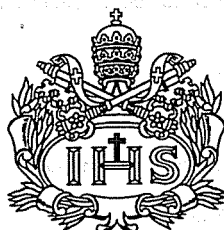


# **UNIVERSITAS SCIENTIARUM**

## **REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**

Volumen 4 N° 1, Enero-Junio de 1997

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**





## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS DE *FRAXINUS SINENSIS* Y *CECROPIA* SP.

Adriana Rodríguez<sup>1</sup> y Francisco Leal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Cra 7ª No. 43-62, Santa Fe de Bogotá.

<sup>2</sup>Hospital Infantil L.V. de Santos, Calle 99 No. 10-47, Santa Fe de Bogotá

### RESUMEN

En este trabajo se determinó la capacidad alérgica del polen de *Fraxinus sinensis* (Urapán) y *Cecropia* sp (Yarumo), en pacientes con alergia respiratoria de la ciudad de Bogotá. De un total de 207 pacientes a quienes se les realizaron pruebas dérmicas de alergia, 20 (9.66%) fueron positivos al *F. sinensis* y 6 (2.9%) al extracto de *Cecropia* sp. La alergenidad fue confirmada por determinación de Inmunoglobulina E (IgE) específica. De los 20 pacientes positivos a *F. sinensis*, sólo 6 accedieron a la toma de la muestra de sangre, de los cuales 5 mostraron reconocimiento del extracto. Las bandas principalmente detectadas por IgE, utilizando inmunodetección después de la separación por SDS-PAGE e IEF fueron las de 95 y 64 kd de peso molecular y 6.3 y 5.6 de PI. Cuando se comparó la presencia de proteínas alérgicas de reacción cruzada, el extracto de *Olea europaea* resultó contener mayor concentración de alérgenos relevantes que los extractos de *F. velutina*, *F. pennsylvanica*, *F. latifolia* y *F. americana*. En razón del bajo número de muestras de suero obtenidas de pacientes alérgicos, no es posible establecer un alergograma para el extracto del polen del *Fraxinus sinensis*. Con respecto de la *Cecropia*, ninguna de las pruebas *in vitro* realizadas, mostraron resultados positivos, lo cual no permitió obtener conclusiones relevantes. Estos resultados muestran la necesidad de continuar con investigaciones que permitan caracterizar alérgenos propios de nuestra atmósfera para optimizar el diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos Colombianos.

### ABSTRACT

The allergenic capabilities of the pollen of *Fraxinus sinensis* (Urapán) and *Cecropia* sp. (Yarumo) were determined in patients with respiratory allergies in the city of Bogotá. Of a total of 207 patients who were subjected to the relevant allergy skin tests, 20 (9.66%) were positive for *F. sinensis* and 6 (2.9%) for the extract from *Cecropia* sp. The allergenicity was confirmed by the determination of specific Immunoglobulin E (IgE). Of the twenty patients positive for *F. sinensis*, only 6 of them allowed for a blood test, and 5 of these showed a positive reaction to the extract. The bands mainly detected by IgE, using immunodetection after separation by SDS-PAGE and IEF, had molecular weights of 95 and 64 kd and IP's of 6.3 and 5.6. When compared to other allergenic proteins according to their cross-reactivity, the extract from *Olea europaea* was found to contain a higher concentration of relevant allergens than the extracts from *F. velutina*, *F. pennsylvanica*, *F. latifolia* and *F. americana*. Due to the small number of serum samples obtained from allergic patients, it is not possible to do an allergogram for the pollen extract of *Fraxinus sinensis*. As for *Cecropia*, none of the *in vitro* tests that were done showed positive results, which makes it impossible to draw relevant conclusions. These results demonstrate the need of more research that characterizes the allergens peculiar to our atmosphere in order to optimize the diagnosis and treatment of allergy patients in Colombia.

PALABRAS CLAVE: Alérgenos, *Fraxinus sinensis*, Urapán, *Cecropia* sp, Yarumo, Polen.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad alérgica es una patología que afecta cerca del 15% de la población mundial (Wuthrich 1989, Eaton 1982) y se produce por una relación inadecuada del individuo suscepti-

ble con su medio ambiente. Dentro de las alergias las más frecuentes son las respiratorias: el asma y la rinitis. El contacto repetido de los alérgenos con células del sistema inmune de individuos susceptibles, resulta en la producción de cantidades elevadas de IgE, molécula efectora

de la patología alérgica. La degranulación de mastocitos inducida por la unión de la IgE con el alérgeno, produce la liberación de mediadores de la inflamación que desencadena los síntomas alérgicos.

Uno de los principales factores desencadenantes de esta enfermedad son los alérgenos, una clase particular de antígenos que se encuentran suspendidos en la atmósfera del ecosistema en el cual vivimos. De estos sobresalen los granos de polen, ácaros, epitelios de animales y esporas de hongos entre otros. Los aeroalérgenos están constituidos por una mezcla de macromoléculas de las cuales solo una pequeña parte de su componente tiene importancia patogénica. Estas son denominadas proteínas alérgicas mayores, intermedias y menores y constituyen tan solo el 10% del contenido proteico de un extracto alérgico.

La baja concentración de proteínas alérgicas con respecto al total en un extracto, hace necesaria su identificación y caracterización para establecer la o las proteínas capaces de inducir una respuesta de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE. La caracterización que consiste principalmente en la determinación del peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia y conformación estructural, es importante para la estandarización de los extractos utilizados a nivel mundial en pruebas dérmicas y en inmunoterapia para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes alérgicos, no sólo para asegurar la presencia y cantidad de las proteínas alérgicas, sino también para establecer la potencia de los extractos utilizados en la práctica alérgica (Yuginger 1984, Helm *et al.* 1984, Reed *et al.* 1989, Platts-Mills *et al.* 1991).

