL.

Buffer de corrida 10x	50 mL
diH ₂ O	450 mL

Buffer de transferencia 1x con metanol al 20%. Para preparar 500 mL.

Buffer de corrida 1x	400 mL
Metanol	100 mL

PBS con Tween al 0.05%. Para preparar 500 mL.

PBS	500 mL
Tween	250 µl

BSA al 5%. Preparación de 30 mL.

PBS	Aforar a 30 mL
BSA	1.5 g

Anticuerpo secundario 1:1000. Preparación de 10 mL. para tener 1µg/ mL.

Anticuerpo monoclonal de ratón 1mg/mL	10 µl
PBS	10 mL

Sustrato de unión. Volumen total de 4 mL. reagente A 40:1 Reagente B.

Reagente A	3,902.4 µl
Reagente B	97.5 µl

Buffer de carga IEF. DTT 20 mM, anfolitos 0.5 a 1%. Azul bromofenol 0.0016%.

DTT 1 M	2.5 µl
Anfolitos	0.625 a 1.25 µl
Azul bromofenol 0.1%	2 µl
Buffer de rehidratación	Aforar a 125 µl

Buffer de equilibrio (Stock). 6 M Urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS (w/v), glicerol 30% (w/v), azul bromofenol (0.002%). Guardar en congelación.

Urea	18 g
Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.67 µl
SDS	1 g
Glicerol	15 g
Azul bromofenol 1%	100 µl
diH ₂ O	Aforar a 50 mL

Buffer de equilibrio I: adicionar 100 mg de DTT 1% a 10 mL de buffer de equilibrio stock.

Buffer de equilibrio II: adicionar 250 mg de iodoacetamida 2.5% a 10 mL de buffer de equilibrio stock.

Para obtención de dos geles, se prepara en tubo de 15 mL Falcon.

	Gel concentrador al 4%	Gel de revelado al 13%
Acrilamida 30%	666 µl	4.33 mL
Tris-HCL 0.5M - pH 6.8	1.26 mL	-
Tris-HCL 1.5M - pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	50 µl	100 µl
DiH₂O	3.0 mL	3.02 mL
TEMED	5 µl	5 µl
Amonio persulfato APS 10%	25 µl	50 µl
Volumen total	5 mL	10 mL

13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., & Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123(3), 558–566.
2. Valero Santiago, A., Cadahía, A., & Armentia Medina, A. (2005). *Manual abreviado de polinosis II*. 1st ed. Barcelona: MRA.
3. Smith, M., Berger, U., Behrendt, H., & Bergmann, K. C. (2014). Pollen and pollinosis. *Chemical immunology and allergy*, 100, 228–233.
4. Weber R. W. (1998). Pollen identification. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 80(2), 141–147.
5. Darnhofer, B., Tomin, T., Liesinger, L., Schittmayer, M., Tomazic, P. V., & Birner-Gruenberger, R. (2021). Comparative proteomics of common allergenic tree pollens of birch, alder, and hazel. *Allergy*, 76(6), 1743–1753.
6. Morfín-Maciél, B. M., Flores, I., Rosas-Alvarado, A., Bautista, M., & López-López, J. R. (2009). Sensibilización a pólenes de la familia Oleaceae en un grupo de pacientes de la Ciudad de México [Sensitization to pollens of Oleaceae family in a group of patients from Mexico City]. *Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)*, 56(6), 198–203.
7. Vara A, Fernández-González M, Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ. Oleaceae cross-reactions as potential pollinosis cause in urban areas. *Sci Total Environ*. 2016 Jan 15;542(Pt A):435-40.
8. Lewis, W. H., & Vinay, P. (1979). North American pollinosis due to insect-pollinated plants. *Annals of allergy*, 42(5), 309–318.
9. Berghi NO. Oleaceae pollen allergy and its cross-reactivity in the mediterranean area in the context of globalization. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014 Aug;13(4):290-5.
10. Batanero E, Gonzalez De La Peña MA, Villalba M, Monsalve RI, Martin-Esteban M, Rodríguez R. Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin Exp Allergy*. 1996 Dec;26(12):1401-10.
11. Robledo-Retana T, Mani BM, Teran LM. *Ligustrum* pollen: New insights into allergic disease. *World Allergy Organ J*. 2020 Feb 5;13(2):100104.
12. Patterson R. (1974). Rhinitis. *The Medical clinics of North America*, 58(1), 43–54.
13. Pointner, L., Bethanis, A., Thaler, M., Traidl-Hoffmann, C., Gilles, S., Ferreira, F., & Aglas, L. (2020). Initiating pollen sensitization - complex source, complex mechanisms. *Clinical and translational allergy*, 10, 36.
14. Vara A, Fernández-González M, Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ. Fraxinus pollen and allergen concentrations in Ourense (South-western Europe). *Environ Res*. 2016 May;147:241-8.
15. Teresa, A., Miguel A., (2002). POLINOSIS, POLEN Y ALERGIA. Volumen 1. 1er Ed. Santiago. ALV, editor. Barcelona, España.: Laboratorios MENARINI.
16. MC calderon-ezquerro, c guerrero-guerra, et al. (2018) Pollen in the atmosphere of mexico city and its impact on the health of the pediatric population. *Atmospheric environment*, 198-208.
17. Rosas-Alvarado, A., Bautista-Huerta, M., & Velázquez-Sámamo, G. (2011). Atlas de los pólenes alergénicos de mayor relevancia en México [Atlas of the most important

