



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**Purificación del alergeno β -1,3-glucanasa obtenido
del árbol *Hevea brasiliensis* y producción del
anticuerpo policlonal contra este alergeno.**

T E S I S

Que para obtener el título de

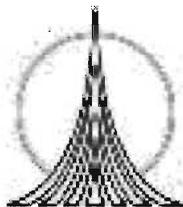
Q u í m i c o F a r m a c é u t i c o B i ó l o g o

Presenta:

G o n z á l e z G a r c í a M e r c e d e s

Directora de Tesis: Dra. Adela Rodríguez Romero

Asesora de Tesis: M en C. Rosalinda Escalante Pliego



Ciudad Universitaria, México DF.,

2005.

M342812



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA TESIS

Este trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Bioquímica 2 del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química en Ciudad Universitaria.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por permitirme desarrollar este trabajo en su laboratorio y por su asesoría.

A la M en C. Rosalinda Escalante Pliego, por su apoyo a lo largo de todo este proyecto.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura, por su tiempo, comentarios y apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio, QFB. Martha Pedraza, Dr. César Reyes y a la M en C. Deyanira Fuentes por el apoyo y la asesoría brindada.

Al Instituto de Química, por abrirme sus puertas y permitirme finalizar mi carrera.

A la Facultad Estudios superiores Zaragoza, por permitir mi desarrollo a lo largo de mi carrera y encaminar mi vida profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa.

DEDICATORIAS

A mi Padre, Ismael González Partida, por ser la enorme persona que es para mí, en cualquier tiempo, en cualquier época, siempre serás el mejor, créeme.

A mi Madre, María del Carmen García Mondragón, por mostrarme la fortaleza de tu sonrisa y la bondad de tus ojos siempre.

A mis hermanos, Luis, Ismael y Otilia Marisol, por compartir el principio del tiempo y por tener la fe de observarme hasta el final.

A mis amigos, Marisol, Ariadna, Víctor, Diego, Rodolfo, Luis Miguel, Adrián, Juan Alpuche, ya sea al inicio o al final siempre valieron sus palabras y se escribieron en mis días.

A Priscilla Correa Jaque, mi chilena, me mostraste la poca distancia entre dos personas con la misma tierra en los pies, el valor, el coraje y la constancia de un alma.

A ustedes, Sra. Elena García, Sr. José Cermeño, Rubén Cermeño, Juan Gómez, Angélica Cermeño, Lety y Toño, por darme el calor de su compañía en el frío de aquellos días.

A Marco Antonio Segundo (Don Toño), por la franqueza de los tiempos que nos unen, agradezco a su persona en mis recuerdos y en las imágenes presentes.

Raúl, gracias por sujetar mi existencia antes de quebrarse, para sostenerme en mi destino, sin importar la poca esperanza de soldar mis huesos, pero con la enorme certeza de que tú lo lograrías.

Te agradezco a ti, Amor, por creer en mí, por apostarle a esta vida conmigo y agradezco a lo grande de las existencias eternas, por mostrarme a la persona que me volcó con solo mirarme y me ha hecho amarrar mi vida aunque los lazos lastimen. TE AMO con un dolor, con lagrimas, con risas, con fuerza, con certeza, por un pasado, por un presente y por un futuro.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
	2.1. Generalidades.	2
	2.2. Látex (<i>Hevea brasiliensis</i>).	3
	2.3. β -1,3glucanasa.	6
	2.4. Alergia.	7
	2.5. Síndrome látex frutas.	9
	2.6. Anticuerpos policlonales.	12
	2.7. Producción de anticuerpos policlonales.	14
3.	JUSTIFICACIÓN	16
4.	HIPÓTESIS	17
5.	OBJETIVOS	18
6.	METODOLOGÍA	19
	6.1. Purificación de la proteína β -1,3-glucanasa.	19
	6.2. Actividad de β -1,3-glucanasa	20
	6.3. Producción del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 de conejo	21
	6.4. Titulación del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 por ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).	22
	6.5. Identificación y determinación del peso molecular de las proteínas reconocidas por el. anti-Hev b 2 por Western blot	23
7.	ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	24

7.1. Purificación de la β -1,3-glucanasa.	24
7.2. Obtención y titulación del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2.	29
7.3. Western blot	30
8. CONCLUSIONES	34
9. BLIBIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

Se purificó a la enzima β -1,3-glucanasa, del látex del árbol *Hevea brasiliensis* o árbol del hule. Esta enzima, es uno de los alérgenos más importantes del hule natural y se clasifica como Hev b 2. Se sabe que esta proteína, se conserva después de los procesos de manufactura en los materiales producidos con hule natural, además de ser una posible candidata en la reacción cruzada entre el hule natural y diversas frutas (síndrome de látex-frutas). En este trabajo, se obtuvo un anticuerpo policlonal de conejo contra esta proteína, con la finalidad de identificar su participación en la alergia al látex y su presencia en extractos de otras plantas y frutas. El látex se recolectó en el campo experimental El Palmar, Veracruz. Al someterse a ultracentrifugación, se separaron tres fases; la goma, el suero B o sedimento y el suero C. Para la extracción de la proteína β -1,3-glucanasa se utilizó el sedimento, el cual se homogenizó con una solución de NaCl 0.35 M; posteriormente se centrifugó y se realizó una reextracción del sedimento en las mismas condiciones. Los dos sobrenadantes se mezclaron y se dializaron contra agua por 48 h. El extracto dializado se centrifugó y el sedimento se resuspendió en la misma solución. Se probó la actividad enzimática con el reactivo laminarina. El extracto dializado se aplicó a una columna de exclusión molecular en el equipo de FPLC (Fast Protein Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography). La fracción con actividad de glucanasa, se aplicó a una columna de afinidad de Con A (Concanavalina A). La fracción con actividad de glucanasa, unida a esta columna, se inyectó en una columna de exclusión molecular y se separó la fracción que contenía a la enzima. Para determinar la pureza y masa molecular de esta enzima, se hizo un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes. El alérgeno Hev b 2 puro se inoculó en un conejo de 2 Kg de la raza Nueva Zelanda, para obtener así los anticuerpos policlonales contra este alérgeno. Se realizó un sangrado preinmune y posteriormente se hicieron cuatro inoculaciones de Hev b 2, la primera se realizó con adyuvante completo de Freund y la proteína disuelta en amortiguador de fosfato salino (PBS). Las dos siguientes inoculaciones se llevaron a cabo con adyuvante incompleto de Freund y la proteína disuelta en el mismo amortiguador. La última inoculación, se hizo con adyuvante completo. En las tres primeras inmunizaciones se dejaron dos semanas entre cada una y en la última un mes. Para determinar el título del anticuerpo en el suero después de las inoculaciones, se llevaron a cabo pruebas de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). El título para el primer suero fue de 1/146,000, y de 1/818,000 para el segundo suero. Se realizó la técnica de Western blot para comprobar que el policlonal anti-Hev b 2 reconoce a una proteína con una masa molecular igual a la reportada para la β -1,3-glucanasa en el extracto total de hule natural. Se obtuvieron extractos de aguacate, kiwi y agave; para probar el policlonal anti-Hev b 2 contra estos extractos. En el extracto de aguacate, se observó el reconocimiento de diversas proteínas por parte del policlonal, entre ellas, una con masa molecular igual a la reportada para la β -1,3-glucanasa. En el extracto de agave, el policlonal reconoció proteínas con una masa molecular superior que la de β -1,3-glucanasa. Al realizar una comparación con el policlonal anti-Hev b 6.02, este último reconoce proteínas de masa molecular baja en el extracto de agave; mientras que el anti-Hev b 2 reconoce proteínas de mayor masa molecular en el mismo extracto. Se piensa entonces que el anti-Hev b 2 reconoce proteínas tanto en el extracto de aguacate como en el de agave que pueden ser β -1,3-glucanasas debido a la cercanía de su peso molecular, con el reportado para esta enzima.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades

El hule natural, es un material que gracias a sus propiedades elásticas y de barrera impide el contacto con cualquier sustancia, incluso evita la penetración de virus, sirviendo de alternativa a materiales como silicón y vinilo (Perkin, 2000), para la elaboración de más de 40 000 productos (Álvarez, 2002) como: guantes, material quirúrgico, condones, globos, etc., En general estos productos raramente producen problemas; como son las hipersensibilidades o alergias, excepto en pacientes extremadamente sensibilizados o con una predisposición genética.

La incidencia de alergia al látex ha aumentado en los últimos años; esto se ha explicado por el mayor uso de guantes por los profesionales sanitarios como medida de profilaxis de enfermedades infecciosas virales, el uso de material quirúrgico elaborado con este material, así como el aumento del empleo de los preservativos y otros productos de uso cotidiano. Una exposición repetida a productos de látex por motivos laborales o por intervenciones quirúrgicas así como una predisposición, son los principales factores de riesgo.