La purificación de estas proteínas basada en métodos de separación por peso molecular y punto isoeléctrico, ha sido ampliamente utilizada en experimentación *in vitro* para dilucidar el papel de los alérgenos en la respuesta de tipo alérgico, como reconocimiento de epítopes de células T (Ebner *et al.* 1995), respuesta humoral no mediada por IgE (Harfast *et al.* 1995, Kolbe *et al.* 1994), restricción por moléculas del comple-

jo mayor de histocompatibilidad y citoquinas (Van Neerven *et al.* 1994, O'Brien *et al.* 1995) y estudios de mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad (Ciprandi *et al.* 1994).

Por otra parte, dada la utilización de extractos alérgicos de países estacionales en las pruebas dérmicas realizadas en Colombia, se hace necesario el estudio de los granos de polen autóctonos, de manera que se pueda optimizar el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas en Colombia.

En estudios previos de aerobiología realizados en la atmósfera de la ciudad de Bogotá, se estableció la presencia del polen del árbol *Fraxinus sinensis* (Urapán) con una contribución de cerca del 32% del total de granos de polen recolectados y *Cecropia* sp. (Yarumo) con un 8% (Leal *et al.* 1993, Hurtado *et al.* 1989). *F. sinensis*, árbol introducido en el paisaje de la ciudad de Bogotá en la década de los 40, pertenece a la familia Oleaceae, en la cual se agrupan árboles con polen alérgico como la especie *Olea europaea*, uno de los principales alérgenos de países del mediterráneo (Melillo *et al.* 1985) y *Fraxinus* (Ash), alérgeno ampliamente reconocido en Estados Unidos. Los extractos del polen de las 4 especies de *Fraxinus* más importantes en la patología alérgica, *F. velutina*, *F. pennsylvanica*, *F. latifolia* y *F. americana*, son rutinariamente utilizados en las pruebas dérmicas por alergistas americanos.

Por su parte, *Cecropia*, a pesar de no crecer en pisos térmicos fríos, es la única planta nativa con recuentos significativos en la atmósfera de Bogotá. Pertenece, al igual que *Urtica* y *Parietaria*, a la familia Moraceae, destacándose estos dos últimos géneros por su gran poder alérgico (Weber *et al.* 1985).

En este trabajo se estableció el papel del polen de *F. sinensis* y *Cecropia* sp. en la inducción de una respuesta de hipersensibilidad inmediata en pacientes con alergia respiratoria de la ciudad de Bogotá, basados en la frecuencia con la cual el polen de estos árboles se presenta en la atmósfera de la ciudad y su relación botánica con plantas alérgicas. Esto se realizó a través de la deter-

minación de su capacidad alergénica, la caracterización por peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas de los extractos acuosos de estos granos de polen reconocidas por IgE específica de pacientes alérgicos, y la evaluación de la reactividad cruzada del polen de *F. sinensis* con plantas botánicamente relacionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Polen de *Fraxinus sinensis*

El polen fue recolectado tomando flores masculinas de diferentes árboles, suspendiéndolas y manteniéndolas a temperaturas elevadas para evitar contaminación especialmente por hongos ambientales. Las flores al secarse, liberaron el polen, el cual fue recogido en papel de filtro y envasado en tubos estériles.

### Polen de *Cecropia* sp.

El polen fue recolectado por Ramiro Fonnegra, de la Universidad de Antioquia, de plantas de los alrededores de la zona suburbana de Medellín. Se recibieron flores completas, secas, las cuales se pulverizaron mecánicamente debido a la imposibilidad de liberar el polen exclusivamente.

### Extractos alergénicos

Se prepararon extractos acuosos (10% p/v) del polen de *Fraxinus sinensis* y de *Cecropia* sp en una solución de Carbonato de Amonio 0.1 M, en agitación por 48 horas a 4°C (Trodeau *et al.* 1991).

Los extractos se clarificaron por centrifugación a 15.000 g por 15 minutos en centrífuga refrigerada y se esterilizaron a través de un filtro de 0.22 mm. (Millipore Corporation, Bedford M. A.). La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Esta preparación se utilizó para las pruebas bioquímicas. Para las pruebas dérmicas se realizó una dilución posterior al 50% en glicerina.

### Grupos de estudio

Se tomaron 207 pacientes que presentaban alergia respiratoria (asma y/o rinitis), procedentes de la consulta de alergia del Hospital Infantil Universitario Lorencita Villegas de Santos, del consultorio del Dr. Francisco Leal y de la consulta de Alergia de la Fundación Santa Fe de Bogotá (Elizabeth García).

A los pacientes se les practicaron pruebas dérmicas para los inhalantes y los alimentos alergénicos más comunes, incluyéndose además los dos pólenes en estudio. Como control positivo se utilizó una solución de histamina 1 mg/ml en glicerol al 50%, y como control negativo, solución salina. Las pruebas se realizaron por técnica epicutánea de puntura (prick test) y los resultados fueron registrados en una hoja diseñada para tal fin.

Las lecturas se hicieron por el sistema de cruces 0 a 4, según los milímetros de induración. Estas lecturas son netas restando la induración del control negativo. Se tomó el siguiente parámetro: de 1-4 mm: 1+; de 5-8: 2+; de 9-12: 3+ y >12: 4+ (Norman 1988, Herbert *et al.* 1980).

A los pacientes que mostraron algún grado de positividad al extracto de *Fraxinus sinensis* y *Cecropia* sp. se les solicitó muestra de suero para realizar determinación de IgE específica, SDS-PAGE, IEF y Western blot, los cuales fueron denominados grupo 1.

Grupo 2: 8 individuos sin patología alérgica evidente con pruebas dérmicas negativas a todos los extractos utilizados.

