

EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN GRANOS DE POLEN DE *CHENOPODIUM ALBUM L.*

Bianchimano A¹, Murray MG², Prat, MI¹.

1. Laboratorio de Inmunología.

2. Laboratorio de Diversidad de Plantas Vasculares. Universidad Nacional del Sur. INBIOSUR (CONICET-UNS).

Correspondencia: Dra. María Inés Prat. Laboratorio de Inmunología. 4to piso. San Juan 670. Universidad Nacional del Sur. 8000. Bahía Blanca.
E-mail: miprat@uns.edu.ar

RESUMEN

Los componentes activos del polen a partir del cual se obtienen los extractos alergénicos pueden variar considerablemente de acuerdo al momento, el lugar dónde se recolecta y el período comprendido entre la recolección y su utilización.

El presente trabajo pretende evaluar si la temperatura de conservación del grano de polen influye en la expresión de proteínas y en la antigenicidad de las mismas, al momento de preparar un extracto alergénico. La especie elegida para estudio fue *Chenopodium album L.* ya que es de gran interés alergológico en la ciudad de Bahía Blanca.

Los granos de polen se conservaron a temperatura ambiente, 4 °C y -18 °C por el término de dos meses. El contenido proteico de los extractos se determinó por el Método de Bradford. La expresión proteica y la antigenicidad se estudiaron mediante electroforesis vertical Tricina-PAGE-SDS 12, 5 % e Immunoblot respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración proteica total fue menor para los extractos obtenidos del polen conservado a temperatura ambiente que para las otras dos condiciones. La expresión de proteínas varía cuantitativamente en todos los extractos y si bien la expresión cualitativa prácticamente se conserva, aparece para el polen conservado a temperatura ambiente, una banda de PM menor a 12 kDa. Esta banda podría ser consecuencia de la degradación proteica que experimenta el polen a esa temperatura de almacenamiento. En cuanto a la antigenicidad de los extractos no hay diferencias cualitativas aunque pueden apreciarse diferencias cuantitativas significativas.

Concluimos que la conservación del polen a 4°C o a -18°C serían las más adecuadas, ya que permiten obtener una mayor concentración proteica partiendo de la misma masa de polen.

Palabras claves: *Chenopodium album L.*, temperatura de conservación, aeroalergenos, extractos alergénicos

ABSTRACT

The active components from which pollen allergen extracts are obtained can change considerably according to the time or the place where collect and the time period between harvesting and use. This work aims to assess if the storage temperature of the pollen grain influences protein expression and its antigenicity when preparing an allergen extract. The species chosen for our study was *Chenopodium album L.*, since it is of great allergologic interest in the city of Bahía Blanca.

Pollen grains were stored at room temperature 4°C and -18°C, for a period of two months. The protein content of the extracts was determined by the Bradford method. Protein expression and antigenicity were studied by vertical electrophoresis Tricine SDS-PAGE 12, 5% and Immunoblot.

The obtained results show that the total protein concentration was lower in the extracts of pollen stored at room temperature than in those under two conditions. Protein expression differs quantitatively in all extracts and even if the qualitative expression is kept practically the same, in the Tricine SDS-PAGE gel and the pollen stored at room temperature there appear a band of MW inferior to 12 kDa. This band could result from the protein degradation experienced by pollen stored at that temperature. As regards extract antigenicity, there are no qualitative differences even though there are significant quantitative differences. We conclude that pollen preservation at 4°C or -18°C would be the most appropriate since it allows greater protein concentration for the same mass of pollen.

Key word: *Chenopodium album L.*, storage temperature, aeroallergens, allergenic extracts

INTRODUCCIÓN:

Los extractos polínicos empleados en el diagnóstico y tratamiento de las polinosis constituyen mezclas complejas de proteínas y glicoproteínas de tamaño variable, cuyos límites se establecen por encima de los 3 kDa (tamaño necesario para que una proteína sea inmunogénica) hasta los 80 o 90 kDa. El grano de polen es el vehículo de aeroalérgenos de exterior más importante, y debe reunir ciertos requisitos para llevar a cabo un transporte eficaz: tener un diámetro comprendido entre 15 y 60 µm, proceder de plantas anemófilas, es decir, polinizadas por el viento, liberar fácilmente los alérgenos al llegar a las mucosas del individuo alérgico y estar sometido a la deshidratación una vez producido.

Los componentes activos del polen a partir del cual se obtienen los extractos alergénicos pueden variar considerablemente de acuerdo al momento, el lugar dónde se recolecta y el período comprendido entre la recolección y su utilización¹.