Entre los grupos de riesgo definido, se tiene a los pacientes que requieren cirugías múltiples, con un riesgo del 25-75 %, dada su exposición frecuente a material quirúrgico elaborado con este material. En segundo lugar se encuentran los trabajadores del área de la salud como: enfermeras, cirujanos, camilleros, etc., con un riesgo estimado del 30%. En los trabajadores de la industria del hule, la incidencia es del orden del 18-37% (Perkin,

2000). Por otra parte, en los adultos donadores de sangre reportan una frecuencia del 6%, mientras que en la población en general la incidencia es del 2.3% (Rihs et al., 2003).

Los pacientes alérgicos al látex pueden ser alérgicos también a algunos alimentos como frutas y vegetales, especialmente a: plátanos, aguacates, castaña, kiwi, tomate, papa (Perkin, 2000) y el pimiento (Perales et al., 1998); así como a árboles ornamentales, tales como: *Ficus benjamina*, *Ficus religiosa* y *Ficus eslatica* (Subiza, 1999).

Para el desarrollo de métodos de diagnóstico y prevención a la alergia al látex y sus posibles reacciones cruzadas, se ha llevado a cabo tanto la purificación, caracterización, secuenciación, clonación de los alergenos, así como la realización de pruebas de inhibición entre estos para evaluar su participación en la alergia al látex y el síndrome látex-frutas, y de esta manera colaborar con el mejoramiento de la salud de los pacientes alérgicos a este material.

2.2. Látex (*Hevea brasiliensis*)

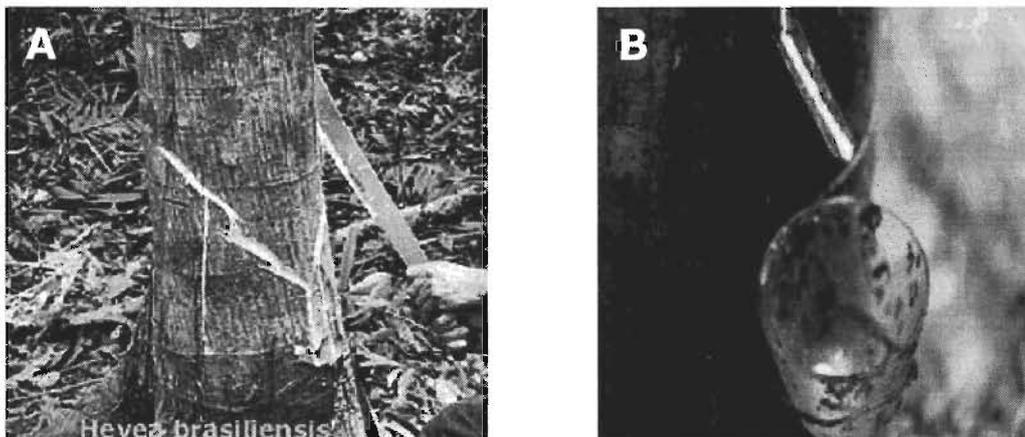


Figura 1. Corte transversal realizado al árbol del hule. B) Recolecta del látex.

Aproximadamente, cerca de 2000 plantas producen látex, sin embargo, más del 99% del utilizado en la industria es originario del árbol *Hevea brasiliensis* o árbol del hule (Sussman et al., 2002). El látex, es la savia lechosa proveniente del citoplasma de las células laticíferas de este árbol y se obtiene practicando un corte transversal al tronco (figura 1A y 1B).

El látex se compone principalmente del polímero cis-1,4-poliisopreno (20-45%) con un contenido proteínico del 1-1.8% (Sussman et al., 2002), el cual depende de varios factores como: la genética, la química y el tipo árbol, además del clima donde se encuentre. En la fracción proteica, se encuentran aproximadamente 240 proteínas de las cuales 16 se han identificado como alérgenos (tabla 1) y cuya asignación oficial está dada por el Comité Internacional de Nomenclatura de Alérgenos (Sussman et al., 2002). El látex contiene también lípidos, carbohidratos y muchos componentes inorgánicos como: potasio, manganeso, calcio, sodio, zinc, cobre y hierro (Sussman et al., 2002).

Tabla 1. Alergenos presentes en el látex

<u>Alergenos del látex.</u>	<u>Masa molecular (kDa.)</u>	<u>Proteína y su función biológica.</u>	<u>Nivel como alérgeno del látex.</u>	<u>Participación en la RC.</u>	<u>Unión a IgE del alérgeno del látex.</u>
Hev b 1	14.6	REF del hule natural	Alta (especialmente con SB)	No observado	HCW: 55/105 (52%) SB: 56/69 (81%)
Hev b 2	34-36	β -1,3-glucanasa	Mediana	Mediana	HCW: 20/31 (65%) SB: 7/13 (54%)
Hev b 3	24-27	Partícula de proteína en el hule natural	Alta (especialmente con SB)	No observado	HCW: 13-20% SB: 76-78%
Hev b 4	50-57	β -glucosidasa (componente del complejo de micro hélice)	No determinada	No observado	Resultados no aclarados
Hev b 5	16-24	Proteína estructural ácida	Alta grupos de alto riesgo, HCW, (SB), tópicos	No observado (estructura homóloga con la proteína del kiwi)	HCW: 68-92% SB: 35-56%
Hev b 6.01	20	Proheveína (precursor de la heveína)	Alta grupos de alto riesgo, HCW, SB, atópicos	Alta (especialmente con plátano, kiwi y aguacate)	LAP: 15/20 (75%) LAP: 24/29 (83%)
Hev b 6.02	4.7	Heveína	Alta grupos de alto riesgo, HCW, SB, atópicos	Alta (con plátano, kiwi, aguacate, etc.) mayor unión al epitopo de IgE)	LAP: 24/43 (56%) HCW: 48/64 (75%) SB: 3/11 (27%)
Hev b 6.03	14	Dominio-C de la proheveína	Alta en contexto con Hev b 6.01	Alta (homología con la proteína de stress de las plantas)	LAP: 3/20 (15%) LAP: 11/52(21%)
Hev b 7.01	42	Proteína que une patatina (Esterasa) del suero-B del látex	Bajo-Medio	(homología a la proteína de papa y tomate no RC con aguacate y plátano)	LAP: 4/36 (11%) LAP: 17/35 (49%)
Hev b 7.02	44	Une patatina (Esterasa) del suero-C del látex	Medio (únicamente en SB)	Véase Hev b 7.01	SB: 15/38(39.5%)
Hev b 8	14	Profilina (Proteína que une actina)	Bajo	Mediana (panalérgeno)	LAP: 2/19 (11%) HCW: 20-24% SB: 6-12%
Hev b 9	51	Enolasa	Bajo	Mediana (RC con moho)	LAP: 16/110 (15%)
Hev b 10	26	Manganeso (Mn) superóxido dismutasa (MnSOD)	Bajo	Mediana (RC con moho)	HCW: 0/20, SB: 2/20 LAP: 4/15 (27%)
Hev b 11	32	Quitinasa de clase 1	Bajo	Alta (RC con frutas y alergenos especialmente con secuencia de heveína)	LAP: 10/57 (19%) LAP: (53 HCW, 5SB): 17/58 (29%)
Hev b 12	9	Proteína acarreadora de lípidos	Bajo	Mediana Panalérgeno; RC con frutas	LAP: 9/37 (24%)
Hev b 13	42	Esterasa	Alto	No determinada	HCW: 39/62 (63%)

LAP: Pacientes alérgicos al látex, HCW: Trabajadores de la salud, SB: Pacientes con espina bífida, RC: Reacción cruzada, REF: Factor de elongación.

Al llevarse a cabo la ultracentrifugación del látex se forman tres fases: la de goma, la del suero C (citosol) y la del suero B o sedimento, en el cual se encuentran los cuerpos lútosos (ver figura 2).

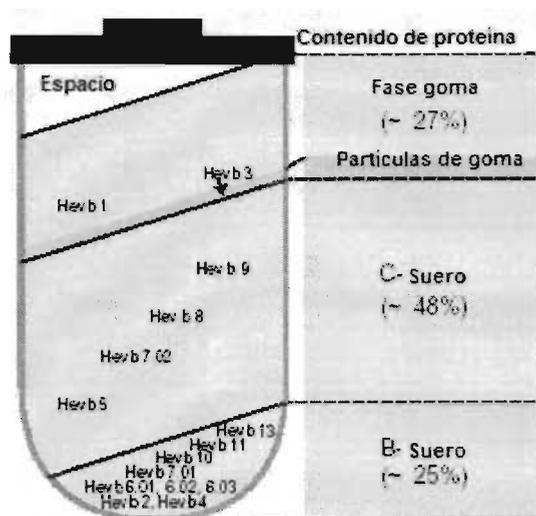


Figura 2. Fases del látex después de una centrifugación a 55 000 g

2.3. β -1,3-glucanasa

Un alérgeno importante del látex es la β -1,3-glucanasa (Hev b 2), la cual participa como proteína de defensa en el árbol y en la coagulación de las partículas del látex (Sobroto et al., 1996). Esta enzima hidroliza los polímeros de β -1,3-glucano, componente esencial de la pared celular de la mayoría de los hongos. La Hev b 2, es una proteína glicosilada (Yagami et al., 2002) y cuenta con 374 residuos de aminoácidos, su masa molecular calculada es de 41.3 kDa, sin embargo, la masa molecular estimada por electroforesis en condiciones desnaturizantes es de entre 34-36 kDa aproximadamente (Reyes et al, 2002), esto se debe a que los azúcares que se encuentran unidos al polipéptido, podrían modificar su movilidad electroforética. Su punto isoeléctrico es de 9.5 y su coeficiente de extinción de $\Delta\epsilon_{280\text{ nm}}^{1\%} = 13.32$.