### Separación Electroforética

La SDS-PAGE de los extractos del polen de *Fraxinus sinensis* y de *Cecropia* sp, fue realizada en geles poliácridamida con gradientes del 4-20% (Ready gels. BIO-RAD. California. USA), utilizando el sistema buffer descrito por Laemmli (1970), a 150 v constantes durante 1 hora, en una cámara de doble celda Mini protean II (BIO-RAD). Después del corrido electroforético, los geles fueron coloreados con azul brillante de

Coomassie R-250 (BIO-RAD) (Fazekas *et al.* 1963). Los geles que se usaron para la transferencia no fueron coloreados. Se utilizó un patrón de bajo rango de peso molecular para SDS-PAGE de 21.9 - 142.9 kd precoloreado (BIO-RAD, cat. N° 161-0305). Para marcar el inicio y fin de la corrida se utilizó pironina (Sigma P-6892).

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (NC) de 0.45 mm (BIO-RAD), utilizando el método descrito por Towbin *et al.* (1979). La transferencia electroforética se realizó a 250 mA constantes por 2 horas en buffer tris 25 mM; glicina 129 mM; Metanol 20%, en una celda para mini transferencia (BIO-RAD). La eficiencia de la transferencia se controló por la evidencia de las bandas del patrón de peso molecular en el papel de NC. Posteriormente, las membranas de NC se bloquearon con leche descremada al 3% en buffer TTBS pH 7.5 (tris 10 mM- NaCl 150 mM-tween 20 0.1%) (Batteiger *et al.* 1982).

Las membranas de NC se cortaron en tiras de 0.5 cm de ancho y se incubaron durante toda la noche en agitación, a temperatura ambiente, con los sueros de los pacientes atópicos y el grupo control, diluidos 1:10 en TTBS. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con un antisuero anti-IgE humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical CO. A-3525) en dilución 1:100 en TTBS, por 1 1/2 hora. A continuación, las membranas se lavaron al igual que en la primera incubación y se revelaron por adición de BCI-p 0.015%-NBT 0.03% en una solución de buffer tris salino (tris 100 mM-NaCl 100 mM-MgCl<sub>2</sub> 5 mM) como sustrato, hasta la aparición de las bandas. La reacción se frenó con agua destilada.

El peso molecular aproximado de las bandas observadas, fue calculado realizando una curva de calibración, graficando el logaritmo del peso molecular contra la movilidad relativa de cada proteína (Lambin 1978, Neville 1971).

### Isoelectroenfoque

El IEF analítico fue realizado en geles de poliacrilamida prehechos con gradientes de pH

3.5-9.5 (Ampholine PAG plate, Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden). aproximadamente 41 ml del extracto que contenía 100 mg de proteína, fueron aplicados sobre el gel y corrido a 1500 V, 50 mA, 30 W por 1 hora. Patrones de punto isoelectrónico de amplio rango (4.45-9.6) fueron corridos paralelamente (BIO-RAD).

Después de la electroforesis, los geles fueron fijados en ácido Tricloroacético 11.6%-Sulfosalicílico 3.4% por una hora y coloreados con azul de coomassie R-250 0.116% (Laboratorios BIO-RAD). Los geles para transferencia a membranas de celulosa no fueron coloreados. La electrotransferencia fue realizada en buffer tris 48 mM-glicina 39 mM-SDS 0.037%-metanol 20% a 1200 V, 145 mA, 50 W por 3 horas utilizando la cámara de transferencia semiseca Nova Blot. (Pharmacia-LKB). Una porción de NC que contenía los patrones de PI y los extractos alérgicos, fue coloreada con una solución de tinta china (pelikan) 1 ml/ml en PBS/T, toda la noche para controlar la eficiencia de la transferencia (Hancock *et al.* 1983). La inmunodetección de las bandas de proteínas reconocidas por IgE fue realizada como se describe para el SDS-PAGE.

### Inmunoglobulina E Específica (RAST)

Placas para Elisa marca Costar, fueron cubiertas con una solución de los extractos a una concentración de 10 mg/ml en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6 e incubadas durante 3 horas a 37°C, y posteriormente, toda la noche a 4°C. Los lavados se realizaron con PBS 0.1 M-Tween 20 0.05% (PBS-T). Los sitios libres de la fase sólida fueron bloqueados con una solución de leche descremada al 1% en PBS, por 1 hora a 37°C. Los sueros se utilizaron sin diluir, se incubaron durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y se lavaron con PBS-T.

Posterior a la adición de un antisuero anti-IgE conjugado con fosfatasa alcalina, en una dilución de 1:500 en PBS (Sigma A-3525) durante una hora a 37°C y de lavados con PBS-T, la reacción se evidenció utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato (sigma 104) en buffer dietanolamina pH 9.8 a 1 mg/ml. La absorbancia fue cuantificada en un lector para Elisa multiskan

M/430 (Labsystem) a 405 nm. Para establecer el punto de corte, se utilizó la media de los valores de absorbancia de las muestras negativas y se le adicionó el valor de 2 desviaciones estándar.

### Inhibición del Rast

Para determinar la reacción cruzada se utilizaron extractos de *F. sinensis* (preparado como se describe anteriormente), *F. velutina*, *F. pennsylvanica*, *F. latifolia*, *F. americana* y *Olea europaea* (Greer Laboratories, Inc. Lenoir, NC). Las placas se sensibilizaron igual que para el RAST. 50 ml de un pool de los sueros de los 5 pacientes positivos a *F. sinensis* por pruebas

dérmicas y RAST, diluidos 1:2, se mezclaron con 50 ml de cada uno de los extractos a probar en diferentes concentraciones y se adicionaron a los pozos sensibilizados. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente, se lavó con PBS-T y se adicionó 100 ml de anti IgE humana marcada con <sup>125</sup>I. Después de incubar toda la noche a temperatura ambiente y lavar, la radioactividad se determinó en un contador gama (Ceska *et al.* 1972). Posteriormente, se calculó el porcentaje de la inhibición del RAST.

En una curva semilogarítmica se determinó la concentración del extracto de prueba requerida para inhibir el 50% de la reacción (Adolphson *et al.* 1980, Swanson *et al.* 1987).