El presente trabajo pretende evaluar si la temperatura de conservación del grano de polen, influye en la expresión de proteínas y en la antigenicidad de las mismas al momento de preparar un extracto proteico. La especie elegida para estudio fue *Chenopodium album L.* ya que es de gran interés alergológico en la ciudad de Bahía Blanca².

MATERIAL Y MÉTODOS:

Obtención y examen de los granos de polen

Se recolectaron granos de polen de *Chenopodium album* provenientes de ejemplares situados a 30 cuadras del casco urbano de la ciudad

Las inflorescencias de los especímenes fueron colocadas en frascos con agua dentro de vitrinas de vidrio, con el objetivo de recolectar el polen liberado in vitro, tanto en el piso de la vitrina como el que se encuentra adherido a partes de las piezas florales.

Una vez liberado todo el polen de las anteras (4-6 días), se lo filtró con una malla de nylon y se lo conservó a distintas temperaturas hasta su utilización. Una alícuota se reservó a temperatura ambiente (20-22°C) por el término de 2 meses, mientras que otras fueron mantenidas a 4°C y en freezer a -18°C respectivamente.

Obtención del extracto proteico

En la obtención del extracto proteico, se usó el protocolo de Varela y col.³. Se pesó 0,1 g de polen seco mantenido en las tres condiciones anteriormente citadas.

Se molieron en mortero los granos y se procedió a su desgrasado con acetona concentrada en frío, durante 10 minutos con agitación constante. El polvo obtenido se dejó secar en heladera durante 24

horas. La extracción de proteínas a partir del polvo seco se realizó con PBS 0.01 M (pH 7,4) con el agregado de inhibidores de proteasas (150 mM PMSF e inhibidor de tripsina 1 mg/ml), por 24 h a 4°C, con agitación constante. Luego de centrifugar a 12000g por 20 minutos en frío se separó rápidamente el sobrenadante para determinar proteínas por el método de Bradford⁴ y el resto del extracto se conservó a -18°C hasta su empleo.

Preparación del anticuerpo policlonal

El anticuerpo policlonal anti-Chenopodium (anti-Cheal) se obtuvo inmunizando conejos vírgenes con 500 µg de proteína de polen de Chenopodium album mezclado en partes iguales con adyuvante de Freund completo, una vez cada 15 días, durante 60 días⁵. El título de los anticuerpos obtenidos se determinó por el método Elisa indirecto⁶.

Electroforesis en gel

Se realizó una electroforesis vertical en gel de Tricina-PAGE-SDS al 12,5 %⁷ en una cuba Hoeffler, modelo SE 280, Amersham Pharmacia Biotech.

Se sembró 18 µg de proteína de cada extracto polínico junto a marcadores de PM (Amersham, RPN 756), de rango 12000-225000 Da. Las condiciones de corrida fueron: 90V, 44mA durante 6 h. El gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue G-250.

Inmunoblot

Luego de la separación electroforética de las proteínas en un gel de Tricina-PAGE-SDS al 12,5 % se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando buffer Tris 25mM, Glicina 192mM, metanol 20%, pH 8,3 en una cuba Hoeffler modelo TE 22 de Amersham Pharmacia Biotech⁸. La membrana se bloqueó con TBS (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4) leche descremada al 5% durante toda la noche.

La incubación con el anticuerpo anti-Cheal (dilución 1/100 en TBS-Tween 0,05%, leche descremada al 1%) se efectuó durante una hora a temperatura ambiente. Después de 6 lavados consecutivos con TBS-Tween 0,05% se incubó 2 horas con anti-IgG de conejo obtenido en cabra (SIGMA), marcado con peroxidasa diluido adecuadamente. Finalmente, después de nuevos lavados con TBS-Tween, se reveló con 4-cloro-naftol (SIGMA).

RESULTADOS:

En la Tabla 1 se observan los valores de concentración proteica determinada para cada extracto.

La Figura 1A) muestra la expresión proteica de cada extracto, obtenida a partir de Tricina-PAGE-SDS y la tinción con Coomassie G-Blue. En la Figura 1B) se aprecia un gráfico de intensidades de bandas determinada con el programa Image-J.

En la Figura 2A) se observan los perfiles antigénicos de cada extracto como resultado del Western Blot revelado con el anticuerpo anti-Cheal producido en conejo y en la Figura 2B) los gráficos de densidad de cada banda obtenidos con el programa Image J.

DISCUSIÓN:

Existen trabajos que comprueban que la temperatura de conservación del grano de polen ejerce influencia en algunos parámetros biológicos, como por ejemplo la capacidad de germinación o viabilidad⁹. El objetivo de nuestra experiencia fue evaluar si también afectaba la expresión proteica y antigénica.