2.4. Alergia

Existen cuatro tipos de hipersensibilidad: I, II, III y IV. Para el hule natural hay dos tipos hipersensibilidad la de tipo I y la de tipo IV, la alergia es una hipersensibilidad tipo I. En el desarrollo de este tipo de hipersensibilidad, un determinado tipo de células de nuestro sistema inmune, los linfocitos, juegan un papel fundamental. Existen dos grandes poblaciones de linfocitos:

A) Linfocitos B (LB): Implicados en la reacción llamada humoral al producir inmunoglobulinas o anticuerpos frente a un agente agresor.

B) Linfocitos T (LT): Intervienen en la llamada respuesta celular, provocando la activación de LB y macrófagos. Se dividen en CD₄ y CD₈; los CD₄ se dividen en Th₁ y Th₂.

En la hipersensibilidad de tipo I, cuando una persona susceptible se expone en un primer contacto con un alérgeno, se estimula la diferenciación de los CD₄ a células efectoras Th₂, las que a su vez interaccionan con los LB para producir inmunoglobulinas E (IgE) específicas para este alérgeno. Estas últimas circulan como anticuerpos bivalentes y normalmente están presentes en el plasma en concentraciones inferiores a 1 pg/mL, en condiciones patológicas puede aumentar a 1 ng/mL. La IgE producida se une a receptores presentes en la superficie de basófilos sanguíneos y células cebadas tisulares.

La regulación de la síntesis de IgE, depende de la propensión de un individuo a desarrollar una respuesta de células Th₂ frente a alergenos y esta propensión depende de una sensibilización previa o por factores genéticos (atopia), pero son los factores ambientales los que en último término determinan la extensión de la respuesta.

Cuando tiene lugar un segundo contacto con el alérgeno, cada molécula de éste, se une a dos IgE presentes en la superficie de células cebadas y basófilos, iniciando señales de transducción en estas células, que provocan la liberación de mediadores preformados en sus gránulos citoplásmicos, tales como: histamina, prostaglandinas y leucotrienos; así como una síntesis rápida y liberación de otros mediadores. Los efectos de estas sustancias y la activación paralela de eosinófilos, los cuales liberan otros compuestos que dañan los tejidos y los inflaman de forma continua, dan lugar al cuadro completo de la reacción alérgica.

Los síntomas clínicos de alergia al látex pueden ir desde urticaria, eritema, hinchazón, estornudos, náusea y vómito, continuando en un tiempo más prolongado de exposición con asma, rinitis, conjuntivitis, angioedema y dermatitis. En casos extremos se puede presentar el choque anafiláctico, caracterizado por una peligrosa caída de la tensión arterial, dificultad respiratoria y pérdida de la conciencia, poniendo en peligro la vida del paciente.

La segunda reacción alérgica al látex es una dermatitis por contacto (reacción de hipersensibilidad tipo IV), consistente en una erupción de la piel que aparece de 12 a 36 h después del contacto con el látex. La dermatitis de contacto se debe a los aditivos y aceleradores de la vulcanización, como son los carbamatos y derivados del benzotiazol. Aunque causa mucha irritación, esta forma de alergia no pone en peligro la vida del individuo, sin embargo ayuda para la sensibilización a una hipersensibilidad tipo I.

2.5. Síndrome látex–frutas (reacción cruzada)

Dentro del sistema inmunológico, una de las características principales de las Ig es su gran especificidad. Sin embargo, se sabe que una determinada Ig puede reconocer Ag diferentes. La base etiopatogénica de este hecho, se debe a que el Ac reconoce tan sólo una cadena corta de aminoácidos del Ag (son suficientes 10 aminoácidos para la construcción de un epítipo), por lo que basta que dos proteínas se asemejen en unos cuantos aminoácidos para que pueda existir una reactividad cruzada entre ellas. Por lo cual, se entiende por reacción cruzada al reconocimiento de distintos Ag por un mismo Ac.

En el año de 1994, se describió la existencia de un síndrome denominado látex frutas (Blanco, 1998). A partir de este hecho diversos estudios han demostrado que entre un 20% y un 60% de los pacientes alérgicos al látex presentan reacciones mediadas por IgE a una amplia variedad de alimentos, principalmente frutas como: aguacate, plátano, kiwi, pera, tomate, papa, pimiento, manzana, apio, mango y papaya (figura 3). Muchos de los pacientes muestran alergia simultánea a 3 o más alimentos. La hipótesis que prevalece para explicar este fenómeno; es que los alérgenos implicados en la reactividad cruzada poseen epítipos estructuralmente similares, estas proteínas tienen relación filogenéticamente cercana o representan estructuras que se han conservado en la evolución.

Varios tipos de proteínas se involucran en el síndrome de látex-frutas, dos de las cuales son proteínas de defensa de las plantas: las quitinasas de clase I (Hev b 11) y las β -1,3-glucanasa (Hev b 2). Las primeras contienen un dominio N-terminal tipo heveína (Hev b 6.02), que es una pequeña proteína de 43 aminoácidos, con una masa molecular

de 4.7 kDa y es uno de los principales alérgenos del látex, por lo que existe una reacción cruzada entre las quitinasas de clase I de los alimentos vegetales y la heveína del látex. (Reyes et al., 2004). La β -1,3-glucanasa también ha sido identificada como un importante alérgeno del hule, la cual muestra una reactividad cruzada con proteínas del pimiento. (Wagner et al., 2002). Otro importante alérgeno del hule natural es la esterasa (Hev b 7) que muestra una reacción cruzada con una proteína de la papa.

Por otra parte, aquellos pacientes asociados a una polinosis muestran una alta frecuencia de reactividad de IgE hacia el alérgeno profilina (Hev b 8), la cual puede causar un reconocimiento de IgE de los pacientes alérgicos al hule natural. La Hev b 2, la Hev b 6.02 y Hev b 11 pertenecen al grupo de las proteínas relacionadas a la patogénesis.



Figura 3. Frutas que pueden causar el síndrome látex-frutas

En la tabla 2, se presentan los diferentes alimentos implicados en el síndrome látex-frutas, definidos de la siguiente manera: Tipo 1, frutas que únicamente son implicadas en el síndrome látex-frutas por hallazgos clínicos; Tipo 2, frutas que son implicadas en el síndrome látex-frutas por hallazgos clínicos y caracterización de los componentes de la reacción cruzada por ensayos de inhibición de los extractos; y Tipo 3,

frutas que son implicadas en el síndrome látex-frutas por hallazgos clínicos y caracterización de los alérgenos de la reactividad cruzada.

Tabla 2. Frutas implicadas en el síndrome látex-frutas

<u>TIPO</u>	<u>FRUTA</u>	<u>TIPO DE PROTEÍNA</u>	<u>REFERENCIAS</u>
I	Sandia		Kim y Hussian, 1999.
I	Zanahoria		Kim y Hussian, 1999.
I	Manzana		Kim y Hussian, 1999.
I	Cereza		Kim y Hussian, 1999.
I	Coco		Kim y Hussian, 1999.
I	Chabacano		Kim y Hussian, 1999.
I	Fresa		Kim y Hussian, 1999.
I	Loquat		Kim y Hussian, 1999.
I	Espinaca		Millard, Machet y Meurisse, 2000
II	Durazno		Brehler y Theissen, 1997; Gallo y Roncarolo, 1998.
II	Higo		Brehler y Theissen, 1997.
-II	Melón		Brehler y Theissen, 1997.
II	Piña		Brehler y Theissen, 1997.
III	Aguacate	Quitinasa clase 1	Chen y Posch, 1998.
III	Plátano	Quitinasa clase 1	Mikkola y Alenius, 1998.
III	Castaña	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1998.
III	Chirimoya	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Fruta de la pasión	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Kiwi	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Papaya	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Mango	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Tomate	Quitinasa clase 1	Díaz-Perales y Collada, 1999.
III	Pimiento	β -1,3-glucanasa	Wagner y Grob, 2002.
III	Papa	Proteína unión a patatina	Sépala y Palosuo, 2000.

2.6. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos (Ac), son proteínas elaboradas por los LB del sistema inmune de los mamíferos, en respuesta al estímulo de un antígeno (Ag) introducido en el organismo. Las diferentes clases de Ac constituyen una población heterogénea de moléculas y son generados para cada determinante antigénico o epítipo que presenta un Ag, estos pueden ser lineales, constituidos por aminoácidos consecutivos o conformacionales estructurados por la cadena polipeptídica plegada.