EXTRACTO	%	EXTRACTO	%	EXTRACTO	%
<i>Fraxinus sinensis</i>	9.66	Epitelio de gato	4.35	Artemisa	12
<i>Cecropia</i> sp.	2.9	Arracacha	3.3	Llantén	14.5
Mezcla pastos	12.7	Rye grass	8.3	Ragweed	10
Acacia	19.1	<i>Alnus</i> sp.	1.7	<i>Amaranthus</i> sp.	15.9
Sauce	8.21	Mosca	30	<i>D. pteronissinus</i>	60.4
Epitelio de perro	9.66	Blue grass	2.3	<i>Fraxinus americana</i>	12.1
<i>Chenopodium</i> sp.	12	<i>Alternaria</i> sp.	2.42	Lana	2.42
<i>Dermatophagoides farinae</i>	68.12	Thimoty grass	10.1	Pollo	7.94
Polvo casero	23.67	Maíz	8	Huevo	7.2
Mezcla de Hongos	12.7	Tabaco	1.59	Trigo	5.31
<i>Hormodendrum</i> sp.	6.7	Mariscos	20	Soya	4.35
Eucalipto	7.25	Lulo	12.7	Tomate	2.90
Ciprés	7.73	Blomia	10	Leche	2.42
Candida	11.3	Camarón	10	Manzana	6
Fresa	4.7	Maní	3.3	Papa criolla	8.7
Banano	8.7	Guayaba	4.7	Tomate de árbol	9.3
Naranja	6.7	Arroz	2.7	Curuba	2.6
Chocolate	6	Diente de León	5.8	Aguacate	6.7
Mango	7.3	Cucaracha	17.9	Yuca	7.3
Papa	3.3	<i>Aspergillus</i> sp.	3.86	Papaya	1.7
Café	1.7	<i>Rumex</i> sp.	9.18	Pescado	16
Ajo	1.3	<i>Penicillium</i> sp.	6.28	Fríjol	0.7
Apio	3.3	Bermuda grass	23.8	Arveja	1.3
Zanahoria	2.7	Lenteja	7.3	Mora	0.7
Uva	3.3	Atún	8.7	Piña	2
Carne de res	2	Limón	2	Mandarina	1.3
Mandarina	1.3	Garbanzo	3.3	Maracuyá	2.7
Azúcar	2.7	Southern grass	8.7	Mezcla plumas	7.73
Cebada	4.7				

Tabla 1. Porcentaje de positividad a los extractos utilizados en las pruebas dérmicas en los 207 pacientes estudiados. Cada paciente puede presentar positividad a más de un extracto alergénico.

PACIENTES POSITIVOS <i>Fraxinus sinensis</i>	PRUEBAS DÉRMICAS	RAST
1	4+	Positivo
2	4+	Positivo
3	4+	Positivo
4	2+	Positivo
5	2+	Positivo
6	1+	Negativo
7	2+	ND
8	2+	ND
9	2+	ND
10	3+	ND
11	4+	ND
12	3+	ND
13	1+	ND
14	2+	ND
15	2+	ND
16	4+	ND
17	4+	ND
18	3+	ND
19	4+	ND
20	1+	ND
<i>Cecropia</i> sp.		
21	2+	Negativo
22	3+	Negativo
23	3+	Negativo
24	3+	Negativo
25	1+	ND
26	2+	ND

Tabla 2. Resumen comparativo de los resultados de las pruebas dérmicas y la determinación de IgE específica en los pacientes positivos a los granos de polen en estudio. ND: suero no disponible.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN 50% DE INHIBICIÓN (ug/ml)
<i>Fraxinus velutina</i>	17.7
<i>Fraxinus americana</i>	5.6
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	3.1
<i>Fraxinus latifolia</i>	1.7
<i>Olea europea</i>	0.25

Tabla 3. inhibición de la unión de IgE al extracto de *F. sinensis* (fase sólida) por los diferentes extractos de *Fraxinus* y *Olea europea* utilizados en la fase fluida.

## RESULTADOS

### Pruebas dérmicas

De los 207 pacientes probados, 20 reaccionaron positivamente al extracto de *F. sinensis* (9.66%) y 6 fueron positivos al extracto de *Cecropia* sp. (2.9%). En la Tabla 1 se registran los datos epidemiológicos de las pruebas dérmicas de alergia realizadas. De los pacientes positivos accedieron a la toma de la muestra de sangre: de *Fraxinus sinensis* 6 de 20 y de *Cecropia* sp. 4 de 6.

### Determinación de IgE específica (RAST)

Para confirmar la alergenicidad de los extractos de los granos de polen en estudio, se determinó

la IgE específica y se encontró que 5 de las 6 muestras de suero obtenidas de pacientes positivos a *Fraxinus sinensis* fueron positivas para RAST. El paciente número 6 que resultó negativo para el RAST, presentó solo una cruz de positividad en las pruebas dérmicas de alergia. La totalidad de las muestras positivas a *Cecropia* sp. (4) fueron negativas (Tabla 2). Los 8 pacientes del grupo control fueron negativos para ambos granos de polen.

*Fraxinus sinensis*: Con el sistema SDS-PAGE utilizado, se observaron bandas proteicas en un rango de peso molecular entre 131 y 14 Kd (Figura 1).

*Cecropia* sp.: Sólo se observó una banda de peso molecular aproximado de 42 kd.