En relación a la concentración proteica total, demostramos que en los extractos obtenidos empleando polen conservado a temperatura ambiente esta concentración fue menor que para las otras dos condiciones, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$, Test de Tukey).

La expresión de proteínas varía cuantitativamente en todos los extractos ($p < 0.01$, Test de Tukey). La expresión cualitativa prácticamente se conserva aunque aparece, en el gel de Tricina-PAGE-SDS y para el polen conservado a temperatura ambiente, una banda

de PM menor a 12 kDa. Esta banda podría ser consecuencia de la degradación proteica que experimenta el polen a esa temperatura de almacenamiento.

En cuanto a la antigenicidad de los extractos no hay diferencias cualitativas, ya que en los tres casos se observan bandas de 45 (característica de la familia de las Chenopodiaceas), 68 y 90 kDa. Pueden apreciarse diferencias cuantitativas significativas ($p < 0.01$, Test de Tukey) en todas las bandas, siendo la intensidad de las mismas siempre mayor para las proteínas obtenidas del polen conservado a -18°C.

Podemos concluir entonces, que la temperatura de conservación afecta la expresión cuantitativa de las proteínas del polen. La presencia de una banda de PM menor a 12 kDa en el polen conservado a temperatura ambiente podría ser consecuencia de la degradación proteica que experimenta el polen a esa temperatura de almacenamiento. La conservación del polen a 4°C o a -18°C serían las más adecuadas, ya que permiten obtener una mayor concentración proteica partiendo de la misma masa de polen.

CONFLICTO DE INTERÉS:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Universidad Nacional del Sur (PGI).

Temperatura de conservación	Temperatura ambiente	4 °C	-18 °C
Concentración mg/ml	0.70	1.36	1.63

TABLA 1

Concentración proteica de extractos de polen de *Chenopodium album* conservados a distintas temperaturas.

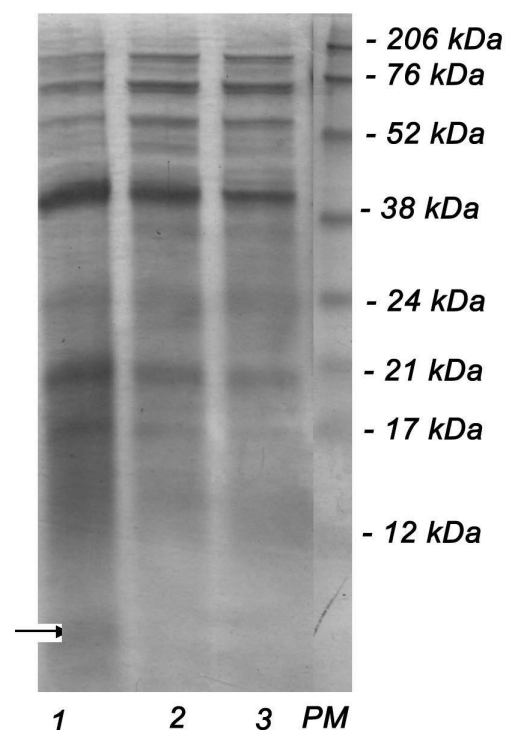


FIGURA 1 A

Expresión proteica de cada extracto, obtenida a partir de Tricina-PAGE-SDS y la tinción con Coomassie G-Blue.

CALLE1: Temperatura ambiente, CALLE 2: 4 °C, CALLE 3: -18 °C. PM: marcadores de peso molecular.

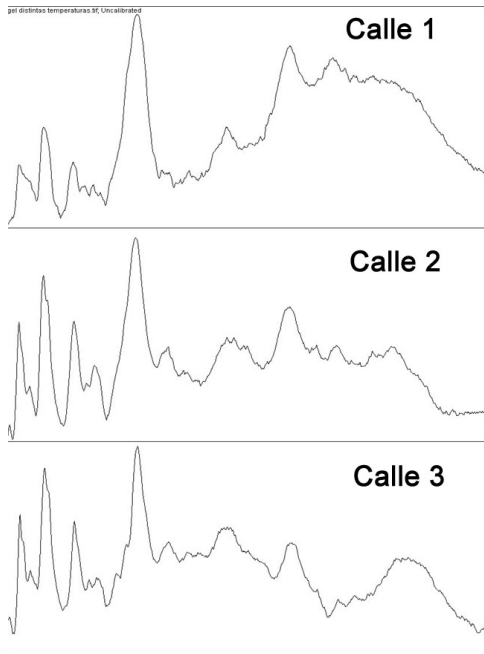


FIGURA 1 B: Gráfico de intensidades de bandas obtenido con el programa Image-J.
CALLE1: Temperatura ambiente, CALLE 2: 4 ° C, CALLE 3: -18 ° C