Cada epítipo es reconocido por un clon de LB que producirá moléculas de Ac con una secuencia característica. Por ello en el suero de un animal inmunizado se acumulan un número desconocido, posiblemente elevado, de diferentes moléculas de Ac específicos en mayor o menor medida al Ag. Se trata de un suero producido por la acción de síntesis de numerosos clones de linfocitos B y por ello se denomina policlonal, es decir, de anticuerpos policlonales (AcPo).

Los Ac tienen una estructura tetrapeptídica básica, con diferentes péptidos unidos por puentes disulfuro, llamadas cadenas ligeras (L) y cadenas pesadas (H). Tanto las cadenas H como las cadenas L, constan de regiones cuya secuencia de aminoácidos es básicamente idéntica entre todas las clases y otras regiones en las que la secuencia de aminoácidos es exclusiva para cada Ac. La primera región polipeptídica se denomina "constante" o región C (R_C), mientras que la otra se considera "variable" o región V (R_V). La especificidad de un Ac para unirse con determinado Ag, es función de la estructura terciaria de las regiones V de las cadenas H y L.

Los Ac son glicoproteínas del suero y se denominan también inmunoglobulinas (Ig). En el hombre se han identificado 5 clases de Ig en función del tipo de cadena pesada: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Estas Ig pueden encontrarse como monómeros, (IgG, IgD e IgE); pentámeros (IgM) o monómero, dímero y trímero, (IgA) (Margni, 1996).

Las IgG se dividen en tres fragmentos, dos idénticos capaces de combinarse con el Ag para formar un complejo soluble y se denominan como fragmento de unión al Ag (fragment antigen binding, F_{AB}). El tercer fragmento llamado fragmento cristalizante (fragment cristallizable, F_C), no se une con el Ag (Roitt, 1977), ver figura 5.

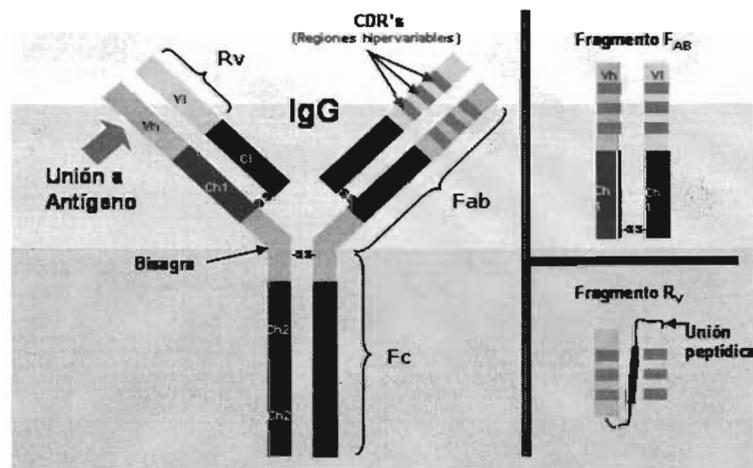


Figura 5. Esquema general de la inmunoglobulina G (IgG).

2.7. Producción de anticuerpos policlonales en conejo.

Virtualmente toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un Ag, Se pueden diferenciar dos características primordiales en un Ag. Por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del Ag que hace que éste sea reconocido por un determinado Ac. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado Ag. Moléculas de pequeño tamaño (haptenos o péptidos) son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular para inducir una respuesta inmune adecuada. Macromoléculas ubicuas (albúminas, citócromos, etc.) o de especies filogenéticamente relacionadas, son poco inmunogénicas. En estos casos, para obtener una respuesta adecuada es aconsejable utilizar como animal huésped una especie filogenéticamente alejada a la del antígeno a inocular.

En el proceso de inmunización, en el cual se inyecta al animal el Ag, se deben cuidar ciertos criterios de éste, para poder inducir una óptima producción de Ac. Uno de los criterios de mayor importancia en la obtención de un suero monoespecífico es la inmunización con Ag puros. Además, éste debe tener una masa molecular aproximada de 10 kDa, para poder inducir una óptima producción de Ac. También, debe administrarse en una concentración adecuada, ya que pequeñas dosis podrían ser inefectivas y un exceso podría actuar como inhibidor. Para aumentar la inmunogenicidad del Ag se pueden utilizar adyuvantes, uno de los adyuvantes más conocidos se prepara con una mezcla de un aceite mineral (Drakoil) y un detergente (arlacel), denominado adyuvante incompleto de

Freund. Cuando a la mezcla anterior, se le adicionan bacterias muertas por calor (micobacterias) se le conoce como adyuvante completo de Freund.

Los esquemas de inmunización en general se divide en dos fases: inmunización primaria, en la cual, se administra una determinada cantidad de Ag en presencia de adyuvante y inmunización de recuerdo, en la que el Ag es administrado en forma soluble o bien con adyuvante. La fase de inmunización primaria suele durar de 1 a 3 meses con inyecciones cada 15 días y el proceso puede durar de 3 a 6 meses. La cantidad de Ag dependerá del animal empleado. Los animales que se usan con mayor frecuencia para la producción de AcPo son los conejos, debido a que son sumisos manejándose dentro de una jaula, son robustos, tiene un tiempo largo de vida y son fáciles de inmunizar y sangrar. En estos animales se pueden hacer de 2 a 4 inoculaciones y después de un tiempo apropiado se recolecta el suero, o también se puede realizar una inoculación después de un lapso prolongado para elevar nuevamente el título de Ac y seguir recolectando el suero.

En el conejo se han encontrado IgG, IgM, IgA e IgE. Estos animales cuentan con una excelente respuesta IgG para una amplia variedad de inmunógenos, sus anticuerpos muestran una alta avidéz/afinidad, características necesarias para pruebas de sensibilidad hacia un Ag, además de que la fracción de Ig que producen es fácil de purificar.

3. JUSTIFICACIÓN

La alergia al látex y el síndrome látex frutas, son problemas de salud que han tenido un crecimiento notable en los últimos años. Las personas más susceptibles, son aquellas expuestas a cirugías múltiples, los trabajadores del área de la salud y las personas que manufacturan productos de hule natural. Se han identificado como alergenicos, 16 proteínas en el látex de *Hevea brasiliensis*, de los cuales los más importantes son: heveína (Hev b 6.02), quitinasa de clase I (Hev b 11), profilina (Hev b 8) y β -1,3-glucanasa (Hev b 2).

Una vez caracterizadas las proteínas causantes de la alergia al látex y de las reacciones cruzadas al látex, el primer paso en el tratamiento de estos padecimientos es la producción de anticuerpos policlonales contra estos alergenicos, los cuales permitirán la identificación de estas proteínas en productos de látex y en diversas frutas involucradas en el síndrome látex-frutas. Además, estos anticuerpos servirán para la elaboración de pruebas de inhibición, destinadas a determinar la potencia alérgica de estas proteínas.

Por lo anterior, el presente proyecto llevará a cabo la purificación de la β -1,3-glucanasa de látex de *Hevea brasiliensis* y la producción de un anticuerpo policlonal anti-Hev b 2, para la identificación de esta enzima en extractos de guantes de látex y de frutas involucradas en el síndrome látex-frutas (kiwi y aguacate); contribuyendo de esta manera a esclarecer la participación de Hev b 2, tanto en la alergia al látex como en el síndrome látex frutas, con una incidencia directa en la disminución de problemas de hipersensibilidad por este alérgico.

4. HIPÓTESIS

- I. La respuesta inmune inducida por la inoculación de Hev b 2 en un conejo provocará la producción de un anticuerpo policlonal dirigido a este alérgeno, por lo que este deberá identificar la presencia de Hev b 2 en un extracto total de hule natural y en extractos de productos elaborados con este material.

- II. En el desarrollo de una reacción cruzada al hule natural, hay un reconocimiento de proteínas con dominios parecidos a los presentes en los alérgenos del hule natural, por lo tanto, el anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 identificará la presencia de proteínas con dominios similares a los de la β -1,3-glucanasa, contenidas en extractos de diversas frutas reportadas en el síndrome látex-frutas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Contribuir al conocimiento del alérgeno β -1,3-glucanasa de *Hevea brasiliensis*, en su potencial participación en la alergia al hule natural y en el síndrome látex-frutas.

Objetivos particulares:

- 1.- Purificar el alérgeno β -1,3-glucanasa (Hev b 2) del látex de *Hevea brasiliensis*.
- 2.- Producir un anticuerpo policlonal dirigido a Hev b 2, para reconocer a este alérgeno en extractos de guantes de látex, o posibles proteínas con dominios similares a Hev b 2 en extractos de kiwi y aguacate.
- 3.- Comparar la capacidad del anticuerpo policlonal anti-Hev b 6.02 (anti-heveína) preparado previamente en nuestro laboratorio y el anticuerpo policlonal anti-Hev b 2, para reconocer diferentes proteínas en extractos de guantes de látex.

