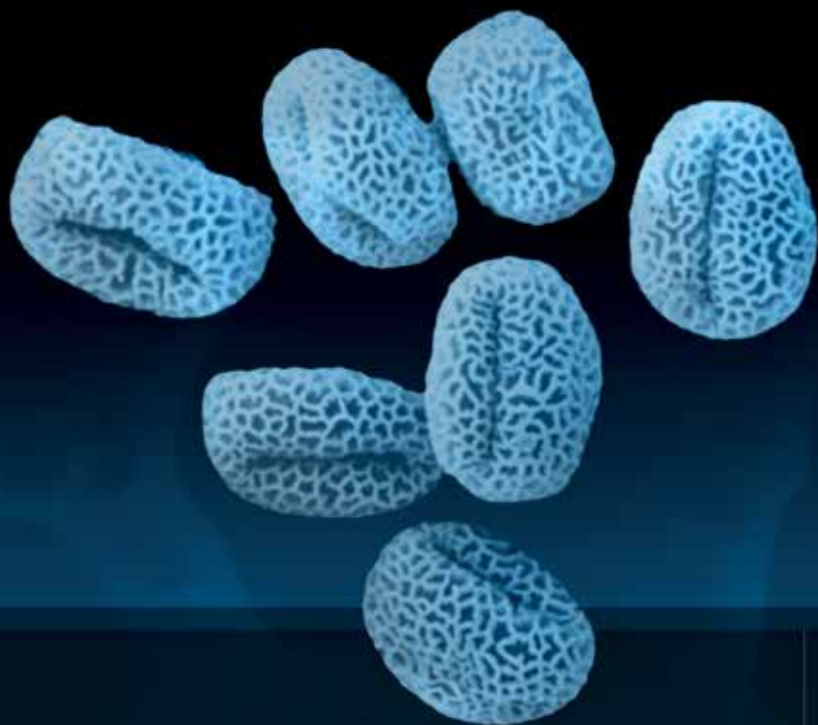




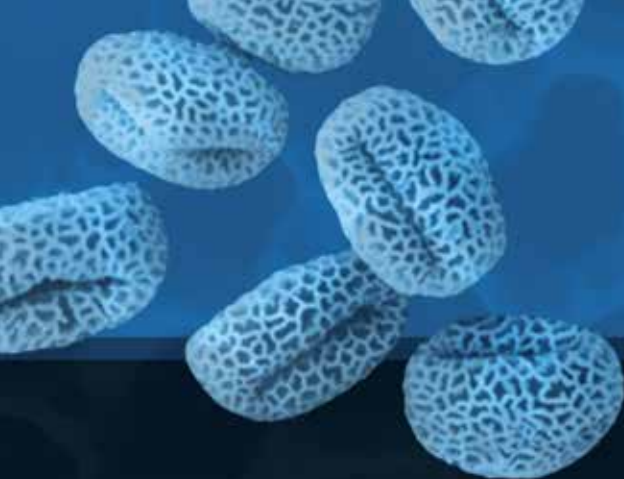
ALÉRGENOS DEL POLEN DE *Olea europaea* Y FENOTIPOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD ALÉRGICA

JOSÉ MANUEL ARIAS DE SAAVEDRA Y ALÍAS



INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA





ALÉRGENOS DEL POLEN DE *Olea europaea* Y FENOTIPOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD ALÉRGICA

Discurso pronunciado por el
Ilmo. Sr. D. José Manuel Arias de Saavedra y Alías
en el acto solemne de recepción
como académico correspondiente el día 4 de abril de 2013
y presentación por el
Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento
académico de Número

Madrid, 2013

Reservados todos los derechos.

Esta publicación no puede ser reproducida o transmitida, total o parcialmente por cualquier medio, electrónico o mecánico, ni por fotocopia, grabación u otro sistema de reproducción de información sin el permiso por escrito de los titulares de copyright.

ISBN: 978-84-940609-2-2

Depósito legal: M-5762-2013

05

PRESENTACIÓN DEL ILMO. SR. D. JOSÉ MANUEL ARIAS DE SAAVEDRA Y ALÍAS,
POR EL EXCMO. SR. D. FRANCISCO JAVIER PUERTO SARMIENTO.

13

DISCURSO DEL ILMO. SR. D. JOSÉ MANUEL ARIAS DE SAAVEDRA Y ALÍAS.

- 14 Alérgenos del polen de *Olea europaea* y fenotipos clínicos de la enfermedad alérgica.
- 16 Relevancia clínica y aerobiológica del polen de olivo.
- 19 Los alérgenos del polen de olivo.
- 21 Alérgenos mayores y menores.
- 22 Ole e 1.
- 24 Ole e 2.
- 25 Ole e 3 y Ole e 8.
- 26 Ole e 4.
- 26 Ole e 5.
- 27 Ole e 6.
- 27 Ole e 7.
- 28 Ole e 9.
- 29 Ole e 10.
- 29 Ole e 11.
- 30 Alérgenos recombinantes del polen de olivo.
- 31 Diseño y producción de alérgenos recombinantes del polen de olivo.
- 34 Ole e 1 como un marcador diagnóstico para la sensibilización al polen de las Oleaceas.
- 36 Ole e 2 y Ole e 3 como marcadores de polisensibilidad.
- 37 Detección de sensibilización a alérgenos minoritarios.
- 38 Inmunoterapia con alérgenos recombinantes.
- 38 Restricción genética y prevalencia de la respuesta mediada por IgE.
- 42 Alérgenos del polen de olivo y fenotipos clínicos.
- 42 La Profilina del polen de olivo y el Ole e 10 como marcadores del asma.
- 43 Ole e 7 y el síndrome polen-frutas.
- 44 Ole e 9 y Ole e 10, dos alérgenos, tres itinerarios clínicos de la polinosis.

47

BIBLIOGRAFÍA.



del **Ilmo. Sr. D. José Manuel Arias de Saavedra y Alías**
por el **Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento**

Excelentísimo Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Excelentísimas Señoras Académicas. Excelentísimos Señores Académicos. Señoras y Señores.

La Junta de Gobierno de esta Real Academia Nacional de Farmacia, me ha hecho el honor de encomendarme la presentación del Ilustrísimo Señor Don José Manuel Arias de Saavedra y Alías, lo cual no es sólo una honorable obligación sino, también, un gran placer.

Como de todos es conocido, nuestra institución tiene sus orígenes remotos en el año 1737, cuando se publicaron los Estatutos del Colegio de Boticarios de Madrid. Era ésta una corporación formalmente científica. En la realidad cotidiana estaba a medio camino entre lo científico y lo gremial, pero era esencialmente farmacéutica.

Cuando en 1932 el antiguo Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid, su heredero, se convirtió, feliz y fugazmente, en la Academia Española de Farmacia y, a los pocos días, en la Academia Nacional de Farmacia, siguió siendo una asociación de un grupo selecto, pero amplio, de boticarios con intereses, a la vez, de carácter científico y profesional.

Quien más contribuyó a la creación de la Real Academia de Farmacia, en su configuración actual, con un número reducido de académicos, en donde no sólo están



presentes los farmacéuticos, sino profesionales y científicos de áreas afines, con exigencias, a la vez, científicas y profesionales, introducido en el Instituto de España y con una deriva cada día mayor hacia la representación de la excelencia científica, fue el Ministro franquista, José Ibáñez Martín.

Mentiría si afirmase conocer las intenciones profundas para su mecenazgo, lo que sí puedo asegurar es que siguió manteniendo el carácter farmacéutico de la Academia. No podía ser de otra manera. Si no lo hubiera hecho, la Institución sería redundante con la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, en donde también estaban, y están presentes, varios destacados farmacéuticos.

En definitiva, la Academia empezó, durante el primer tercio del siglo XX, constituida por un grupo, siempre selecto aunque no tan reducido, de farmacéuticos con inquietudes en el desarrollo profesional y en el avance científico de la profesión para, con el tiempo, convertirse en un conjunto reducido de doctores en Farmacia y en profesiones o ciencias con puntos de contacto con la Farmacia, similar al reunido en otras academias.

De esa manera, la Farmacia posee en España una institución incomparable, en su consideración legal, que por extensión debería ser también en su consideración social, con ninguna otra corporación farmacéutica en el mundo, aunque eso, parece, en la propia España e incluso en la propia Academia, cuesta reconocerlo o al menos ser consciente de ello. Debemos recordar que la Academia de Farmacia francesa, la europea más desarrollada, no pertenece al Instituto de Francia y las Iberoamericanas, sea cual sea su institucionalización, tienen tras sí una profesión demasiado distinta a la europea, y no precisamente para bien. Por no hablar del resto de las españolas, las más importantes nacidas como sección de la Nacional y las demás surgidas, como setas, al calorillo autonómico de estos treinta desatados años, con finalidades que se me escapan o prefiero reservarme.