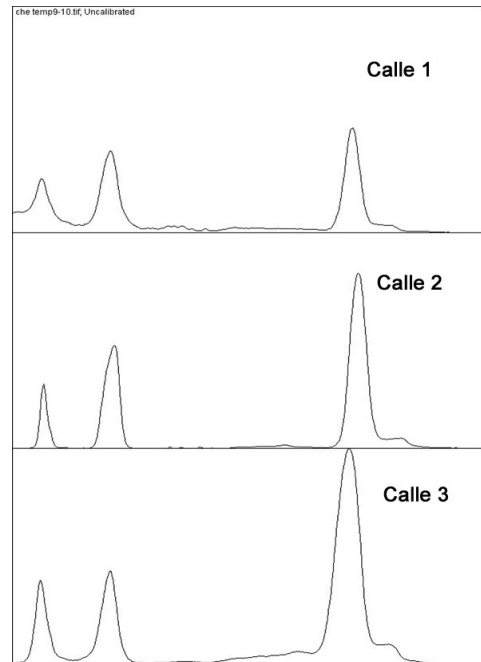


FIGURA 2 B: Gráficos de densidad de bandas obtenido con el programa Image J.
CALLE1: Temperatura ambiente, CALLE 2: 4 ° C, CALLE 3: -18 ° C.

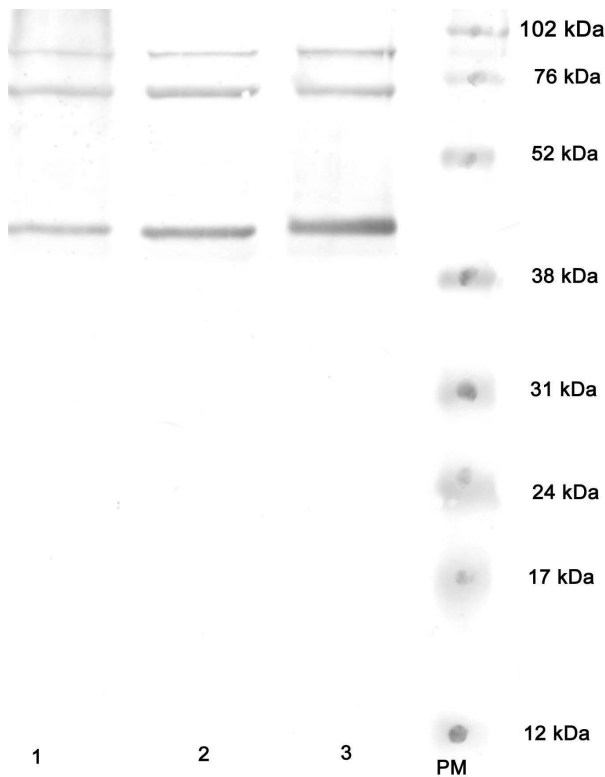


FIGURA 2 A:
Perfil antigénico: Inmunoblotting con anticuerpo anti Cheal.
CALLE1: Temperatura ambiente, CALLE 2: 4 ° C, CALLE 3: -18 ° C.
PM: marcadores de peso molecular.

REFERENCIAS:

1. Carnés J. Inmunoterapia como herramienta clínica moderna. Módulo 2. Acreditado por la Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud y por el Consell Català de Formació Mèdica Continuada. 2009.
2. Carignano C, Iaquinandí A, Aramayo E, Valle A, Andrada A, Lamberto S. Polinosis en la región de Bahía Blanca. Arch. Alerg. Immunol. Clin. 1998. 29(3): 21-27.
3. Varela S, Subiza J, Subiza JL, Rodríguez R, García B, Jerez M, Jiménez JA, Panzani R. Platanus pollen as an important cause of pollinosis. J. Allergy Clin. Immunol. 2005;100(6): 748-754.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976. 72:248-254.
5. Baroni MV, Chiabrando GA, Costa C, Wunderlin DA. Assessment of the floral origin of honey by SDS-PAGE immunoblot techniques. J. Agric. Food Chem. 2002;50(6):1362-1367.
6. Voller A, Bartlett A, Bidwell D. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. Am. J. Clin. Pathol. 1978. 31: 507-520.
7. Schägger H, Gebhard V. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 1987;166: 368-379.
8. Towbin H, Staehlin I, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979. 76(9): 4350-4354.
9. Cabello, P. Viabilidad polínica en dos estadios florales de Maqui, Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz. (Elaeocarpaceae). Tesis Lic. Agro. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias; 2003.