6. METODOLOGÍA

6.1. Purificación de la proteína β -1,3-glucanasa.

Todos los pasos de la purificación se llevaron a cabo a 6 °C.

El látex de *Hevea brasiliensis* se centrifugó a 70,000 g por 45 min, se separó el suero B o sedimento, el cual contiene la fracción lutoide y se homogenizó con NaCl 0.35 M para ser centrifugado a 40,000 g por 45 min. Se realizó una reextracción en las mismas condiciones. Los dos sobrenadantes se dializaron contra agua milli Q por 48 h, el dializado se centrifugó a 40 000 g por 45 min y el sedimento se resuspendió en NaCl 0.35 M. El sobrenadante se filtró usando membranas millipore con tamaño de poro de 0.45 μ y 0.22 μ y se le determinó la actividad de β -1,3-glucanasa usando como sustrato laminarian. Se aplicó entonces a una columna de exclusión molecular Superdex 75 (con un rango de 3000-70 000 kDa) montada en el equipo de cromatografía líquida de polinucleótidos, péptidos y proteínas (Fast Protein Peptide and polynucleotid Liquid Chromatografy FPLC). Se identificó la actividad enzimática en diferentes fracciones, las cuales se aplicaron a una columna de afinidad de concanavalina A (ConA). Esta columna se equilibró con amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.0, NaCl 1 M, MgCl₂ 1 mM, MnSO₄ 1 mM, y CaCl₂ 1 mM. A la muestra se le adicionaron los mismos iones antes mencionados, y NaCl 0.65 M de para tener una concentración final de 1 M y una vez equilibrada la columna se pasó la muestra. Después de la unión de ésta, se equilibró nuevamente la columna.

La proteína unida a Con A se eluyó metil- α -D-manopiranosido con 0.2 M de, esta fracción se aplicó a la anterior columna de exclusión molecular. La actividad de la enzima se identificó en un solo pico y para verificar el peso molecular de la proteína, así como su pureza, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La concentración de proteína se determinó con su coeficiente de extinción reportado y su absorbancia a 280 nm.

6.2. Actividad de β -1,3-glucanasa

El ensayo de actividad de β -1,3-glucanasa, se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de reacción se mezclaron 100 μ L de la muestra, 100 μ L del amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.0 y 200 μ L de laminarina (2 mg/mL en el amortiguador de acetatos 50 mM pH 5). Para realizar el blanco de enzima se tomaron 300 μ L del amortiguador y se adicionaron 200 μ L de muestra, en el caso del blanco de sustrato se tomaron 300 μ L del amortiguador anterior y 200 μ L de sustrato.

Posteriormente, se colocó la reacción en un baño maría a 37 °C por 1 h, pasado este tiempo se adicionó a cada prueba 1 mL de DNS (ácido dinitro salicílico) y se dejó en ebullición por 15 min, finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm.

Con la absorbancia obtenida se calculó la actividad específica, usando de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica (AE)} = \frac{\text{Glucosa liberada } (\mu\text{mol/min})}{\text{Concentración de proteína (mg/mL)}}$$

6.3. Producción del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 de conejo

A un conejo hembra de raza Nueva Zelanda de 2 Kg de peso, se le realizó un sangrado preinmune, se separó el suero y se conservaron alícuotas a -20°C. Se realizó una primera inmunización inoculando 1 mL de la proteína purificada β -1,3-glucanasa (1mg/mL) resuspendida en amortiguador de fosfatos salino pH 7.4 (PBS) y adyuvante completo de Freund, debajo de la nuca y en la espalda. Después de 15 días, se realizó la segunda inmunización en las mismas condiciones, pero con adyuvante incompleto de Freund. Una tercera inoculación, se realizó 15 días después en las mismas condiciones de la segunda. A los 8 días, se realizó un primer sangrado, separando el suero en alícuotas y conservándolo a -20 °C. Después de un mes de la última inmunización, para elevar la respuesta, se hizo una cuarta inoculación con la proteína disuelta en PBS y adyuvante completo de Freund. A los 15 días, se realizó un sangrado a blanco, haciendo una punción cardíaca para extraer toda la sangre del animal, separando el suero en alícuotas, siendo éstas conservadas a -20 °C.

6.4. Titulación del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)

El suero obtenido de la muestra preinmune, el de la primera inoculación y el de sangrado blanco, se titularon mediante la técnica de ELISA, con el siguiente procedimiento.

En una placa de ELISA, se aplicaron 100 μ L en cada pozo de una solución de Hev b 2 con una concentración de 5 μ g/mL en amortiguador de fosfatos salino PBS pH 7.2 y se incubó la placa por 1 h a 37 °C. Posteriormente, se lavo la placa tres veces con 250 μ L de PBS con Tween al 0.1 %. La placa se bloqueó con BSA al 0.5%, y se incubo 2 h a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó de la forma anterior. Se colocó el suero comenzando con una dilución 1/1000 en el primer pozo y se realizaron diluciones seriadas al triple hasta el pozo 10, en el pozo 11 se colocó un control negativo y en el pozo 12 se colocó un blanco de reactivos, se incubó 1 h a 37 °C. Se reveló la placa utilizando el reactivo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina diclorada anhidra (TMB) o por 15 min a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 2 M. La placa se colocó en un lector de ELISA para medir la absorbancia a 450 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron contra el log de la dilución del suero utilizado, para obtener el título de anticuerpos presentes en las diluciones de suero.

6.5. Identificación y determinación del peso molecular de las proteínas reconocidas por el anti-Hev b 2 por Western blot.

La identificación y determinación del peso molecular de las proteínas reconocidas por el anti-Hev b 2, en extractos de guante de látex, kiwi y aguacate, se llevo a cabo mediante la técnica de Westwern blot. En primer término, se preparó un gel al 12% SDS PAGE con los extractos. Posteriormente, se realizó una transferencia en una membrana de nitrocelulosa (12 h a 45 mA). En el siguiente paso, se realizó una tinción de la membrana con rojo de Ponceau, para identificar a las bandas de las proteínas. La membrana se lavó con agua para retirar el rojo de Ponceau y se bloqueó con una solución de PBS, leche descremada al 5%, ovoalbúmina al 1% y Tween 0.2% por 90 min a temperatura ambiente. La membrana se lavó 5 veces por 5 min, con una solución de PBS y Tween al 0.2 % y enseguida se adicionó el anticuerpo anti-Hev b 2 a una dilución de 1/600 en la solución de bloqueo, dejando la membrana con el anticuerpo 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 4 veces por 5 min y 2 veces por 15 min con la solución de lavado. En la etapa siguiente, se colocó el conjugado anti- γ de conejo a una dilución de 1/8000 preparada en la solución de bloqueo, dejando la membrana con el conjugado por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la membrana con la solución de lavado 5 veces por 5 min y una última de 15 min. La membrana se reveló con los reactivos de quimioluminiscencia.

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Purificación de la β -1,3-glucanasa

La determinación de la actividad de la β -1,3-glucanasa realizada al extracto total del látex de *Hevea brasiliensis*, resultó positiva. Por lo cual, se inyectó a la columna de exclusión molecular, obteniéndose el perfil del FPLC mostrado en la figura 6. Se puede apreciar la presencia de actividad enzimática en la fracción más abundante. Sin embargo, se observa un poco de actividad en otras fracciones menos abundantes. Esto último puede deberse al grado de agregación de la proteína o bien a su grado de glicosilación, que da como consecuencia que la enzima se eluya en diferentes tiempos en la columna de exclusión.

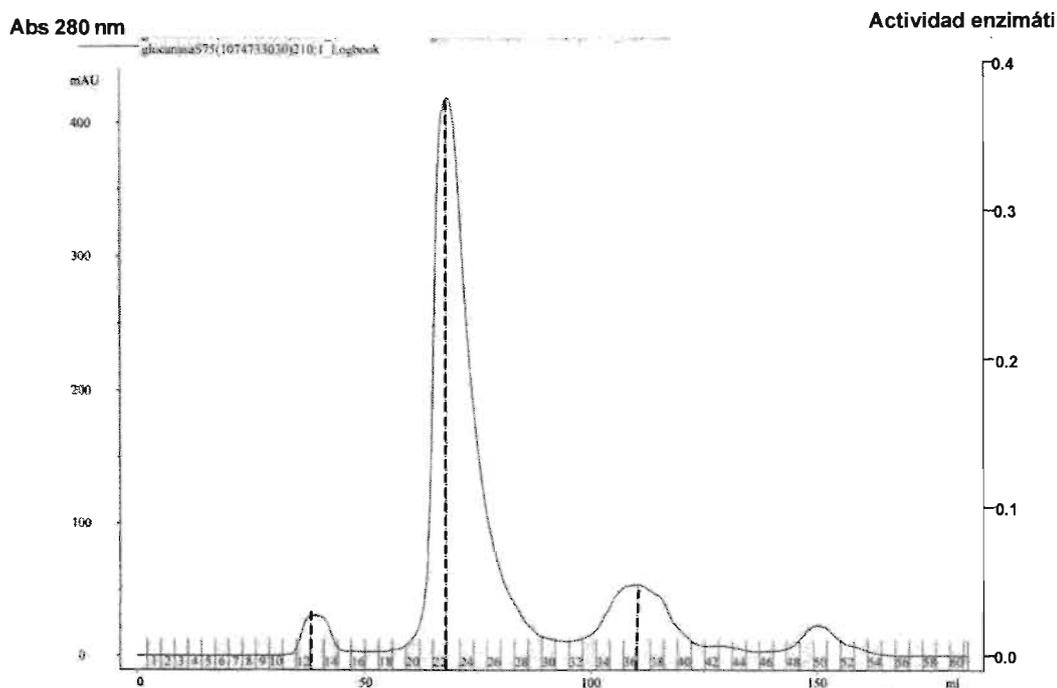


Figura 6. Perfil de elución de la columna de exclusión molecular Superdex 75. La línea punteada muestra la actividad enzimática.