En el rápido tránsito efectuado por nuestra Academia durante el siglo XX, lo profesional se quedó en el camino, porque para su atención hay otras muchas instituciones, dedicadas a protegerlo y alentarle. Sin embargo la nuestra no es una Academia



de unas improbables “ciencias farmacéuticas” las cuales empezarían por ser de muy difícil definición, sino de Farmacia.

Me gusta definir la Farmacia como la profesión dedicada al cuidado y la curación del ser vivo enfermo, principalmente humano, pero también animal o vegetal. El fin último de la Farmacia es el ser vivo, pero su preocupación por él se manifiesta a través del medicamento. La nuestra es una profesión que, en último término, es humanística, en el sentido dado al concepto por Terencio y, en lo inmediato, se manifiesta mediante unos fundamentos científicos muy variados, relacionados con las ciencias químicas, las naturales -ambas consideradas en su más amplio sentido- las vinculadas con el conocimiento del ser humano -en su vertiente material y no material o humanística- y todas aquellas que puedan contribuir a su cuidado o sanación. La totalidad de las mismas deberían confluir en otra, que es la Farmacología: el estudio de la aplicación de los medicamentos a los seres vivos, para coronarse, no con una ciencia, sino con una técnica: lo que ha dado en llamarse primero Farmacia Operatoria y luego Farmacia Galénica, es decir la manera de aunar todos los conocimientos científicos en uno tecnológico: la preparación de medicamentos, que es lo que diferencia a los farmacéuticos de otros científicos y sanadores: el medicamento, la manera de prepararlo, conservarlo, administrarlo o dispensarlo, hoy en día, seguramente, compartido con otros científicos y técnicos, pero sin el cual, y sin su carácter sanitario, la Farmacia dejaría de tener sentido profesional y social.

No conviene, pues, que la Real Academia Nacional de Farmacia olvide, ni ahora ni nunca, sus orígenes y su esencia, pues en esta institución y en la profesión que, de una u otra manera, representamos, olvido es sinónimo de desaparición por ausencia de necesidad social. Demasiado a menudo, en España, olvidamos o menospreciamos nuestra Historia y, desde una posición *adanista*, nos vemos obligados a escuchar los cantos de sirena de algún iluminado, que cree haber descubierto el Mediterráneo o de algún falso profeta, o sabio de la necedad, que sólo ve el progreso en lo ajeno, impulsado por un añejo complejo de inferioridad.

No es mi intención el aventurarme por esos derroteros sino, muy por el contrario, exponer que en esta Real Academia estas cuestiones han estado siempre meridianamente claras y que el aparente distanciamiento entre los representantes de la



profesión y los cultivadores de la Ciencia, en el medio siglo que ha tardado la Real Academia en afianzarse, se ha debido a la progresiva exigencia de excelencia, también científica, a quienes quieren ser miembros de la corporación, no impuesta por un prurito elitista de quienes formamos parte de la misma, sino por exigencia legal, sin la cual, además, también nuestra institución correría graves riesgos.

La Academia, creo yo, siempre ha querido contar con representantes cualificados de la profesión farmacéutica, pero se ha debido de mover, con suma prudencia, entre los parámetros que, de forma esquemática, he expuesto.

Incluso con el deseo de sortear algunos de los escollos académicos, para involucrar a más profesionales inquietos y para sostener sus actividades científicas, creó la Fundación José Casares Gil.

Siempre ha tratado de tener entre sus filas a profesionales destacados, si bien el primer obstáculo a sortear, en el caso de quienes se dedican a tareas político-administrativas o al ejercicio profesional cotidiano, es el doctorado, sin el cual es imposible cualquier otro tipo de consideración.

Por eso hoy es un día de especial alegría personal e institucional. Me toca a mí presentar a un Doctor en Farmacia andaluz que ejerce la profesión en el ámbito hospitalario, ha participado y participa en diversos programas de investigación y, además, es Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Jaén.

Don José Manuel Arias de Saavedra Alías, nació en Andújar (Jaén), en el seno de una familia de ocho hermanos cuyos padres eran maestros nacionales.

Después de cursar el Bachillerato en el Instituto de su pueblo natal, estudió Farmacia en Granada, en donde fue Premio Extraordinario de licenciatura (1971) y Premio Nacional Fin de Carrera (1972). En la misma Universidad se licenció, más tarde, en Ciencia y Tecnología de los alimentos (1996). Se doctoró en Farmacia (1974) y, también en Granada, se diplomó en Sanidad (1976). Ese mismo año ingresó en el Cuerpo de Farmacéuticos Titulares y tres más tarde en el de Farmacéuticos de Sanidad Nacional (1979). Es especialista en Análisis Clínicos (1987) en Análisis y Control de Medicamentos y Drogas (2002) y en Microbiología y Parasitología (2002).



Fue Profesor Ayudante de Universidad, durante tres cursos, en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada (1971-1974); Becario del Plan de Formación de Personal Docente e Investigador (1972-1974); Profesor de la Escuela de Perfeccionamiento de Análisis Clínicos de la Universidad de Granada (1972-1974); Director del Laboratorio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Jaén (1973-2006) Inspector Provincial de Farmacia de Jaén (1974-1982); Jefe del Servicio de Defensa Atómica y Química de la Jefatura Provincial de Protección Civil de Jaén (1975-1982); y Jefe de la Sección de Análisis Clínicos de la Residencia Sanitaria de la Seguridad Social de Jaén, desde 1977 hasta la actualidad, en que sigue desempeñando el cargo.

Desde 2006 es Presidente del Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Jaén y, algo más tarde, Contador del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2007-2012).

Es académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia (2010) de la que, en la actualidad, es Secretario, y académico correspondiente de la de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia (2011).

Es miembro de diversas asociaciones científicas y ha participado en numerosos grupos de investigación, relacionados con las alergias y la alimentación.

Tiene más de veinte artículos publicados en revistas internacionales; es autor de seis libros de muy diverso carácter; de varios capítulos de libro y de una decena de artículos en revistas nacionales, además de haber participado en gran número de congresos, nacionales e internacionales, impartido conferencias y docencia a médicos y farmacéuticos en diversos cursos de reciclaje.

El suyo es un currículum amplio, en donde debo destacar que es miembro de la Comisión de Ética e Investigación del Complejo Hospitalario de Jaén (2005) sin incidir en otros aspectos del mismo, para no convertir este acto en una enumeración de méritos y distinciones que ya ha valorado, muy positivamente, esta Real Academia, fruto de lo cual estamos hoy aquí reunidos para escuchar su discurso de entrada como Académico correspondiente.



Una vida de tanta actividad científica y profesional, en una persona procedente de una familia numerosa y padre de otra familia numerosa, sería imposible sin el apoyo cotidiano de su esposa, Mariuca Sánchez Florez, una mujer especialmente amable, cariñosa y entregada, además de a mantener a flote a su familia, a la ingrata tarea de actuar como anfitriona de los compromisos de su marido, cuando invita a algún compañero a actos colegiales. Gracias a ella, tanto mi esposa como yo, tuvimos el privilegio de visitar la catedral de Jaén, acompañados por Mariuca y el Deán, en una visita tan excepcional que me decido ahora a recordarla por escrito. Sus seis hijos, José Manuel, Daniel, Lourdes, Teresa, Carlos y Santiago, algo habrán tenido que ver, también, en la hiperactividad del padre, como acicate y apoyo, así como la Junta Directiva del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Jaén, amabilísimas compañeras y compañeros que, al menos ante la mirada de los visitantes, se mueven con viejos criterios de hermandad.

El Presidente y la Junta Directiva organizan un acto en homenaje a la Patrona, por donde hemos pasado farmacéuticos representantes de todos los aspectos profesionales, en la celebración del cual se disfruta de unos momentos prenavideños verdaderamente fraternales, lo que no resulta demasiado habitual en los tiempos que corren. Además entregan una distinción, la oliva de oro, a sus colegiados, cuando cumplen un cierto número de años de colegiación y a los visitantes que consideran con los méritos precisos para ello.

No me queda sino decir unas palabras sobre el discurso de Don José Manuel.

Acorde con lo hasta aquí expresado, ha decidido presentar un discurso científico, a la antigua usanza del Colegio de Boticarios. En su caso no relacionado directamente con los medicamentos, sino con lo que es el tema de su preocupación hospitalaria: los alérgenos del polen de *Olea europaea* y los fenotipos clínicos de la enfermedad alérgica.

¿Cómo les haría un historiador de la Farmacia y de la Ciencia una síntesis del mismo?