- allergenic pollens in Mexico]. *Revista alergía Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)*, 58(3), 162–170.
18. Ghiani, A., Ciappetta, S., Gentili, R., Asero, R., & Citterio, S. (2016). Is ragweed pollen allergenicity governed by environmental conditions during plant growth and flowering?. *Scientific reports*, 6, 30438.
 19. Kuo, C. R., Chan, R., & Lipworth, B. (2019). Does unified allergic airway disease impact on lung function and type 2 biomarkers?. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 15, 75.
 20. Johnson, J. R., & Harker, J. A. (2017). Allergic Airway Disease: More than Meets the IgE?. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 57(6), 631–632.
 21. Vega, F., Panizo, C., Dordal, M. T., González, M. L., Velázquez, E., Valero, A., Sánchez, M. C., Rondón, C., Montoro, J., Matheu, V., Lluch-Bernal, M., González, R., Fernández-Parra, B., Del Cuvillo, A., Dávila, I., Colás, C., Campo, P., Antón, E., Navarro, A. M., & Rhinoconjunctivitis Committee of Spanish Society of Allergology, Clinical Immunology (SEAIC) 2010 (2016). Relationship between respiratory and food allergy and evaluation of preventive measures. *Allergologia et immunopathologia*, 44(3), 263–275.
 22. Asha'ari, Z. A., Suhaimi, Y., Yusof, R. A., Rushdan, I., & Maraina, C. H. (2011). Comparison of serum specific IgE with skin prick test in the diagnosis of allergy in Malaysia. *The Medical journal of Malaysia*, 66(3), 202–206.
 23. Blanco Quirós, A., Castro, J., & Tellería, J. J. (1998). Fundamentos biológicos y genéticos de la atopia y el asma [Biological and genetic basis of atopy and asthma]. *Allergologia et immunopathologia*, 26(2), 59–73.
 24. Kemp, A., & Björkstén, B. (2003). Immune deviation and the hygiene hypothesis: a review of the epidemiological evidence. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 14(2), 74–80.
 25. Liccardi G, D'Amato M, D'Amato G. Oleaceae pollinosis: a review. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Nov;111(3):210-7.
 26. Bousquet, J., Anto, J. M., Bachert, C., Baiardini, I., Bosnic-Anticevich, S., Walter Canonica, G., Melén, E., Palomares, O., Scadding, G. K., Togias, A., & Toppila-Salmi, S. (2020). Allergic rhinitis. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 95.
 27. Imai, T., Chantry, D., Raport, C. J., Wood, C. L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., & Gray, P. W. (1998). Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 273(3), 1764–1768.
 28. Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem*. 1997 Jun 6;272(23):15036-42.
 29. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Förster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., & Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*, 406(6793), 309–314.
 30. Adkinson, N., Bochner, B., Burks, A., Busse, W., Holgate, S., Lemanske, R. and O'Hehir, R., 2014. *Middleton's allergy*. USA: Saunders.
 31. Wang, H., Zang, C., Liu, X. S., & Aster, J. C. (2015). The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *Journal of cellular physiology*, 230(5), 982–988.