Se reunieron las fracciones con actividad y se aplicaron a la columna de Concanavalina A. En el perfil de la fracción unida a ConA, (Fig 7), se observa que toda la proteína con actividad enzimática se eluye con la adición de una solución de manopiranosido 0.2 M

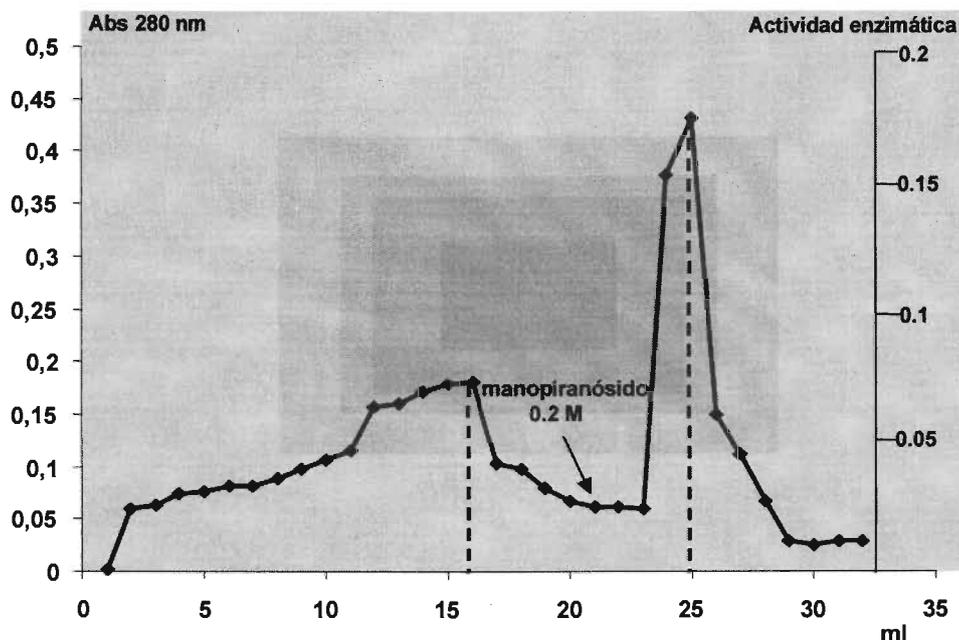


Figura 7. Perfil de elución de la columna de afinidad Concanavalina A (Con A). La línea punteada muestra la actividad enzimática.

Se realizó un gel al 12 % SDS-PAGE de la fracción que se hizo pasar por la columna de Con A y de la fracción que se unió a la columna de Con A, (Fig 8), este gel muestra que existe una proteína con el peso molecular reportado para la β -1,3-glucanasa y que esta banda se concentra después de la columna de afinidad; sin embargo, aparecen también proteínas de pesos moleculares mayores, por este motivo se procedió a realizar una segunda cromatografía de exclusión molecular.

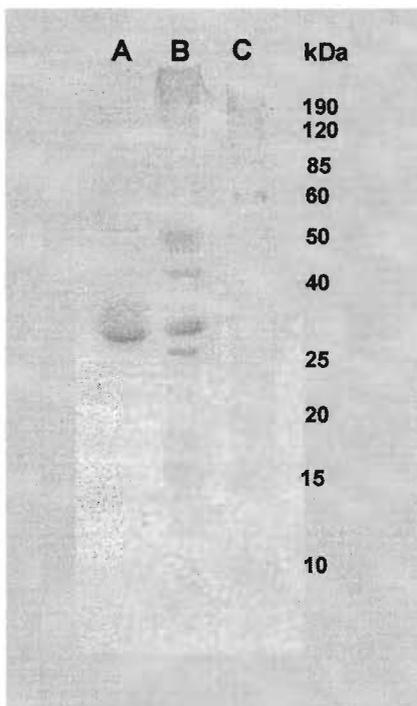


Figura 8. Gel de electroforesis al 12% SDS-PAGE. A: fracción unida a la columna de Con A; B: fracción con actividad antes de Con A y C: marcador de pesos moleculares

El perfil de esta última cromatografía se muestra en la figura 9 y se observa que la actividad de β -1,3-glucanasa aparece en un solo pico. Además, existen pequeñas fracciones después de la fracción con la actividad, como se observa en el gel de la figura 8, esta fracción cuenta también con un peso molecular mayor al de la fracción con la actividad. Se realizó un segundo gel a la última fracción obtenida (figura 10) y en este se muestra una sola banda con un peso molecular calculado por su Rf como de 36.93 kDa.

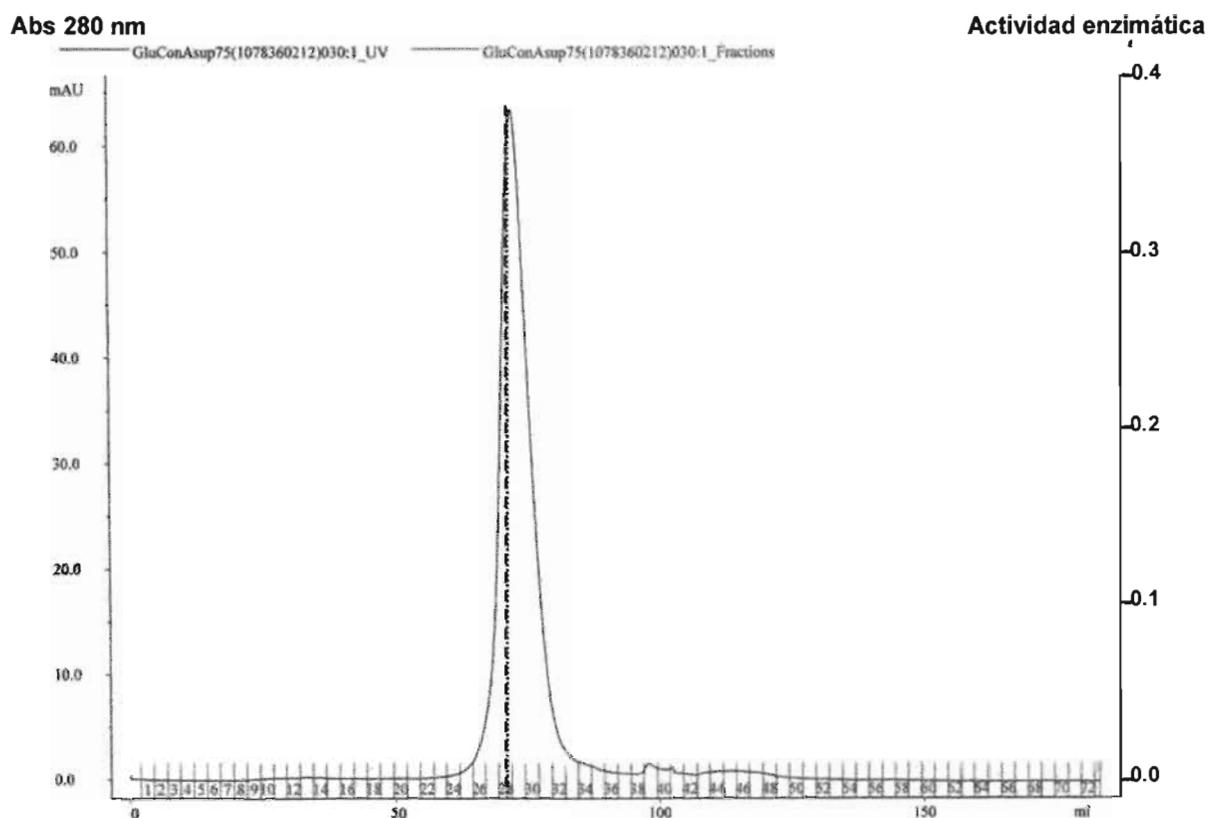


Figura 9. Perfil de elución de la columna de exclusión molecular Superdex 75. La línea punteada muestra la actividad enzimática

Tomando en cuenta el perfil de elución, el cual muestra un solo pico (figura 9), el gel que presenta una sola banda (Fig 10) y el aumento de la actividad específica de esta (tabla 3), se asegura la pureza de la β -1,3-glucanasa. Las fracciones que contenían la actividad se juntaron y se liofilizaron para posteriores experimentos.