Como bien saben los lectores de poesía y los españoles medianamente educados que han leído a Miguel Hernández, los de Jaén son andaluces, aceituneros y



altivos. Si alguno fuera alérgico a la poesía, como otros lo son a los olivos o al polvo, simplemente con viajar, sabría que Jaén está sitiado por el olivar, de manera que sólo con mirar alrededor, no por las enseñanzas que el viajar y lo que viajar conlleva, según dijo Don Quijote, o mejor Don Miguel de Cervantes, citado siempre por nuestro compañero, e incansable viajero, Benito del Castillo, llegaría a idénticas conclusiones que el poeta de Orihuela, al menos en lo referente a lo de aceituneros. Lo de la altivez es harina de otro costal, aunque los españoles, en general, solemos serlo, pero para no perderme por estos meandros literarios, diré que donde hay aceitunas hay olivos y donde hay olivos puede haber o no altivez, pero suele existir la alergia. De lo cual se deduce que Jaén ha de ser tierra de gentes trabajadoras del olivar, implicadas en el comercio del aceite, algunas altivas, otras no tanto, pero muchas alérgicas –los altivos y los que no- y de curar esa alergia, de mejorarla y prevenirla, se ocupan los profesionales del Hospital de la Seguridad Social, entre ellos nuestro futuro compañero de Academia y, para mejor hacerlo, investigan durante años en el problema y ahora nos expone alguno de los resultados de la investigación para instruirnos y si es posible deleitarnos.

Sea pues bienvenido, en nombre de la Real Academia Nacional de Farmacia y en el mío propio, Don José Manuel Arias de Saavedra Alías. Ojala que el suyo sea un camino recorrido por otros muchos representantes profesionales, que su colaboración con nuestra institución le sea muy provechosa personalmente y que mediante la misma sea también beneficiada esta añeja casa y que todos disfrutemos de la Ciencia, la Farmacia y la amistad durante muchos años.

He dicho.

del Ilmo. Sr. D. José Manuel Arias de Saavedra y Alías

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmos. Sres. Académicos, Señoras y Señores, mis queridos amigos:

Antes de nada, quiero mostrar mi agradecimiento a esta institución que me acoge hoy como Académico Correspondiente; a los Académicos que han apoyado mi nominación y, particularmente, al Profesor Puerto Sarmiento, al que motivos de amistad y afecto hacia mi persona han llevado a realizar tan cariñoso prólogo a mi intervención.

Me van a permitir que, este momento de alegría y satisfacción, tenga un recuerdo particular hacia mis padres; que no sólo me dieron la vida, la educación y formación, sino que también supieron despertar en mi la inquietud de profundizar en las distintas áreas del conocimiento, a las que, posteriormente, he dedicado mi quehacer profesional. Quiero también agradecer la ayuda y el apoyo a tantos compañeros con los que he compartido mi ejercicio profesional en la Universidad de Granada, Delegación de Sanidad, Hospital de la Seguridad Social y Colegio Oficial de Farmacéuticos de Jaén, instituciones en las que he desarrollado mi vida profesional en los -ya casi cuarenta y dos- años en que he ejercido distintas facetas de la profesión farmacéutica, a la que siempre me ha enorgullecido pertenecer...

Quiero hacer una mención especial a mi familia, a Mariuca, mi mujer; a mis hijos: José Manuel, Daniel, Lourdes, Teresa, Carlos y Santiago; y a mis nietos: Elena, Carmen



y Antonio. Ellos han creado el ambiente de cariño y afecto óptimos para mi desarrollo profesional y humano, y ellos han sido -y son- el norte y objetivo de mis inquietudes y desvelos. A todos ellos quiero ofrecer lo que de homenaje tenga este acto.

Traigo hoy a esta tribuna, una recopilación de lo que han sido los trabajos de investigación que, en el campo de la alergia al polen de olivo, hemos realizado en años pasados el Grupo de Investigación de Alergia de nuestro hospital. En Jaén, dada la profusión del cultivo del olivar, se dan unas condiciones únicas de exposición al polen de olivo, que condicionan una elevada morbilidad de la enfermedad alérgica. El desarrollo, durante los últimos años, del conocimiento acerca de los distintos alérgenos del polen de olivo, su purificación, secuenciación y obtención por tecnología recombinante, nos hizo posible su ensayo con fines diagnósticos, varios de ellos como auténtica primicia. La relación entre la reactividad frente a distintos alérgenos y los distintos fenotipos de enfermedad alérgica constituyen el núcleo de este trabajo que tiene, como objetivo futuro, el eventual uso en la inmunoterapia específica de las distintas moléculas alérgicas implicadas.

Alérgenos del polen de *Olea europaea* y fenotipos clínicos de la enfermedad alérgica

El olivo es un árbol originario de Asia Menor que se cultiva en el área Mediterránea desde hace más de cinco mil años, donde alcanza gran importancia económica por su fruto, la aceituna y sobre todo por el aceite que de ella se extrae. Perteneció a la familia botánica *Oleaceae*, que agrupa 29 géneros de los cuales solo 5 poseen interés económico, hortícola o forestal: *Olea* (olivo), *Ligustrum* (aligustre), *Jasminum* (jazmín), *Syringa* (lila) y *Fraxinus* (fresno). (Florida *et al.*, 2000). Junto a ello, el polen del olivo es la causa principal de alergia respiratoria en el área Mediterránea (Bousquet *et al.*, 1984). El polen de *Olea europaea* induce principalmente síntomas nasales y conjuntivales (Liccardi *et al.*, 1996) aunque puede producir exacerbaciones de asma en áreas con altos niveles de polen en la atmósfera.

En España el cultivo del olivo se concentra mayoritariamente en Andalucía, con casi un 60 % de la superficie cultivada. Jaén es la provincia que dedica mayor superfi-



cie al cultivo de esta especie, que en la práctica funciona en régimen de monocultivo, representando un 25 % de la producción nacional. La difusión del olivo a lo largo del tiempo en el área mediterránea, junto a otros aspectos botánicos y agronómicos del árbol, tales como la selección, hibridación y clonación, han originado una elevada cantidad de variedades autóctonas en cada zona oleícola. En Jaén las variedades predominantes son la picual, la cornicabra y la hojiblanca.

El periodo de polinización del olivo comienza a finales de abril y concluye a primeros de junio. No obstante, la polinización está influenciada por sus variedades, factores climáticos y geográficos, pero generalmente, para una zona determinada, su duración no supera los treinta días (Liccardi *et al.*, 1996).

El inicio de la polinización es explosivo y está relacionado con ciertos factores climáticos, como son la temperatura y la pluviosidad en las meses anteriores a la floración. Es importante, desde el punto de vista clínico, recordar un fenómeno agronómico típico del olivo conocido como vecería, que consiste en la alternancia en los cultivos en que el ciclo biológico del árbol determina producciones variables de aceituna, de forma alternante o consecutiva que coinciden a su vez, con épocas de mayor o menor emisión de polen.



Figura 1. Inflorescencia de *Olea europaea*.

La introducción de nuevas técnicas agrícolas, como las relacionadas con el regadío, que pretenden mantener constante la producción oleícola, tienden a minimizar este efecto aerobiológico y por tanto, su impacto en la clínica.

Las flores del olivo son pequeñas y actinomorfas, con simetría regular agrupadas en inflorescencias de 10 a 35 flores cada una. La flor se compone de cuatro sépalos verdes soldados en forma de cáliz campanulado y cuatro pétalos de color blanco amarillento, también soldados por la base que caen al final de la floración.



Figura 2. Microfotografía del polen de *Olea europaea*.

El polen de olivo es tricolporado, isopolar, con simetría radial; en visión ecuatorial, elíptico; en visión polar, circular. Su tamaño es pequeño o mediano de 22 a 25 por 20 a 25 μm . Superficie reticulada con lúmenes irregulares tan anchos o mas que los muros verrugosos. (D'Amato *et al.*, 1994. Subiza *et al.*, 2007).

La polinización de las flores de olivo es básicamente anemófila (Morettini *et al.*, 1953). La observación de la distribución del polen ha demostrado (Lave *et al.*, 1978) que este puede ser transportado por el viento a grandes distancias. Se ha detectado polen viable o fértil a mas de 7 Km de un

olivar. Hay también varios insectos que contribuyen a la polinización aunque no muy eficazmente.

Relevancia clínica y aerobiológica del polen de olivo

El polen de olivo es una de las causas mas importantes de enfermedad alérgica respiratoria en el área Mediterránea (Liccardi *et al.*, 1996). Es frecuente encontrar en la literatura una mayor prevalencia de sintomatología nasal y conjuntival causada por el polen de *O. europaea*, aunque puede inducir en zonas de alta exposición, exacerbaciones epidémicas de asma bronquial, entre últimos de abril y primero de junio, coincidiendo con los niveles máximos de polinización (Quiralte *et al.*, 2005).

En zonas geográficas donde el olivar es monocultivo, la concentración de polen alcanza cifras superiores a 6000 granos/ m^3 hacia la mitad de mayo, con un pico secundario en torno a 2000 granos/ m^3 en la primera semana de junio y con niveles entre 500 y 1000 granos/ m^3 durante al menos la mitad del periodo de polinización (Figura 3).