32. Barnes P. J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*, 242(1), 31–50.
33. Mani, B. M., Huerta-Ocampo, J. A., Garcia-Sanchez, J. R., Barrera-Pacheco, A., de la Rosa, A. P., & Teran, L. M. (2015). Identification of Ligustrum lucidum pollen allergens using a proteomics approach. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(4), 788–792.
34. Documentos técnicos de Salud Pública. (2022). Atlas y calendario polínico de la Comunidad de Madrid Fraxinus - Fresno [Ebook]. España. Obtenido de <https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/aerobiologia-polen-esporas>.
35. Campos-Trujillo, A., Aguirre-Prieto, A., Muñoz-Romero, G., Rodríguez-Villa, M., Quintana-Martínez, G. (2015). Estudio palinológico de la flora urbana de la ciudad de Chihuahua, México. *Acta Botánica Mexicana*, 113: 111-134.
36. Chapman, M. D., Pomés, A., Breiteneder, H., & Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 119(2), 414–420.
37. Emanuelsson, C., & Spangfort, M. D. (2007). Allergens as eukaryotic proteins lacking bacterial homologues. *Molecular immunology*, 44(12), 3256–3260.
38. Bostock J. (1819). Case of a Periodical Affection of the Eyes and Chest. *Medico-chirurgical transactions*, 10(Pt 1), 161–165.
39. Ring, J., & Gutermuth, J. (2011). 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy*, 66(6), 713–724.
40. Morales-Amparano, M. B., Valenzuela-Corral, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Vázquez-Moreno, L., Escobedo-Moratilla, A., Pastor-Palacios, G., Ovando-Vázquez, C., Teran, L. M., & Huerta-Ocampo, J. Á. (2021). Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen. *Journal of proteomics*, 248, 104348.
41. Poncet, P., Senechal, H., Clement, G., Purohit, A., Sutra, J. P., Desvaux, F. X., Wal, J. M., Pauli, G., Peltre, G., & Gougeon, M. L. (2010). Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients. *Allergy*, 65(5), 571–580.
42. M. Héctor, Benavides Meza. (1992). Current situation of the urban forest in Mexico City, *J. Arboric.* 18, 33 – 36.
43. Robledo-Retana T, Zenteno E, Agundis-Mata M.C, Pereyra-Morales M.A, Calderón-Segura M.E, Calderón-Ezquerro M.C. (2015). Detection of immunogens from Fraxinus spp. pollen grains. *Aerobiologia*, 31: 403–410.
44. ESPINOSA S, MEZA M.R, OROZCO S, ROSALES M, ORTEGA-MARTELL J.A, HUERTA J. Sensibilización temprana a aeroalérgenos en una población pediátrica mexicana. *Alergia, Asma e Inmunol Pediatr* 1999; 8(6): 165-169.
45. Weber RW. White ash, Fraxinus americana. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 Mar;90(3):A6. doi: 10.1016/s1081-1206(10)61791-7.
46. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;115(2):351-7.
47. Mas, S., Torres, M., Garrido-Arandia, M., Salamanca, G., Castro, L., Barral, P., Purohit, A., Pauli, G., Rodríguez, R., Batanero, E., Barderas, R., & Villalba, M. (2014). Ash pollen