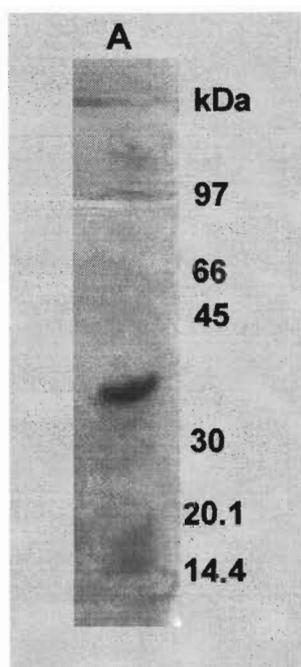


Figura 10. Gel de electroforesis al 12% SDS-PAGE. A: fracción con actividad enzimática.

Tabla 3. Tabla de rendimiento

ETAPA DE PURIFICACIÓN	VOLUMEN (ML)	VECES DE PURIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (MG/ML)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/MG)	% RENDIMIENTO.
Extracto total	12	0	1.48723	0.0003654	100
Fracción con actividad enzimática	20	2	0.2169	0.000733	24.3
Fracción unida a Con A	9	6.67	0.1336	0.00244	6.74
Fracción de β -1,3-glucanasa	4	34	0.068	0.0124025	1.52

7.2. Obtención y titulación del anticuerpo policlonal anti-Hev b 2.

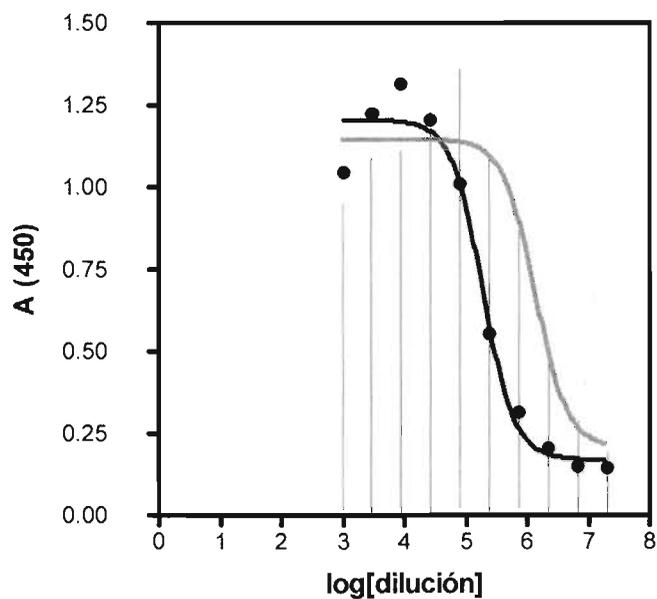


Figura 11. Titulación del suero anti- β -1,3-glucanasa.

En la figura 10, se muestra la curva de titulación del anticuerpo anti-Hev b 2. La curva en lila muestra el primer suero, para el cual se obtuvo un título de 1/ 146,000 y la curva en lila muestra el primer suero, para el cual se obtuvo un título de 1/ 146,000 y la curva en naranja muestra el segundo suero, el cual tuvo un título de 1/818,000. Esta dilución se toma de exactamente la mitad del gráfico de cada uno de los sueros.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

7.3. Western blot

Los resultados de la identificación y determinación del peso molecular de las proteínas reconocidas por el anti-Hev b 2, anti-Hev b 6.02 en extracto total de látex de *Hevea brasiliensis*, y el extracto total de agave se muestra en la figura 11.

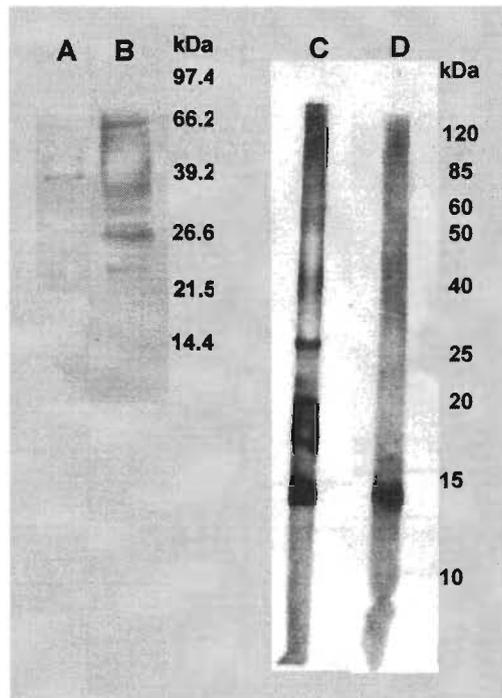


Figura 11. Western blot. A: Anticuerpo policlonal anti Hev b 2 y extracto de agave, B: anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 y extracto total de *Hevea brasiliensis*, C: Anticuerpo policlona anti-Hev b 6.02 y extracto total de *Hevea brasiliensis*, D: anticuerpo policlonal anti-Hev b 6.02 y extracto de agave.

En esta figura, en las tiras A y B se muestra al anti-Hev b 2 reconociendo diversas proteínas del extracto total de *Hevea brasiliensis*, entre ellas una con el peso molecular reportado para la β -1,3-glucanasa. Además, se observa que con el extracto de agave el anticuerpo policlonal reconoce proteínas con un peso molecular mayor que el de la glucanasa. Se observa también que el anti-Hev b 6.02 reconoce una banda de masa molecular entre de 10 y 15 kDa en el extracto total de agave, y en el de *Hevea brasiliensis*

una con el peso molecular reportado para la β -1,3-glucanasa, además de otras proteínas. El anticuerpo anti-Hev b 6.02 reconoce proteínas con un mayor peso molecular que el de la glucanasa en el extracto de agave. En el extracto total de *Hevea brasiliensis* reconoce proteínas de pesos moleculares de entre 14 y 60 kDa.

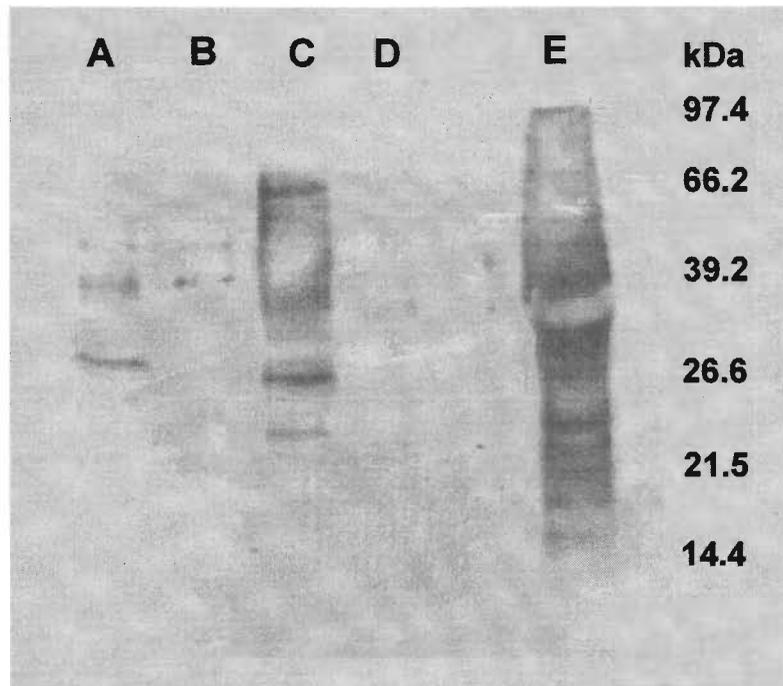


Figura 12. Western blot. A: Extracto total de aguacate, B: Extracto de agave, C: Extracto total de *Hevea brasiliensis*, D: β -1,3-glucanasa y E: Extracto de kiwi.

En la figura 12, se muestra el Western Blot del policlonal anti-Hev b 2, frente a los extractos de látex de *Hevea brasiliensis*, de kiwi, aguacate y agave. Se observa que en el carril A, el anticuerpo reconoce 4 proteínas de aguacate, una de las cuales con una masa molecular de entre 30 y 36 kDa, las otras tienen una mayor masa. Es importante mencionar que el aguacate tiene una glucanasa con peso molecular similar a la del hule natural y debido al reconocimiento que presentó anti-Hev b 2 con esta proteína se podría pensar que existe reacción cruzada entre éstas. En el extracto de agave, el anti-Hev b 2

reconoce a dos proteínas, pero de pesos moleculares mayores a los que se esperaría de la glucanasa, que podrían ser diferentes estados de agregación de la misma, o bien, diferentes grados de glicosilación.