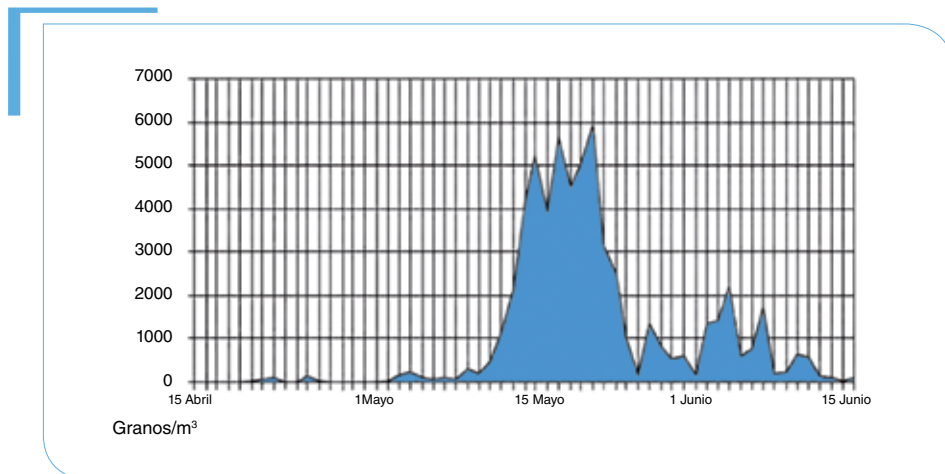


Figura 3. Distribución de las concentraciones de polen (en granos/m³) de la estación polínica del año 2000 en Jaén.

Seguramente, estos niveles de polen constituyen uno de los factores mas determinantes en la exacerbación estacional de la rinitis y el asma en los pacientes sensibles al polen de olivo.

En un estudio clásico, se demostró que concentraciones superiores a 50 granos/m³ podrían ser consideradas elevadas e inductoras de síntomas en pacientes sensibles a pólenes de hierbas (Davies *et al.*, 1973). Con una metodología similar, nosotros investigamos en Jaén, el umbral de concentración necesario para la aparición de sintomatología nasal y ocular en pacientes monosensibles a *O. europaea* (Florida *et al.*, 1999). En nuestro estudio, observamos una elevada correlación entre las puntuaciones medias de los síntomas clínicos y los recuentos diarios de polen de *O. europaea* durante los dos años que duró el estudio y, además, nos permitió establecer el umbral de polen necesario para inducir síntomas nasales, que resultó extremadamente alto (400 granos/m³), comparado con otros modelos polínicos, sugiriendo que el polen de olivo presenta una moderada alergenidad (Davies *et al.*, 1973). A pesar de ello, hasta un 30 % de los pacientes con rinitis y asma estacional de este estudio, presentaron una exacerbación asmática excepcionalmente intensa a niveles superiores a 1000 granos/m³ (Subiza *et al.*, 2007. Florida *et al.*, 1999).

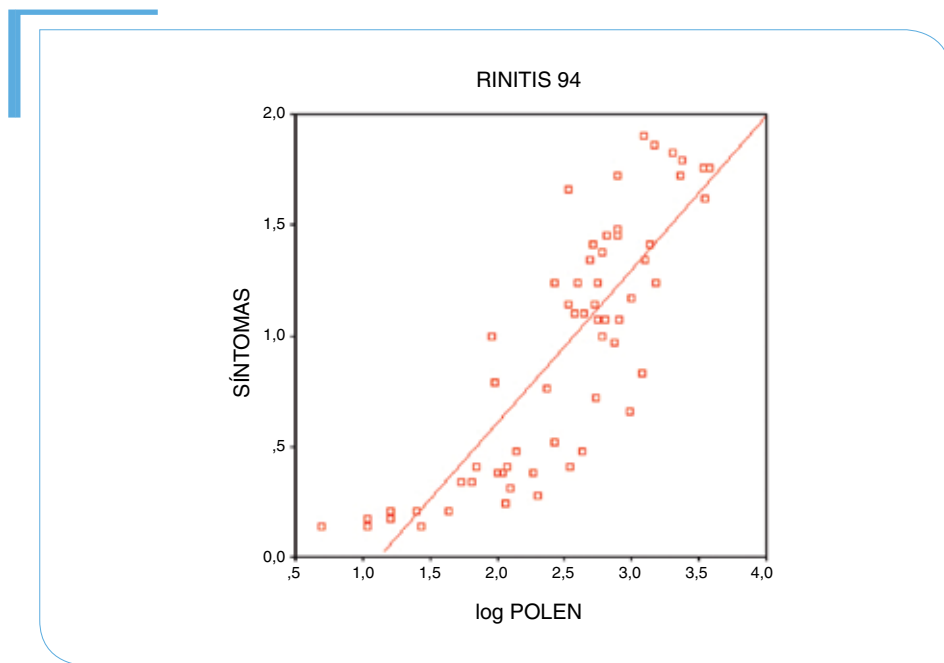


Figura 4. Recta de regresión de las puntuaciones medias de los síntomas conjuntivales y nasales frente a los logaritmos de los niveles aéreos de polen, medidos en Jaén durante la primavera de 1994 (Florido *et al.* 1999).

Es importante destacar que estos resultados corresponden a enfermos adaptados a altos niveles de exposición polínica, siendo conocido el distinto comportamiento de los enfermos residentes en zonas de distintos niveles polínicos (Arias de Saavedra, 1998). Estudios comparativos entre enfermos residentes en Madrid y Jaén han mostrado como estos últimos, con una mayor exposición al polen de olivo, muestran niveles mas altos de anticuerpos específicos junto a una respuesta cutánea de menor intensidad (Casanovas *et al.*, 1997).

Recientemente se ha comunicado (Brito *et al.*, 2011) que, junto a los niveles polínicos, el contenido en alérgenos del polen de olivo se asocia positivamente con síntomas de rinitis y asma en pacientes alérgicos al polen de olivo y como ambos datos pueden ser utilizados en el seguimiento clínico de los pacientes.



Los alérgenos¹ del polen de olivo

La respuesta mediada por IgE frente al extracto completo de polen de olivo es muy heterogénea, observándose mas de 20 bandas de distintas masas moleculares cuando se separa el extracto completo del polen mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SSD-PAGE) y es enfrentado a sueros de distintos enfermos reactivos (*immunoblotting*) (Rodríguez *et al.*, 2001. Rodríguez *et al.*, 2002) (Figura 5).

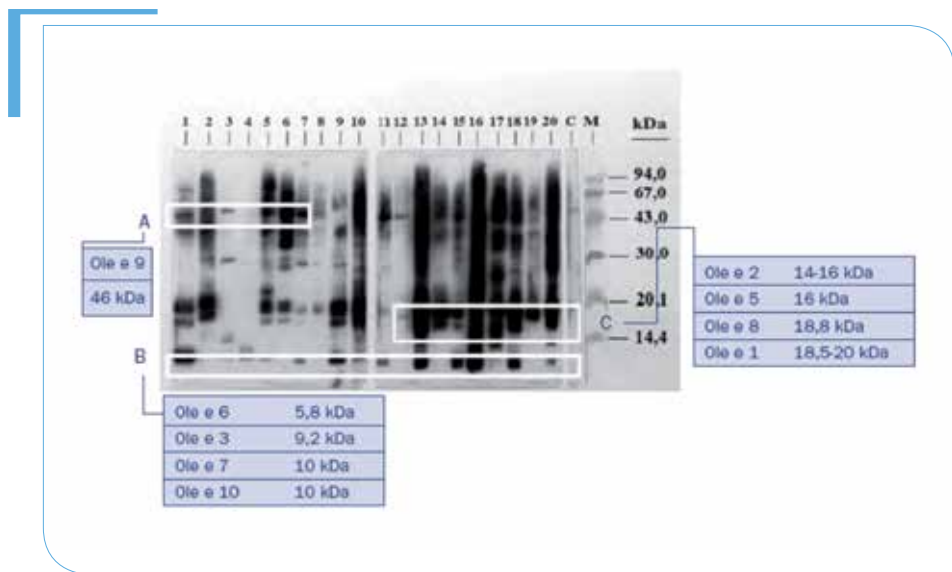


Figura 5. *Immunoblotting* de 20 pacientes alérgicos a polen de olivo.

En los últimos quince años se han descrito y caracterizado 11 alérgenos de polen de olivo. La evaluación de cada alérgeno se establece en términos de análisis de es-

¹ En la vigésima segunda edición del Diccionario de la Real Academia Española figura la palabra alérgeno. En la primera edición del Diccionario Panhispánico de dudas se admite también el uso de la forma llana alergenno indicando que debe preferirse el uso de la forma esdrújula.



estructura y secuenciación, con asignación a una familia de proteínas determinada con una probable función biológica y, sobre todo, con la demostración de una actividad inmunológica *in vitro* y, si es posible, *in vivo*. (tabla 1).