- immunoproteomics: identification, immunologic characterization, and sequencing of 6 new allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 133(3), 923–6.e3.
48. <http://allergen.org/>
 49. Niederberger, V., Purohit, A., Oster, J. P., Spitzauer, S., Valenta, R., & Pauli, G. (2002). The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 32(6), 933–941.
 50. <https://www.naturalista.mx/taxa/54806-Fraxinus>
 51. Hemmer W, Focke M, Wantke F, Götz M, Jarisch R, Jäger S, Götz M. Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy*. 2000 Oct;55(10):923-30.
 52. Baldo, B. A., Panzani, R. C., Bass, D., & Zerboni, R. (1992). Olive (*Olea europea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. *Molecular immunology*, 29(10), 1209–1218.
 53. Abdoli Sereshki H, Falak R, Assarehzadegan MA, Nabavi M, Shams MH, Ranjbar M. Immunochemical Characterization of *Ligustrum Vulgare* (Privet) Pollen Allergens: Study of Common Allergenic Plant in Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2022 Feb 6;21(1):55-64.
 54. Kernerman, S. M., McCullough, J., Green, J., & Ownby, D. R. (1992). Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet, and Russian olive tree pollen allergens. *Annals of allergy*, 69(6), 493–496.
 55. Zienkiewicz, A., Rejón, J. D., de Dios Alché, J., Rodríguez-García, M. I., & Castro, A. J. (2014). A protocol for protein extraction from lipid-rich plant tissues suitable for electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1072, 85–91.
 56. Westreich, L. R., & Tobin, P. C. (2021). Comparison of Pollen Grain Treatments Without Mechanical Fracturation Prior to Protein Quantification. *Journal of insect science (Online)*, 21(4), 3.
 57. Shahi, S., Katiyar, R. K., Bhatnagar, A. K., & Singh, A. B. (2008). Soluble and nonsoluble protein assay for antigenic extracts from pollen and seeds of mustard (*Brassica spp.*). *Allergy and asthma proceedings*, 29(1), 78–87.
 58. Salazar Mallén, M. (1958). *La alergia en la teoría y en la práctica* (1st ed.). México: Mendez Oteo.
 59. Shahali, Y., Sénéchal, H., & Poncet, P. (2019). Double One-Dimensional Electrophoresis (D1-DE) Adapted for Immunoproteomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1871, 133–141.
 60. Saravanan, R. S., & Rose, J. K. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9), 2522–2532.
 61. Dubravko P., Bojana K., & Marijana K.R. (2012). Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues. *Croat. Chem. Acta* 85 (2), 177–183.
 62. Sagu, S. T., Huschek, G., Homann, T., & Rawel, H. M. (2021). Effect of Sample Preparation on the Detection and Quantification of Selected Nuts Allergenic Proteins by LC-MS/MS. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4698.
 63. Walker, J. M. (Ed.). (2005). *The proteomics protocols handbook*. Humana press.
 64. von Hagen, J. (Ed.). (2008). *Sample preparation by proteomics*. John Wiley & Sons.