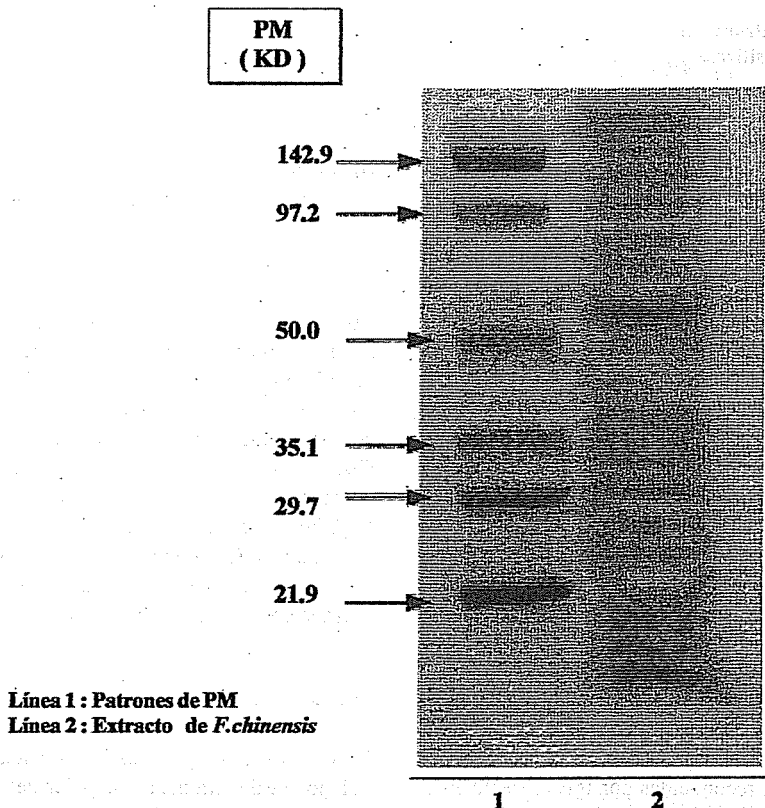


Figura 1: Comportamiento electroforético del extracto de *F. sinensis* bajo condiciones denaturantes.



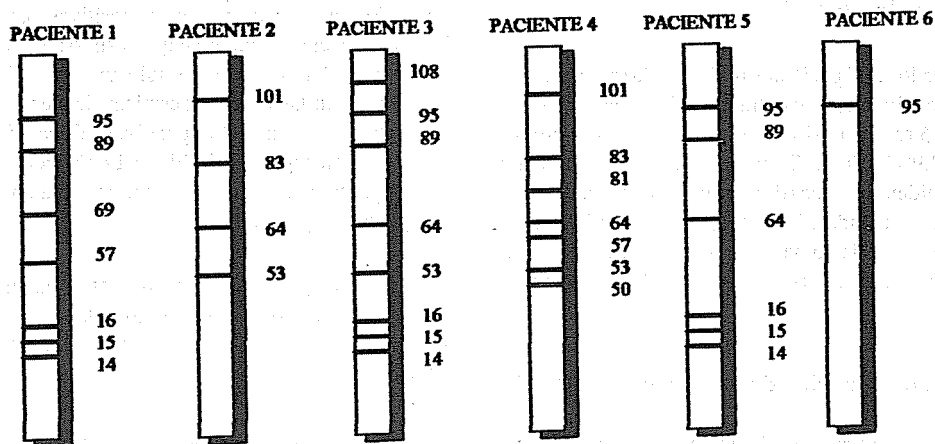


Figura 2. Patrones de reconocimiento de las proteínas de *F. sinensis* por IgE presente en el suero de los pacientes positivos.

### Inmunodetección

Los 6 pacientes positivos a *Fraxinus* mostraron reconocimiento por IgE específica de bandas de proteínas en un rango de peso molecular de 108 a 14 kd. Para cada una de las muestras se observó un patrón de reconocimiento diferente, esquematizados en la Figura 2. Las bandas más frecuentemente reconocidas fueron las de 95 y 64 kd de peso molecular, detectadas por IgE de 4 de las 6 muestras analizadas (Tabla 3). No se observó algún grado de reconocimiento por IgE en el suero de los pacientes positivos a *Cecropia* sp.

### Isoelectroenfoque

Para el extracto de *F. sinensis* se evidenciaron bandas de PI entre 7.5 y 3.7 (Figura 3).

### IEF -Inmunodetección

Las bandas reconocidas por IgE presente en el suero de los pacientes corresponden al rango de PI de 3.7 - 7.5. Cada una de las muestras mostró un comportamiento diferente en el número de

bandas reconocidas (Figura 4). Las bandas principalmente reconocidas fueron las de 6.3 y 5.6 de PI, por 4 de las muestras positivas (Tabla 4).

### Inhibición del RAST

Con el extracto de *F. sinensis* absorbido a la fase sólida, se comparó la inhibición de la reactividad de IgE con extractos de *F. velutina*, *F. americana*, *F. pennsylvanica*, *F. latifolia* y *Olea europea* como inhibidores de la fase fluida. El extracto de *Olea europea* mostró una parcial reactividad cruzada con el *F. sinensis* seguido por el *F. latifolia*. Los extractos de *F. velutina*, *americana* y *pennsylvanica*, contienen menor concentración de los alérgenos relevantes de reacción cruzada con el *F. sinensis* (Tabla 5).

### DISCUSIÓN

Uno de los hallazgos más importantes en este trabajo, fue determinar que el polen del *Fraxinus sinensis* es un alérgeno importante dentro de los 20 que más frecuentemente inducen una respuesta mediada por IgE, en pacientes con alergia