ALÉRGENOS	PREVALENCIA %	FAMILIA DE PROTEINAS
Ole e 1	55 – 90	
Ole e 2	24	Profilina
Ole e 3	20 – 30	Polcalcina
Ole e 4	80	*
Ole e 5	35	Cu/Zn superóxido dismutasa
Ole e 6	10 – 55	
Ole e 7	47	Proteína transferencia lípidos
Ole e 8	5	Polcalcina
Ole e 9	65	1,3 β -glucanasa
Ole e 10	55 – 69	CBM**
Ole e 11	56 – 76	Pectina metil esterasa

* Algunos autores sugieren que Ole e 4 probablemente es un subproducto de la degradación proteolítica de Ole e 9.

** CBM, *Carbohydrate-binding module family*.

Tabla 1. Alérgenos del polen de olivo, prevalencia de IgE y familias de proteínas.

En los primeros estudios de la alergia al polen de olivo, varios componentes alergénicos fueron detectados en los extractos de polen. Bandas proteicas de 17, 19, 32, 42, y 65 kDa, fueron reseñadas por distintos autores (Vela *et al.*, 1982. Blanca *et al.*, 1983. Rubio *et al.* 1987. Lazaurica *et al.*, 1988a). Con posterioridad, un componente de 20 kDa denominado Ole e 1 fue reconocido como el alérgeno mayor del polen de olivo (Lazaurica *et al.*, 1988b; Villalba *et al.*, 1990; Wheeler *et al.*, 1990; Lombardero *et al.*, 1992; De Cesare *et al.*, 1993; Villalba *et al.*, 1993). Ole e 1 es la proteína mas abundante en los extractos de polen de olivo, representando un 20 % del total de las mismas y exhibe un rango de prevalencia del 55 al 90 %.



En la segunda mitad de la década de 1990, otros alérgenos con diferente significación clínica fueron identificados y caracterizados, siendo denominados desde Ole e 2 a Ole e 8 (Batanero *et al.*, 1996. Asturias *et al.*, 1997. Batanero *et al.*, 1997. Boluda *et al.*, 1998. Ledesma *et al.*, 1998. Tejera *et al.*, 1999. Ledesma *et al.*, 2000). Con posterioridad, la existencia de dos alérgenos de 36 y 45 kDa fue reseñada (Martínez *et al.*, 2000. González *et al.*, 2000) y mas tarde el aislamiento y caracterización de Ole e 9 fue comunicado (Huescas *et al.*, 2001).

Alérgenos mayores y menores

Algunas proteínas del olivo han sido consideradas como alérgenos mayores, porque su prevalencia es mas alta del 50 %. De hecho: Ole e 1, Ole e 4 y Ole e 9 exhiben respectivamente prevalencias de: 55-90 %, 80 % y 65 %. Sin embargo, se conoce que los datos de prevalencia son dependientes de algunas condiciones: población, técnica y fuente del extracto de polen. El área geográfica de la población en la cual la prevalencia es analizada constituye un factor determinante de los resultados (Rodríguez *et al.*, 1998). Como ejemplo, diferencias notables en las prevalencias de Ole e 1 y Ole e 6 eran observadas en poblaciones que habitan en áreas con altos niveles de polen frente a las de bajos contajes (Batanero *et al.*, 1997. Batanero *et al.*, 1999. Rodríguez *et al.*, 1998).

Además, los resultados dependen del método utilizado para el análisis, porque los epítomos conformacionales se pierden cuando agentes desnaturalizantes son utilizados. Ole e 2 era reconocido en *immunoblotting* por un 24 % de los sueros de los alérgicos al olivo, viéndose aumentado este valor, por encima del 50 %, cuando el análisis era realizado por enzimoimmunoensayo (Ledesma *et al.*, 1998). Finalmente la marcada variabilidad que han mostrado los componentes alergénicos de diferentes cultivares de *Olea* (Barber *et al.*, 1990. Waisel *et al.*, 1996) podría llevar a la ambigüedad en las respuestas de unión a la IgE, detectadas para los alérgenos insuficientemente representados en algunos extractos de polen.

Por lo tanto, los datos de prevalencia de los alérgenos de olivo son preliminares y deberán ser revisados para todos los alérgenos conocidos, bajo idénticas condiciones, usando diferentes métodos y con diferentes poblaciones de alérgicos.



En nuestro medio y en una población expuesta a altas concentraciones de polen de olivo, la sensibilidad a los distintos alérgenos queda recogida en la figura 6.

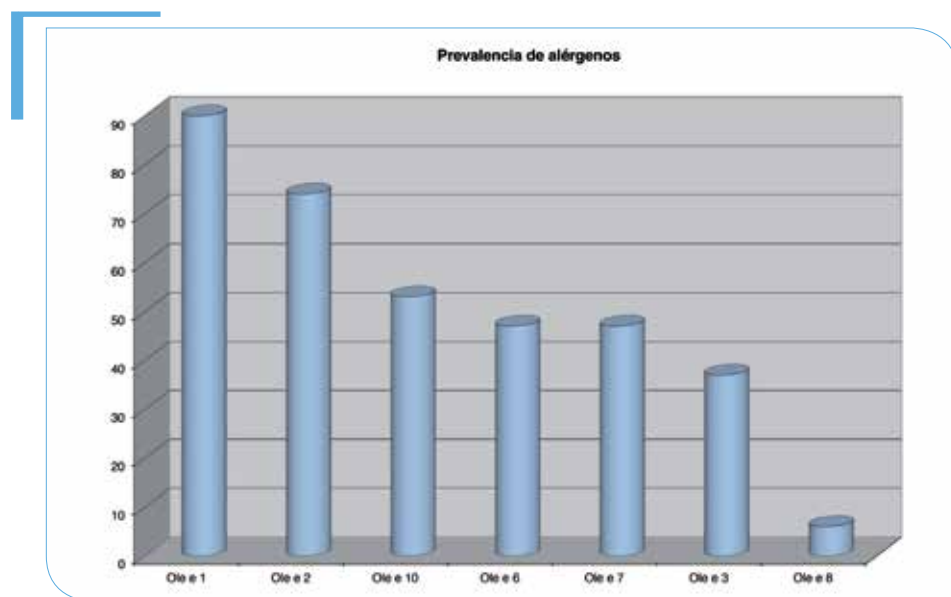


Figura 6. Porcentajes de sensibilización a los alérgenos de *Olea europea* en la población de Jaén (López-Pascual *et al.* 2005).

Ole e 1²

Ole e 1 fue la primera proteína aislada y purificada del polen de olivo (Villalba *et al.*, 1993). Se expresa en el tejido polínico y no en otros como las hojas o el fruto. Además del grano de polen se ha localizado en el *tapetum* de las anteras durante el desarrollo de la microspora. Estos hallazgos sugieren que está relacionado con la germinación del polen, crecimiento del tubo polínico y hidratación del polen (Twell *et al.*, 1989. Alche *et al.*, 1999).

² Los alérgenos son designados siguiendo las instrucciones del *IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee* (Chapman MD, 2008).



Es la proteína mas abundante en los extractos de polen de olivo, y su eliminación completa de los mismos conduce a una casi desaparición de la actividad alérgica.

Es una glicoproteína polimorfa de masa molecular de 18.5 kDa. Posee una única cadena polipeptídica con 145 aminoácidos que, además presenta un sitio de N-glicosilación en la asparragina 111 y contiene en su secuencia 6 restos de cisteína que originan tres puentes disulfuro.

Ole e 1 es una proteína que muestra en SDS-PAGE un patrón complejo formado por dos bandas mayoritarias de 18.5 y 20 kDa, estando esta última glicosilada. El componente glicosilado de este alérgeno ha sido purificado estando formado por distintas glicoformas complejas ricas en manosa. Este oligosacárido constituye un importante determinante antigénico, siendo capaz de producir liberación de histamina en los basófilos de pacientes alérgicos al polen de olivo (Batanero *et al.*, 1994).

Ole e 1 es uno de los alérgenos mayoritarios del polen de olivo, con una prevalencia IgE estimada de un 70 % (Lauzurica *et al.*, 1988. Villalba *et al.*, 1993), pudiendo diferir de un área geográfica a otra entre un 55 y un 90 %. Ole e 1 pertenece a una gran familia de proteínas homólogas en las que están incluidas proteínas de otras *Oleaceae*: Fra e 1, Lig v 1, Syr v 1, así como otros alérgenos Ole e 1-like como Che a 1, Lol p 11, Pla l 1 y Phl p 11. Recientemente se ha demostrado que los epítomos de Ole e 1 exclusivamente están presentes en los pólenes de *Oleaceae* (*Fraxinum*, *Ligustrum*, *Syringa*) y la presencia de IgE anti Ole e 1 en el suero de pacientes sensibilizados no conduce por tanto a reactividad cruzada con otros pólenes de familias taxonómicamente no relacionadas (como por ejemplo, *Graminaceae*, *Chenopodiaceae* o *Plantaginaceae*). (Palomares *et al.*, 2006).