65. Thompson J.D., Schaeffer-Reiss Christine & Veffing M. (2008). Functional proteomics: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
66. Westernmeier R., Naven T., Höpkr H.-R. (2008). *Proteomics in practice: A guide to successful experimental design*. Wiley-VCH.
67. BIO-RAD. 2-D Electrophoresis Workflow How-to Guide, Part II, Methods, Chapter 8. Sample preparation, Cell lysis and Protein Extraction Procedures. Fourth edition. 81. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2651.pdf
68. Goldring J. (2019). Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 31–39.
69. Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(4), 102269.
70. Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (38), 1918.
71. SIGMA-ALDRICH. *TECHNICAL BULLETIN Bradford Reagent Catalog Number B6916*.
72. Pramanik Birebdra N., Ganguly A.K. & Gross M.L. (2002). Applied electrospray mass spectrometry. Marcel Dekker, Inc.
73. Khan Academy en Español. (2019). Introducción a la espectrometría de masas [Video]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=I9q9KzYfQFM>
74. Ankit Sinha, Matthias Mann (2020). A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Biochem*; 42 (5): 64–69.
75. Guerin JS, Murray DW, µgrath MM, Yuille MA, McPartlin JM, Doran PP. (2010). Molecular Medicine Ireland Guidelines for Standardized Biobanking. *Biopreservation % Biobanking*. 2010; 8 (1).
76. Pitt K et al. (2008). Best practices for repositories: collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research, 2nd edn. *Cell Preserv Tech* 6(1):5-58.
77. Bench to Beside Pres. (2011). *The Handy Little Book of Proteomics Protocols: Methods for Biomarker Identification and Validation* (1st ed.). Baltimore.
78. Faurobert, M., Pelpoir, E., & Chaïb, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 355, 9–14.
79. Thermo Scientific. (2020). Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Retrieved from https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
80. GOLDBIO. (2016). Protocolo SDS-PAGE unidimensional . Retrieved from <https://www.goldbio.com/documents/3922/One-Dimensional%20SDS%20Gel%20Electrophoresis%20of%20Proteins.pdf>
81. BIO-RAD. Hand cast polyacrylamide gels - Bulletin 6201. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6201.pdf
82. BIO-RAD. A guide to Polyacrylamide Gel and Electrophoresis and Detection – Bulletin 6040. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
83. BIO-RAD. Mini-PROTEAN Tetra Cell Instruction Manual. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>

84. BIO-RAD. (2022). *Electrophoresis Acrylamide Polymerization – A Practical Approach – tech note 1156* [Ebook]. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1156.pdf
85. Golden Biotechnology. Escalera de proteínas BLUEstain™ [libro electrónico] (pág. 1). San Luis, MO. Obtenido de https://www.goldbio.com/documents/1120/P007-Technical_Data_Sheet.pdf
86. He, F. (2011). Coomassie Blue Staining. Bio-101: e78. DOI: 10.21769/BioProtoc.78. obtenido de <https://bio-protocol.org/bio101/e78>
87. BIO-RAD. (2022). Clarity and Clarity Max Western ECL Substrates - Instruction Manual [Ebook]. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/D085075.pdf>
88. ThermoFisher Scientific. (2021). *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate - USER GUIDE* [Ebook]. Carlsbad, CA 92008 USA. Retrieved from https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011810_Pierce_ECL_Plus_West_Blotting_Sub_s_UG.pdf
89. BIO-RAD. (2022). *Electrophoresis and Blotting - Protein Blotting Guide*. [Ebook]. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf
90. BIO-RAD. (2022). *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell - Instruction Manual- Catalog Number 170-3940* [Ebook]. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703940.pdf>
91. BIO-RAD. (2011). 2-D Electrophoresis: First-Dimension Separation Protocol. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6240.pdf
92. BIO-RAD. 2-D Electrophoresis Workflow – Bulletin 6478. Retrieved from https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6478.pdf
93. BIO-RAD. ReadyStrip Instruction Manual – Catalog 163-2099. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006166G.pdf>
94. BIO-RAD. 2-D Electrophoresis for proteomics-Second Generation Separation Methods – Bulletin 6222. Retrieved from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6222.pdf
95. Bio-Rad Laboratories. (2012). Loading the PROTEAN® i12™ IEF System - Gel-Side Down Assembly [Video]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=NGfd3UzIQL4>
96. Bio-Rad Laboratories. (2012). Loading the PROTEAN® i12™ IEF System - Gel-Side Up Cup Loading Assembly [Video]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=45G63IOAS-U>
97. Bio-Rad Laboratories. (2012). How to Run a 2-D Electrophoresis Gel from Start to Finish. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=3wFh0z7so8w>