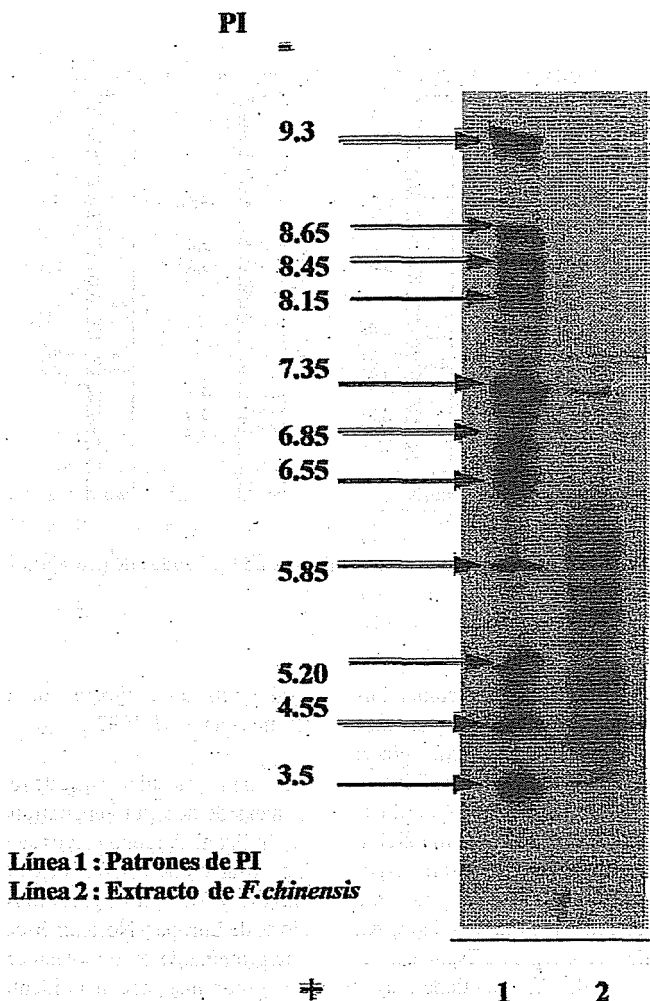


Figura 3. Distribución de las proteínas del extracto de *F. sinensis* según su PI.

respiratoria de la ciudad de Bogotá. La reacción alérgica fue confirmada mediante el RAST en el cual se observó que 5 de las 6 muestras reconocieron proteínas del extracto de *F. sinensis* por IgE específica (83.3%). La prueba negativa correspondió a un paciente con una cruz de positividad en la prueba dérmica, resultado que no se considera significativo para el diagnóstico de alergia a un determinado antígeno.

Con el sistema de electroforesis utilizado, se detectaron 14 bandas proteicas en el rango de peso molecular de 101 - 14 kd y 16 bandas de PI

7.5 - 3.7 que muestran actividad alérgica. Las bandas más frecuentemente reconocidas por IgE presente en el suero de los pacientes fueron las de 95 y 64 kd y de PI 6.3 y 5.6 en ambos casos reconocidas por 4 de las 6 muestras estudiadas. Sin embargo, con el número de muestras analizadas, no es posible establecer un alergograma ni afirmar si existen proteínas alérgicas mayores y/o menores.

Cuando se comparó la positividad por pruebas dérmicas de los pacientes al extracto de *F. sinensis* con el de *Fraxinus americana*, ampliamente

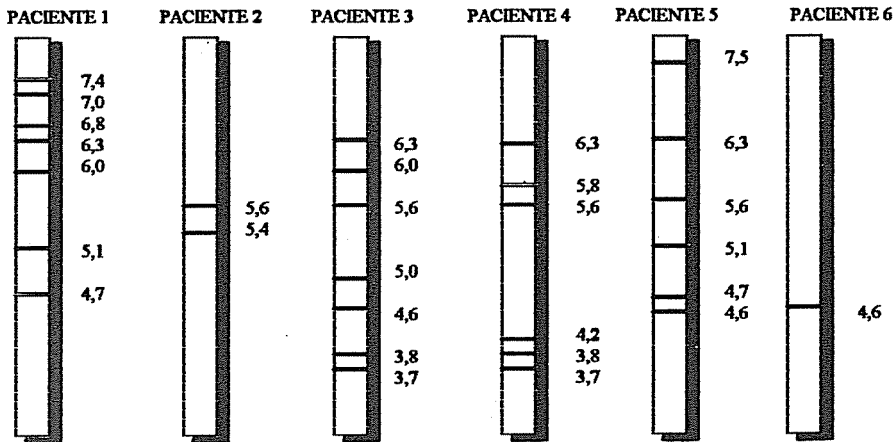


Figura 4. Número de muestras que reconocieron cada una de las bandas de proteínas del extracto de *F. sinensis* de acuerdo a su PI.

utilizado por encontrarse disponible comercialmente, se encontró que solo 7 de los 20 pacientes positivos a *F. sinensis* fueron detectados por el extracto de *F. americana* y 18 de los positivos a *F. americana* no fueron reconocidos por el extracto de *F. sinensis*. Las pruebas de inhibición del RAST realizada con extractos de otras especies de *Fraxinus* que se encuentran ampliamente distribuidas en Norteamérica y la *Olea europea*, árbol de importancia en alergia en España, mostraron que el extracto de *Olea* contiene mayor concentración de los alérgenos relevantes que los extractos de *F. latifolia*, *F. pensilvanica*, *F. americana* y *F. velutina* respectivamente.

La reactividad cruzada entre granos de polen de árboles de la familia Oleaceae ha sido claramente demostrada en el área del Mediterráneo. En este trabajo se encontró un alto grado de respuesta cruzada entre los 4 géneros de la familia Oleaceae más importante en el Mediterráneo: *Olea europea*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare* y *Phillyrea angustifolia*, aunque no existe una total identidad entre estos 4 tipos de polen (Bousquet *et al.* 1985). Igualmente en Michigan, Norteamérica, se evidenció la reactividad cruzada entre árboles nativos de la localidad como *Fraxinus americana*, *Ligustrum vulgare* y

*Elaeagnus angustifolia* con *Olea europaea* (Kenerman *et al.* 1992).

Las bases moleculares de esta reactividad cruzada han sido descritas, encontrándose una proteína similar al alérgeno mayor de *Olea* (Ole e I) en los extractos de *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare* y *Syringa vulgaris* muy comunes en el Norte de Europa y Norteamérica. Corresponde a una proteína de peso molecular aproximado de 19 kd con una secuencia idéntica en los 20 aa aminoterminales los cuales corresponden a cerca del 10% de la proteína (Obispo *et al.* 1993).