Ole e 1 ha sido expresada en *E. coli* como proteína recombinante presentando una funcionalidad diferente del alérgeno natural, posiblemente por la imposibilidad de glicosilación a través de este sistema bacteriano. Sin embargo, la proteína expresada en la levadura *Pichia pastoris* (un sistema heterólogo que ha mostrado ser muy eficiente en la producción de proteínas glicosiladas y con una elevada cantidad de puentes disulfuro), presenta la misma conformación estructural e idéntica capacidad de unión a IgE e IgG que el alérgeno nativo.



En el año 2000, nuestro grupo evaluó la actividad inmunológica *in vivo* e *in vitro* de rOle e 1 expresado en *P. pastoris* en una población de pacientes con polinosis por *O. europaea* en Jaén (Quiralte *et al.*, 2000). Se demostró que rOle e 1 presenta una actividad inmunológica *in vivo* (*prick test*) comparable con el alérgeno natural, presentando una correlación significativa entre las superficies de las pápulas inducidas por ambos alérgenos. Usando también un ensayo alérgeno específico por ELISA se analizó igualmente la capacidad de unión de las moléculas de IgE a Ole e 1 natural (nOle e 1) y rOle e 1. La comparación de los niveles de IgE anti-nOle e 1 y anti-rOle e 1 en los pacientes no revelaron diferencia significativa, mostrando además, una intensa correlación cuando fueron comparados entre sí. (Quiralte *et al.*, 2000).

Ole e 2

El alérgeno Ole e 2 pertenece al grupo de las profilinas (Ledesma *et al.*, 1998). Son proteínas fijadoras de actina y constituyen una familia de proteínas que controlan ciertas funciones de las células eucariotas, entre ellas la participación activa en los procesos de movimiento citoesquelético, subyacentes a múltiples fenómenos de movilidad.

Las profilinas constituyen una familia de proteínas ampliamente distribuida cuya presencia se ha descrito en muchos pólenes, alimentos de origen vegetal, látex, ameba, embrión de pollo e incluso en el hombre. Su ubicuidad, junto con su secuencia altamente conservada (un 70 % entre las profilinas de origen vegetal) hace que hayan sido consideradas como un importante panalérgeno causante de reactividad cruzada. Por ello la mayoría de los pacientes primariamente sensibilizados frente a una profilina de una fuente concreta, podrían ser alérgicos a otras profilinas. (Valenta *et al.*, 1992).

Ole e 2 ha sido purificada, aislada y secuenciada (Ledesma *et al.*, 1998). Sus propiedades moleculares e immunoquímicas no difieren de las de otras profilinas. Se ha detectado una prevalencia del 24 % (exclusivamente a través de *immunoblotting*) para la profilina de olivo en pacientes alérgicos al polen de *Olea europaea* en zonas de baja exposición a este polen y se ha comprobado una importante reactividad cruzada con pólenes de *Graminaceae*, *Betula verrucosa* y especies de la familia *Oleaceae*.



Ole e 3 y Ole e 8

La actividad bioquímica es una de las principales propiedades que permiten conocer el comportamiento de una proteína. Dos de los alérgenos del olivo son proteínas ligantes de Ca^{2+} : Ole e 3 y Ole e 8, debido a que poseen un carácter común fundamentado en 12 residuos de aminoácidos consecutivos llamados *EF-hand*, formando un rizo conformacional que es capaz de enlazar iones Ca^{2+} , Ole e 8 contiene cuatro de esos caracteres (Ledesma *et al.*, 2000), mientras que Ole e 3 posee solo dos (Batanero *et al.*, 1996). Se ha sugerido que Ole e 3 podría tener relación con funciones reproductivas del polen.

Ole e 3 es una proteína de pequeña masa molecular (9.2 kDa) y ácida (pI 4.2-4.3) sin residuos aromáticos de triptófano o tirosina. La prevalencia de IgE anti-Ole e 3 oscila entre un 20 % y un 30 % y la de anti-Ole e 8 en torno a un 5 %, en diferentes poblaciones de pacientes alérgicos a polen de olivo de distintas localizaciones geográficas. Posee una cadena simple de 84 aminoácidos con dos lugares de unión del Ca^{2+} y exhibe una alta similitud con proteínas del polen de colza, *Phleum pratense*, abedul y aliso, presentando entre un 60 % y un 95 % de identidad.

La proteína ligante de calcio Ole e 8 ha sido obtenida, tanto en su forma natural (nOle e 8) como clonada y producida en *Escherichia coli* (rOle e 8). Las formas recombinante y natural resultaron inmunológicamente equivalentes, al inhibir completamente la unión a Ig G del suero policlonal obtenido frente a una y otra proteína (Ledesma *et al.*, 2002).

Todos estos alérgenos homólogos del polen se constituyen en una familia, con una secuencia altamente conservada, de proteínas ligantes del calcio, tipo *EF-hand*, para las cuales se ha propuesto el nombre de polcalcina. Una propiedad importante de esta familia de proteínas, al igual que la descrita con las profilinas, es su alta homología en las secuencias de aminoácidos y en sus estructuras tridimensionales, que sin duda explica su impacto real en los procesos de reactividad cruzada entre diferentes fuentes alérgicas de origen vegetal en donde están representadas (*Betulaceae*, *Oleaceae*, *Graminaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae*).



Así las polcalcinas y la profilina del polen de olivo pueden ser consideradas como marcadores biológicos de polisensibilización a pólenes (Rodríguez *et al.*, 2007) y posiblemente en el futuro, podrían ser incorporados al diagnóstico molecular de la polinosis, permitiendo una aplicación directa en la toma de decisiones terapéuticas, especialmente en el diseño y elección de vacunas alergénicas.

Ole e 4

Ole e 4 es un importante alérgeno con elevada capacidad de unión a IgE (80 %). Está constituido por una única cadena polipeptídica con masa molecular de 32 kDa y presenta al menos tres isoformas de pI entre 4.6 y 5.1

Su función es desconocida y su extremo N-terminal no tiene homología con otras proteínas conocidas.

Algunos autores han puesto en duda la existencia de este alérgeno y sugieren que la proteína denominada Ole e 4 pudiera ser probablemente un subproducto de la degradación proteolítica de la 1,3-betaglucanasa Ole e 9 (Rodríguez *et al.*, 2007).

Ole e 5

Ole e 5 fue purificado y caracterizado parcialmente por Boluda *et al.* en la década de los noventa (Boluda *et al.*, 1998). Es un alérgeno minoritario o secundario con una frecuencia de unión a IgE del 35 % y una masa molecular de 16 kDa. Tiene, al menos, cinco isoformas con puntos isoeléctricos en el rango de 5.1 a 6.5, similar al de Ole e 1.

Los datos preliminares de análisis de la secuencia N-terminal mostraron un alto grado de homología con la enzima superóxido-dismutasa (SOD) (Boluda *et al.*, 1998). Recientemente el alérgeno ha sido clonado y expresado de forma completa en *E. coli*, confirmándose que Ole e 5 es la primera Cu/Zn SOD identificada como un alérgeno en una fuente de polen (Butteroni *et al.*, 2005). Debido a la ubicuidad de esta familia



de enzimas, este alérgeno también podría jugar un papel relevante en los fenómenos de reactividad cruzada y polisensibilización.

Ole e 6

Ole e 6 fue purificado, caracterizado y secuenciado por Batanero *et al.* en 1997 (Batanero *et al.*, 1997). Es el alérgeno mas pequeño del polen de olivo. Se trata de una proteína muy ácida (pI 4.2), compuesta de una cadena polipeptídica de 50 aminoácidos, con 6 residuos de cisteína en su estructura. Su masa molecular es de 5830 Da y presenta una frecuencia media de unión a la IgE del 15 %.

No tiene homología con otros polipéptidos conocidos. La forma recombinante de Ole e 6 ha sido producida y caracterizada en *P. pastoris* y este modelo ha constituido una herramienta fundamental para determinar detalles sobre su estructura, el probable establecimiento de los diferentes epítomos alergénicos y para el análisis de su función biológica en el polen (Treviño *et al.*, 2004).

Ole e 7

Ole e 7 fue identificada y purificada por Tejera en 1999 (Tejera *et al.*, 1999). Es un polipéptido muy soluble de 88 aminoácidos de 10 kDa de masa molecular que exhibe un alto grado de polimorfismo. Los anticuerpos frente a Ole e 7 aparecen con una frecuencia del 47 % de pacientes con polinosis por olivo, pero este valor se incrementa dramáticamente en poblaciones que están expuestas a altos niveles de este polen. Posiblemente, este hecho esté en relación con la observación clínica que relaciona la existencia la existencia de IgE anti-Ole e 7 con una mayor tasa de reacciones adversas durante los ciclos de administración de vacunas alergénicas de polen de olivo (Rodríguez *et al.*, 2007).

Ole e 7 está compuesto de varias isoformas. La secuencia N-terminal (21 aminoácidos) de dos isoformas del alérgeno revela una homología limitada con las proteínas de transferencia de lípidos (PTLs) de otros tejidos vegetales (Rodríguez *et al.*, 2007).