El reconocimiento que tiene el policlonal anti-Hev b 2 de proteínas con masa molecular mayor que el de las glucanasas puede explicarse también considerando que este alérgeno es glicosilado y aun existe controversia respecto al epítipo de la glucanasa, en cuanto a si éste es conformacional (aminoácidos lejanos en secuencia, pero cercanos en la proteína plegada) o son los azúcares de esta proteína (Gordon et al., 2002). Algunos autores han presentado recientemente evidencias de que el epítipo que reconocen las IgE es la parte glicosilada de la proteína (Takeshi et al., 2002). El policlonal anti-glucanasa reconoce diversas proteínas de los dos extractos, posiblemente por que éstas podrían también estar glicosiladas y contar con los carbohidratos que forman parte del epítipo de la glucanasa. Esto es más evidente en el extracto de agave, ya que esta planta presenta una gran diversidad de azúcares.

En el extracto total de *Hevea brasiliensis* se reconoce a una proteína de peso molecular de la glucanasa. En el carril D se muestra a la glucanasa pura y se observa como una banda tenue, esto debido a la baja concentración utilizada en el experimento. Cuando se usó el extracto de kiwi, se observó que el anticuerpo reconoce varias proteínas; sin embargo, el experimento no es muy claro, debido a la alta concentración de azúcares que presenta el extracto de este fruto.

Estos resultados indican la posibilidad de una reacción cruzada entre la glucanasa del hule con proteínas de aguacate y de agave. Sin embargo, hay que considerar también la posible presencia de un epítope glicosilado en la glucanasa.

8. CONCLUSIONES

La proteína β -1,3-glucanasa pudo ser purificada del látex del árbol de *Hevea brasiliensis*, con un alto grado de homogeneidad.

El anticuerpo policlonal de conejo anti-Hev b 2, preparado en este trabajo, reconoció a la proteína β -1,3-glucanasa, tanto en el extracto total de *Hevea brasiliensis*, como en su forma pura

Se enfatiza la presencia de un epítopo glicosilado en la glucanasa, debido a la diversidad de proteínas que reconoció el anticuerpo policlonal anti-Hev b 2 en el extracto de agave y de aguacate. Las posibles explicaciones pueden ser, diferentes grados de glicosilación, o bien la presencia de la proteína con diferentes grados de agregación.

La diferencia entre las proteínas reconocidas al comparar ambos anticuerpos, podría deberse al reconocimiento de epítomos glicosilados por parte del anti-Hev b 2, mientras que el anti-Hev b 6.02 podría estar reconociendo a dominios de proteínas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK. Inmunología celular y molecular. 4ª Edición. España: MacGraw-Hill, 2002: 441-461.
- Alvarez J, López J, Camas A, Sánchez J. Alergia al látex archivos. Alergia e Inmunológica Clínica. 2002. 33: 28-35.
- Araki T, Torikata T. Structural Classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases. Biosci Biotech Biochem. 1995. 59: 336-338.
- Armentia A, Lombardero M, Barber D, Callejo A, Vega J, Martínez C, Rebollo S. Anafilaxia por moras (*Morus nigra*). Alergol inmunol clin. 1999. 14: 398-401.
- Banerjee B, Kanitpong K, Fink JN, Zussman M, Sussman GL, Keny KJ, Kurup VP. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. Molecular Immunology. 2000. 37: 789-798.
- Beintema JJ. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. FEBS Letters. 1994. 350: 159-163.
- Blanco C. Repercusión clínica de la reactividad cruzada. Sección de alergia. 30-33
- Bokma E, Barends T, Scheltinga AC, Dijkstra BW, Beintema JJ. Enzyme kinetics of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. FEBS Letters. 2000. 478: 119-122.
- Brent LF, Ownby DR, Hays SM. Airborne tire particles in the environment: a possible asthma risk from latex proteins. Human and ecological risk assessment. 2003. 9: 1505-1518.
- Catty D. Antibodies a practical approach. England: IRL Press, 1989: vol 1: 19-79.
- Chen Z, Posch A, Cremer R, Heimsoth RM, Baur X. Identification of hevein (Hev b 6.02) in *Hevea latex* as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 476-481
- Chun-Ta W, Bradford KJ. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. Plant Physiology. 2003. 133: 263-273.
- Fedorov AA, Ball T, Mahoney MN, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profiling. 1997. 5: 33-45.
- Herzenberg LA. Handbook of experimental immunology: genetics and molecular immunology. 4ª Edition. Great Britain: Blackwell Scientific Publication, 1986: 99.1-99.25.

- Huecas S, Villalba M, Rodríguez R. Ole e 9 major olive pollen allergen is a 1,3- β -glucanase. *J Biol Chem.* 2001. 276: 27959-27966.
- Janeway ChA, Travers P, Walport M, Capra DJ. *Inmunología: el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Barcelona España: Editorial Masson, 2000: 461-485.
- Karisola P, Alenius H, Mikkola J, Kalkkinen N, Helin J, Pentikäinen OT, Repo S, Reunala T, Turjanmaa K, Jonson MS, palosuo T, Kulomaa SM. The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. *J Biol Chem.* 25: 22656-22661.
- Margni AR. *Inmunología e inmuoquímica fundamento.* 5a edición. Buenos Aires Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1996: 14-32, 47-73, 256-265, 279-295, 307-325, 638-661, 907-922, 953-956.
- Mervi A, Alenius H, Turjanmaa K, Makinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. Cross-reacting allergens in natural rubber latex and avocado. *J Allergy Clin Immunol.* 1995. 96: 167-173.
- Monge R, Blanco C, Perales A Perkin J. The latex and food allergy connection. *J Am Diet Assoc.* 2000. 100: 1381-1384.
- Palosuo T, Kalkkinen N, Ylitalo L, Reunala T, Turjanmaa K. IgE reactivity to patatin-like latex allergen hev 7 and to patatin of potato tuber, sol t 1 in adult and children allergic to natural latex allergy. 2000. 55: 266-273.
- Perkin JE. The latex and food allergy connection. *J Am Diet Assoc.* 2000. 100: 1381-1384.
- Perales A, Collada C, Blanco C, y col. Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 1998.102: 127-133.
- Posch, CH, Wheeler Z, Chen A, F Lagge MJ, y col. Class I endochitinase containing a hevein domain is the causative allergen in latex-associated avocado. *Allergy. Clin Exp Allergy.* 1998. 29: 667-672
- Pound PJ. *Immunochemical protocols methods in molecular biology.* 2^a Edition. Nueva Jersey USA: Humana Press Totowa, 1998: 1-13, 95-111, 173-183, 217-235.
- Reche M, Pascual CY, Caballero T, Muñoz MF, Sanchez S, Esteban MM. Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex potato. *Allergy.* 56 1197-1201.
- Reyes C, Rodríguez-Romero, A. Características bioquímicas y moleculares del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia Asma Inmunología Pediátricas.* 2002. 11: 92-100
- Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana A. and Rodríguez-Romero, A. (2004). Insights into a

conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 123-130.

Rihs HP, Heimsoth RM. Natural rubber latex allergens. characterization and evaluation of their allergenic capacity. *Pharmacia Diagnostic AB.* 2003. 3: 1-8

Roitt I *Essential immunology* 3ª Edición. Londres: Blackwell Scientific Publications London. 1977. p21-23.

Tucke J, Posch A, Baur X, Rieger C, Heimsoth RM. Latex type I sensitization and allergy in children with atopic dermatitis. Evaluation of cross-reactivity to some foods. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999. 10: 160-167.

Senet CJ, Reyes FG. *Alergología.* Madrid España: Ediciones Luzan, 1985: 34-45, 409-425.

Smedley J. Occupational latex allergy: the magnitude of problem and prevention. *Clin Exp Allergy.* 2000. 30: 458-460

Sobroto T, Gerrit A, Koningsveld V, Schreuder HA, Ukun MS, Beintema JJ. Chitinase and β -1,3-glucanase in lutoid-body fraction of Hevea latex. *Phytochemistry.* 1996, 43: pp29-37.

Sobroto Y, Vries H, Schuringa JJ, Soedjanaatmadja U, Hofsteenge J, Jekel PA, Beintema JJ. Enzymatic and structural studies on processed from the vacuolar (lutoid-body) fraction of latex of Hevea brasiliensis. *Plant Physiol Biochem.* 39: 1047-1055.

Subiza J. Ficus benjamina, una nueva fuente de alergenos en el interior de las viviendas. *Alergol Inmunol Clin.* 1999. 14: 203-208.

Sussman G, Beezhold D, Kurup P. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 2002. 110: 33-39

Takeshi Y. Allergies to cross-reactive plant proteins. *International Archives of Allergy Immunology.* 2002. 128: 271-279.

Wagner S, Breiteneder H. The latex-fruit syndrome. *Biochemical Society.* 2002. 30: 935-940.

Winkler B, Baier K, Wagner S, Repa A, Eichler HG, Scheiner O, Kraft D, Wiedermann U. Mucosal tolerance of type 1 allergy: intranasal application of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice. *Clin Exp All.* 2002. 32: 30-36.

Yagami T, Osuna H, Kouno M, Haishima Y, Nakamura A, Ikezawa Z. Significance of carbohydrate epitopes in a latex allergen with β -1,3-glucanase activity. *Allergy Immunology.* 2002. 129: 27-37.