En la ciudad de Bogotá la única especie de *Fraxinus* es la *sinensis*. Se encuentran otros géneros de Oleaceae como *Ligustrum* y *Olea* aunque su representación fenotípica no es importante. El polen de estos géneros no ha sido reportado en los estudios aerobiológicos en la atmósfera de la ciudad. Es posible que los pacientes que respondieron al extracto de *F. americana* y no al de *sinensis*, fueron originalmente sensibilizados por alguna de las otras especies de Oleaceae encontradas en la ciudad o que existen en la atmósfera algún otro polen con recuento significativo que comparta alérgenos con el *F. americana*.

Este trabajo nos permite concluir que el polen del *F. sinensis* representa un alérgeno importante en la ciudad de Bogotá, dato de interés en el futuro estudio de pacientes alérgicos, por lo menos mientras el Urapán continúe siendo uno de los árboles con mayor representación fenotípica de la ciudad. Es necesario incluirlo dentro de los extractos utilizados para realizar pruebas dérmicas de rutina ya que se demostró que algunos pacientes no responden al extracto de *F. americana* que es comúnmente utilizado por alergistas de la localidad.

Acerca de *Cecropia*, observamos que tiene capacidad alergénica demostrada por la positividad (2.9%) a las pruebas cutáneas. Sin embargo, no fue posible confirmar dicha capacidad mediante pruebas *in vitro*. El extracto utilizado contenía una concentración de proteínas suficiente para realizar los experimentos *in vitro*. Aún así encontramos sólo una banda de aproximadamente 42 kd con una intensidad que no corresponde al total proteico del extracto. Es posible, tal como se describe en la literatura para otros granos de polen (Vik *et al.* 1989), que el pigmento de los mismos interfiera con la cuantificación de proteínas, y por lo tanto, este tipo de muestra no sea óptima para la saturación de la fase sólida en el RAST y en la detección de bandas en el SDS-PAGE.

Como se describió en el marco teórico, los extractos crudos contienen mezclas complejas de otras macromoléculas además de las proteínas. Adicionalmente, debido a la dificultad de obtener el polen de *Cecropia* puro, el extracto fue preparado macerando la flor completa, lo cual aumenta la cantidad de material vegetal diferente del polen que puede contribuir al contenido de sustancias que interfieran con las pruebas *in vitro*.

Otra posibilidad es que las proteínas alergénicas sean de muy alto o bajo peso molecular por lo cual no pueden ser observadas con el sistema utilizado en este trabajo, aunque no correspondería a lo reportado en la literatura con relación al peso molecular de las proteínas alergénicas (5-70 kd) (Kjell 1978). Como se expresó en el trabajo, por ser *Cecropia*, una planta nativa de

países tropicales, en donde no se ha avanzado en este tipo de investigaciones, no existe en la literatura reportes de preparación de extractos y caracterización de proteínas alergénicas de *Cecropia* por lo cual no disponemos de metodología estandarizada diferente a la utilizada en este trabajo.

Teniendo en cuenta que el estudio fue realizado en pacientes de Bogotá y que no se encuentran plantas de *Cecropia* en esta altitud, sería importante realizar estudios en sitios de Colombia donde *Cecropia* tiene representación significativa, donde podría tener importancia como alérgeno. Por ejemplo, en un estudio de aerobiología realizado durante 4 meses en Quibdó (Chocó), se observó que el polen de *Cecropia* representa cerca del 90% del total de polen recolectado (datos no publicados, estudios de aerobiología Hospital Infantil).

Este es el primer estudio de caracterización de alérgenos de polen en nuestro país. Aunque los resultados obtenidos con *Cecropia* no son concluyentes y se requiere un mayor número de muestras de pacientes positivos a *F. sinensis* para poder determinar sus proteínas alergénicas mayores, es necesario continuar con los estudios de caracterización de alérgenos propios de nuestra atmósfera. Esto se aplica no solamente para la ciudad de Bogotá, sino para las principales ciudades del país ya que la gran variedad de climas y la riqueza de la flora Colombiana amerita el conocimiento de las partículas atmosféricas locales para optimizar el diagnóstico y tratamiento de los pacientes y contribuir a solucionar el grave problema de la población alérgica Colombiana.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Doctor Julio Alberto Latorre, por la amistad y ayuda incondicional brindada. Al Laboratorio Especializado del Hospital Infantil Universitario "Lorencita Villegas de Santos", donde se realizaron los primeros ensayos. A la Doctora Rosa Codina de la Unidad de Inmunología y Alergia de la Universidad del Sur de la Florida, Tampa-USA, quien nos enseñó

los aspectos experimentales de este trabajo. A la Doctora Elizabeth García, por su colaboración en la consecución de los pacientes. Al Doctor Ramiro Fonnegra de la Universidad de Antioquia, por la recolección del polen de *Cecropia* sp. A Adrianita Cuéllar, Martica Mesa y Huguito Díez, por la preparación, corrección e impresión del manuscrito. A Elizabeth Bello por hacer las pruebas dérmicas de alergia a los pacientes, y a todas las personas y especialmente a los pacientes que colaboraron en la realización de este trabajo. Este trabajo fue realizado gracias al patrocinio del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, COLCIENCIAS.