Ole e 9

Ole e 9 es uno de los alérgenos mayores del polen de olivo, afectando a más del 65 % de los pacientes alérgicos a este polen (Huescas *et al.*, 2001). Esta proteína está incluida en el grupo 2 de las proteínas relacionadas con la patogénesis. Está formada por una cadena polipeptídica glicosilada (434 aminoácidos) con masa molecular de 46 kDa. Tiene actividad 1,3- β glucanasa y se ha demostrado que posee dos dominios independientes.

El dominio N-terminal (NtD) de Ole e 9 comprende alrededor de 320-350 aminoácidos, posee la actividad 1,3- β glucanasa y, por ello, está involucrado en los procesos de reactividad cruzada entre polen, látex y alimentos de origen vegetal. (Palomares *et al.*, 2005).

El dominio C-terminal (CtD) de Ole e 9 está formado por 101 residuos de aminoácidos y una de sus funciones es su capacidad de unión a 1,3-betaglucanos. Recientemente se ha dilucidado la estructura tridimensional de CtD (Barral *et al.*, 2004), permitiendo así aproximarnos a la compleja relación entre estructura y alergenicidad, y comenzar a comprender lo que constituirán itinerarios clínicos muy diferenciados dentro de los pacientes con alergia al polen de olivo. (Treviño *et al.*, 2008).

Ole e 9 ha sido reconocida como un relevante alérgeno, porque es capaz de unirse a la IgE del 65 % de los sueros de pacientes alérgicos a los extractos de polen de olivo. (Huescas *et al.*, 2001) Esto también indica que puede ser considerada como un alérgeno mayor, con un valor de prevalencia muy próximo del de Ole e 1.

Un caso de alergia ocupacional en un investigador debida a Ole e 9 ha sido descrita (Palomares *et al.*, 2008). El trabajador en alérgenos de polen de olivo durante diez años y manipulando en concreto el alérgeno Ole e 9 y derivados recombinantes del mismo y expuesto a diario a esas moléculas, comenzó a sufrir en 2005 sintomatología de rinoconjuntivitis alérgica mientras manipulaba extractos de polen de oliva enriquecidos en la fracción de 33 a 55 kDa. Los síntomas siempre aparecían en el lugar de trabajo y concomitantemente a la manipulación de las referidas proteínas. El *Prick* test con una batería comercial de neumoaérgenos (ALK-Abelló S.A. Madrid) era positivo



a *Olea europaea* y negativo a pólenes de otros árboles, hierbas, arbustos y epitelios de animales. El *immunoblotting* llevado a cabo con alérgenos purificados de polen de olivo fue negativo en todos los casos a excepción con el alérgeno Ole e 9 purificado.

Ole e 10

Ole e 10 es una pequeña proteína (10 kDa) ácida (pI 5.8) que ha sido identificada como un alérgeno mayoritario del polen de olivo, con una prevalencia del 55 % entre los pacientes alérgicos al polen de olivo y que recientemente ha sido aislada y caracterizada (Barral *et al.*, 2005).

Ole e 10 muestra reactividad cruzada con Ole e 9, que podría estar explicada por la similitud de secuencia entre Ole e 10 y CtD Ole e 9. Sin embargo, los resultados de ELISA-inhibición mostraron diferencias detectables para la IgE específica, indicando que estas proteínas son inmunológicamente distintas. De hecho, varios sueros mostraron una respuesta IgE superior a Ole e 10 que a Ole e 9, indicando que Ole e 10 es un alérgeno *per se* y ambos pueden actuar como sensibilizadores primarios. Además, Ole e 10 muestra reactividad cruzada con proteínas de otros pólenes, látex y alimentos vegetales cuyos extractos son capaces de inhibir la respuesta IgE de Ole e 10.

Por tanto, Ole e 10 es el primer miembro de una nueva familia de panalérgenos, denominada *carbohydrate (betaglucan)-binding protein module*, que muestra una importante reactividad cruzada intra e inter-especies de gran relevancia en los síndromes polen-polen, polen-látex, polen-frutas y polen-latex-frutas (Barral *et al.*, 2005).

Ole e 11

Recientemente un nuevo antígeno ha sido detectado mediante técnicas proteómicas. Se trata de un polipéptido de 342 aminoácidos, con una masa molecular de 34.4 kDa y un pI de 7.8. El alérgeno ha sido identificado como una pectina metil esterasa y muestra baja identidad con otros miembros de esta familia procedentes de alimentos tales como zanahoria (23 %), naranja (25 %) y tomate (24 %) y alta iden-



tividad con los procedentes de *Arabidopsis thaliana* (57 %) y *Salsola kali* (54 %). La proteína ha sido producida en *Pichia pastoris*, purificada y caracterizada como enzima activa. La proteína recombinante ha mostrado ser inmunológicamente equivalente a la forma natural por *immunoblotting*, ELISA indirecta y ensayos de inhibición, usando antisueros policlonales y sueros de pacientes alérgicos a polen de oliva. La prevalencia fluctúa entre 55.9 % y 75.6 % en estudios realizados en tres diferentes poblaciones (Salamanca *et al.*, 2010).

Alérgenos recombinantes del polen de olivo

Uno de los mayores objetivos de la investigación en alergia es conseguir herramientas para el diagnóstico y para la inmunoterapia específica. Los extractos alérgenos convencionales usados para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* son obtenidos a partir de fuentes biológicas y consisten en una mezcla de componentes alérgenos y altas cantidades de productos indeseables que pueden interferir en el diagnóstico. Además contienen concentraciones variables y desconocidas de alérgenos que algunas veces pueden estar dañados por oxidación o proteólisis. En contraste, mezclas de alérgenos purificados pueden ser usadas y parámetros, como la concentración, integridad-estructural y actividad inmunológica pueden ser controlados, evitando problemas relativos a la variabilidad de la composición de diferentes lotes y a la baja concentración de muchos componentes alérgenos, previniendo la sensibilización *de novo* (Valenta *et al.*, 1999. Valenta *et al.*, 2007).

Los alérgenos purificados pueden ser preparados por aislamiento desde sus fuentes naturales o por producción recombinante. Las dificultades técnicas y el bajo rendimiento en la purificación de alérgenos naturales ha llevado a considerar las metodologías de biología molecular como la mejor vía para obtener cantidades no limitadas de alérgenos para el diagnóstico. De hecho la sensibilidad y especificidad de las determinaciones moleculares y clínicas están siendo mejoradas, reemplazando los extractos naturales por alérgenos recombinantes, de forma que su valor predictivo sea incrementado. El concepto de marcador recombinante alérgico, para redefinir el diagnóstico puede aumentar la información, al identificar las proteínas provocadoras de la alergia y mejorar la inmunoterapia por selección de pacientes para tratamientos



a medida. Finalmente las moléculas específicas cDNA pueden ser manipuladas en orden a modificar algunas propiedades estructurales de las proteínas que puedan incrementar su estabilidad o reducir su potencial alergénico (Valenta *et al.*, 2002. Valenta *et al.*, 2007. Linhar *et al.*, 2005).

Durante la última década, procedimientos de clonaje, secuenciación y expresión recombinante han sido aplicados al estudio de un amplio número de alérgenos y la mayoría de los alérgenos del polen de olivo han sido obtenidos usando tales procedimientos.

Diseño y producción de alérgenos recombinantes del polen de olivo

Cuatro sistemas heterólogos se han usado en la expresión recombinante de los alérgenos del polen de olivo: la bacteria *Escherichia coli*, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, células de insectos de *Spodoptera frugiperda* y plantas de *Arabidopsis thaliana*. La bacteria *Escherichia coli* se ha utilizado para producir proteínas como Ole e 3 y Ole e 8, las cuales no necesitan una maduración post-translacional. Sin embargo las bacterias no cuentan con los mecanismos adecuados para unir glicanos a las cadenas polipeptídicas y las glicoproteínas son expresadas como derivados libres de azúcares. De otra parte el reducido medio ambiente del citoplasma de *E. coli* dificulta la construcción de los puentes disulfuro. Por lo tanto, alérgenos como Ole e 1 (una glicoproteína con 3 puentes disulfuros) y Ole e 6 (un pequeño polipéptido con 3 puentes disulfuro) deben ser producidos en células eucarióticas.