#### LITERATURA CITADA

- ADOLPHSON, C.R., YUNGINGER, J.W. & GLEICH, G. 1980. Standardization of allergens. En: Rose N.R., Friedman H. (ed.). *Manual of Clinical Immunology*. 2nd ed. Washington D.C. 778-788 pp.
- BATTEIGER, B., NEWHALL, W.J. & JONES, R.B. 1982. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Meth.* **55**:297-307.
- BOUSQUET, J., GUERIN, B., HEWITT, B., LIM, S. & MICHEL, F.B. 1985. Allergy in the Mediterranean area III: cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clin. Allergy* **15**:439-448.
- CESKA, M., ERIKSSON, R. & VARGA, J.M. 1972. Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **49**:1-9.
- CIPRANDI, G., PRONZATO, C. & RICCA, V. 1994. Allergen - specific challenge induces intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1 or CD54) on nasal epithelial in allergic subjects. *J. Respir. Crit. Care. Med.* **150**:1653-1659.
- EATON, K.K. 1982. The incidence of allergy - has it changed? *Clin. Allergy* **12**:107-110.
- EBNER, C., SCHENK, S., NAJAFIAN, N., SIEMANN, U., STEINER, R., FISHER, G.W., HOFFMANN, K., SZEPPFALUSI, Z., SCHEINER, O. & KRAFT, D. 1995. Nonallergic individual recognize the same epitopes of Bet v Y, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J. Immunol.* **154**:1932-1940.
- FAZEKAS, S., GROTH, S.T., WEBSTER, R.G. & DATYNER, A. 1963. The new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochem. Biophys. Acta* **71**:377-391.
- HANCOCK, K. & TSANG, C.W. 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biom.* **133**:157-162.
- HARFAST, B., HAGE-HAMSTEN, M. & LILJA, G. 1995. Birch pollen allergens fail to evoke IgG 1 responses in non-atopic individuals. *Immunology Letters* **45**:223-224.
- HELM, R.M., GAVERKE, M.B., BAER, H., LOWENSTEIN, H., FORD, A., LEVY, D.A., NORMAN, P.S. & YUNGINGER, J.W. 1984. Production and testing of international reference standard of short ragweed pollen extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**:790-800.
- HERBERT, S. & MANSMANN, JR. 1980. Allergy tests in clinical diagnosis. Chapter 21. En: Bierman C. W. and Pearlman D. S. (ed.). *Allergic Diseases of Infancy, Childhood and Adolescence*. First edition. 289-299 pp.
- HURTADO, I., LEAL QUEVEDO, F.J., RODRÍGUEZ CIÓDARO, A., GARCÍA GÓMEZ, E. & ALSON-HARAN, J. 1989. A one year survey of airborne pollen and spores in the neotropical city Bogotá (Colombia). *Allergol et Immunopathol.* **17**:95-104.
- 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. *Ann. Allergy.* **69**:493-496.

- KJELL, A. 1978. Wath makes an allergen an allergen? *Allergy* **33**:3-14.
- KOLBE, L., HEUSSER, C.H. & KOLSCH, E. 1995. Isotype-associated recognition of allergen epitopes and its modulation by antigen dose. *Immunology* **84**:285-289.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- LAMBIN, P. 1978. Reliability of molecular weight determinations of protein by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **85**:114-125.
- LEAL, F.J., RODRÍGUEZ A., HURTADO, I. & GARCÍA, E. 1993. Hacia el establecimiento de un calendario de pólenes y esporas en la atmósfera de la ciudad de Bogotá. *Revista Colombiana de Inmunoalergia* **4**:2-19.
- LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDAL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- MELILLO, G., D'AMATO, G., LICCARDI, G., AGOSTINO, F.D. & SCHIANO, M. 1985. Allergy to *Olea europaea* pollen: relationship between skin prick test, RAST, ELISA and bronchial provocations test. *Allergol et Immunopathol.* **13**:229-234.
- NEVILLE, D.M. 1971. Molecular weight determination of protein - dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**:6328-6334.
- NORMAN, P.S. 1988. In vivo methods of study of allergy. Chapter 16. En: Middleton, E., Reed E.E. & Ellis, E.F (eds.). *Allergy Principles and Practice*. Second edition. 295-331 pp.
- OBISPO, T.M., MELERO, J.A., CARPIZO, J.A., CARREIRO, J. & LOMBARDEO, M. 1993. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of Oleaceae family. *Clin. Exp. Allergy* **23**:311-316.
- O'BRIEN, R.M., THOMAS, W.R., NICHOLSON, I., LAMBS, J.R. & TAIT, B.D. 1995. An immunogenetic analysis of the major house dust mite allergen Der p 2: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. *Immunology* **86**:176-182.
- PLATTS-MILLS, T.A. & CHAPMAN, M.D. 1991. Allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**:621-625.
- REED, C.E. & YUGINGER, J.W. 1989. Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**:4-8.
- SWANSON, M.C., ROSANOFF, E., GURWITH, M., SCHUNURRBERGER, P. & REED, C.E. 1987. IgE and IgG antibodies to B-propionolactone and human serum albumin associated with urticarial reactions to rabies vaccine. *J. Infect. Dis.* **155**:909-913.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **76**:4350-4354.
- TRODEAU, W.L., FERNÁNDEZ-CALDAS, E., LEDFORD, D.K. BUCHOLTZ, G.A. & LOCKEY, R.F. 1991. Immunochemical analysis of Bahia Grass (*Paspalum notatum*) pollen extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**:185.
- VAN NEERVEN, R.J., VAN DE POL, M.M., WIERENGA, E.A., AALBERSE, R.C., JANSEN, H.M. & KAPSENBERG, M.L. 1994. Peptide specificity and HLA restriction do not dictate lymphokine production by allergen-specific T-lymphocyte clones. *Immunology* **82**:351-356.
- VIK, H., HOLEN, E., DYBENDAL, T. & ELSAYED, S. 1989. Reestimation of the protein

concentrations of birch pollen allergen extracts selected as candidates for the international standard (IS) preparation. *Ann. Allergy*. **62**:87-90.

WEBER, R.W. & NELSON, H.S. 1985. Pollen allergens and their interrelationships. *Clin. Rev. Allergy* **3**:291-318.

WUTHRICH, B. 1989. Epidemiology of the allergic diseases: Are they really on the increase? *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* **90**:3-10.

YUGINGER, J.W. 1984. Allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**:316-317.