El primer intento para producir rOle e 1 fue una fusión proteica con glutathione S-transferasa en *E. coli*, sin embargo resultó infructuoso (Villalba *et al.*, 1994). Después de la purificación por cromatografía de afinidad y digestión específica con trombina, el rOle e 1 era obtenido como agregados de alta masa molecular, aunque una pequeña proporción aparecía como forma soluble monomérica. Este pobre rendimiento los llevo a utilizar la expresión de Ole e 1 en *P. pastoris*. Transformando las células de *P. pastoris* GS115 mediante el plásmido de expresión pPIC9 que portaba cDNA codificante de Ole e 1 unido a un péptido de secreción de *Saccharomyces cerevisiae* (Huescas *et al.*, 1999), rOle e 1 fue secretado al medio extracelular como una sin-



gular y sobrepresada cadena polipeptídica. Un simple procedimiento de purificación produjo la proteína soluble pura. Las propiedades estructurales e inmunológicas de rOle e 1 fueron equivalentes a las del alérgeno natural. Las capacidades de unión a IgG e IgE in vitro fueron idénticas para las formas natural y recombinante de Ole e 1 (Huescas *et al.*, 1999).

Ole e 3 y Ole e 8 han sido expresados en *E. coli* (Ledesma *et al.*, 1998b. Ledesma *et al.*, 2000). Estas proteínas ligantes del calcio que no poseen compuestos glicosilados ni puentes disulfuro han sido producidas con alto rendimiento. En ambos casos, los productos recombinantes fueron evaluados en su integridad estructural e inmunológica y su habilidad funcional para ligar el ión calcio. Ambos, Ole e 3 y Ole e 8 han sido también producidos en *Arabidopsis thaliana*, manteniendo la integridad bioquímica e inmunológica de los alérgenos naturales (Ledesma *et al.*, 2006). Este sistema de expresión basado en las plantas presenta ventajas de producción al poseer una maquinaria post translacional análoga a la de la fuente natural de los alérgenos del polen de oliva. Ha servido como un modelo para usar plantas transgénicas como sistema alternativo para producir alérgenos recombinantes para ser incluidos en protocolos de vacunación.

Aunque la levadura *P. pastoris* ha sido usado como sistema de expresión para alérgenos con complejos pliegues y diferentes modificaciones post-translacionales, la producción de Ole e 10, una pequeña proteína (10 Kda), con tres puentes disulfuro ha sido conseguida usando tanto levadura (Barral *et al.*, 2005 b) y células de insectos (Barral *et al.*, 2006). Mejores rendimientos y menores degradaciones de la molécula recombinante se han conseguido usando células de expresión de Baculovirus/insectos que con *Pichia*, siendo el alérgeno aislado como una proteína soluble, estable y funcional.

Células de *P. pastoris* han sido también usadas para producir la pequeña proteína Ole e 6 (Barral *et al.*, 2004b) y fragmentos o dominios de derivados de otros alérgenos del polen de oliva. A pesar de ser una pequeña cadena polipeptídica (50 aminoácidos), Ole e 6 tiene 3 puentes disulfuros y la levadura es un huésped adecuado para su producción; la proteína recombinante fue purificada con un alto rendimiento y plegada correctamente siendo usada para determinar la estructura tridimensional del



alérgeno (Treviño *et al.*, 2004). Además los dominios C-terminal y N-terminal de la 1,3- β glucanasa Ole e 9 han sido producidos como proteínas recombinantes en *P pastoris* con un alto rendimiento y manteniendo sus propiedades intrínsecas (Palomares *et al.*, 2005. Rodríguez *et al.*, 2007b).

Finalmente la ingeniería genética ha sido usada para producir variantes hipoalergénicas de alérgenos clínicamente relevantes. Las variantes hipoalergénicas de los alérgenos han sido usadas como agentes terapéuticos para un tratamiento mas seguro y efectivo de la alergia, puesto que exhiben reducida o ausente su capacidad de unión a IgE pero retienen la reactividad de las células T (Valenta *et al.*, 2002. Huescas *et al.*, 1999. Larche *et al.*, 2006). Tres mutantes de Ole e 1, designados en base a la disrupción del epítipo IgE inmunodominante localizado en la secuencia C-terminal de la molécula, han sido producidos en *P pastoris*. Sus propiedades inmunológicas han sido evaluadas *in vitro* e *in vivo*. (Marazuela *et al.*, 2007). Además usando un modelo en ratón de alergia a Ole e 1 se ha demostrado que la administración intranasal de las mejores variantes hipoalergénicas de Ole e 1 eran tan efectivas como los alérgenos en prevenir la síntesis de anticuerpos IgE, la inflamación de las vías aéreas y los cambios respiratorios producidos por el alérgeno (Marazuela *et al.*, 2006). Así este mutante podría sustituir al alérgeno natural para inducir tolerancia.

Diagnostico con alérgenos recombinantes del polen de olivo

De todas las aplicaciones de los alérgenos recombinantes, su uso en el diagnóstico e inmunoterapia son del máximo interés para la práctica clínica. El diagnostico basado en los componentes alergénicos individuales permite determinar enfermedades específicas provocadas por los alérgenos (Valenta *et al.*, 1999). Tomando los alérgenos recombinantes del polen del olivo disponibles, tres objetivos se pueden fijar en el diagnóstico: a) Ole e 1 puede ser usado como marcador genuino de la sensibilización a polen de la Oleaceae; b) los panalérgenos Ole e 2 and Ole e 3 pueden ser usados para el diagnóstico de polisensibilizados y c) alérgenos minoritarios tales como Ole e 6, Ole e 9 o Ole e 10 sirven para identificar sensibilización específica a esas moléculas, las cuales son a menudo difíciles de detectar usando los extractos corrientemente disponibles.



Nuestro grupo (Quiralte *et al.*, 2002) ha estudiado la utilidad diagnóstica de la combinación de distintos alérgenos en la alergia al polen de olivo. Los resultados quedan recogidos en la tabla 2.

ALÉRGENOS	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
Ole e 1, Ole e 3	94.1	100
Ole e 1, Ole e 2	94.9	100
Ole e 1, Ole e 7	94.9	100
Ole e 1, Ole e 6	95.7	100
Ole e 1, Ole e 3, Ole e 6	96.6	100
Ole e 1, Ole e 3, Ole e 7	96.6	100
Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3	97.4	100
Ole e 1, Ole e 2, Ole e 6	100	100
Ole e 1, Ole e 2, Ole e 7	100	100

Tabla 2. Valores diagnósticos de distintas combinaciones de alérgenos ensayados mediante *prick test*.

La combinación de Ole e 1 y Ole e 2, junto con uno de los alérgenos minoritarios Ole e 6 u Ole e 7 arrojan la misma eficacia diagnóstica que la obtenida con el extracto crudo de polen de olivo.

Ole e 1 como un marcador diagnóstico para la sensibilización al polen de las Oleaceas

Es bien conocido que Ole e 1 pertenece a una amplia familia de proteínas homologas que son específicamente expresadas en polen (Villalba *et al.*, 1994). Esta familia comprende miembros alergénicos como Ole e 1, Fra a 1, Lig v 1, Syr v 1, Che a 1, Lol p 11, Pla l 1 y Phl p 11, y miembros no alergénicos como BB18 del abedul. Otros miembros de la familia son conocidos a través de su correspondiente secuencia de



nucleótidos y sus proteínas maduras derivadas no han sido aisladas o caracterizadas, y por tanto su potencial poder alergénico no ha sido explorado. Este es el caso de genes del tomate, maíz, arroz, *Pholaris coerulenscens*, *Sambucus nigra* o *Arabidopsis thaliana*, las cuales pertenecen a la familia "similares a Ole e 1". Por lo tanto debemos preguntarnos para los miembros de esta familia de proteínas acerca de su reactividad inmunológica cruzada.

Recientemente ha sido demostrado que epítomos de Ole e 1 están solamente presentes en el polen de *Oleaceae* (Palomares *et al.*, 2006). En colaboración con el grupo del Dr Valenta (Universidad de Viena), Rodríguez y colaboradores (Rodríguez *et al.*, 2007) ensayaron sueros de dos diferentes poblaciones europeas- una de Madrid sensibilizada a Ole e 1 y otra no sensibilizada al polen de olivo (pacientes de Viena, Austria)- para realizar ensayos de inhibición de la unión de Ole e 1 a IgE, que eran preincubados con extractos totales de diferentes pólenes alergénicos. Solamente los pólenes de las Oleaceas eran hábiles para inhibir el reconocimiento de la proteína. Pólenes de abedul, hierba timotea y artemisa no eran capaces de inhibir la unión de la IgE del suero a Ole e 1. Curiosamente la IgE del suero de pacientes de Viena (sin contacto con el polen de olivo) reconocían Ole e 1. Esto sugiere que la sensibilización está inducida por proteínas pertenecientes a la familia "similar a Ole e 1" probablemente presentes en el polen de abedul. El extracto proteico preparado con polen de abedul evitaba completamente la unión de los anticuerpos IgE al Ole e 1, lo que demostraba la presencia de todos los epítomos del Ole e 1 en el polen de abedul.

Sin embargo, usando técnicas ELISA para el reconocimiento de los diferentes miembros de la familia "similar a Ole e 1" por la IgE del suero de pacientes alérgicos al olivo se demostró que los alérgenos de esta familia pertenecían a fuentes taxonómicamente no relacionadas que no compartían epitopos con Ole e 1. De hecho se obtuvieron niveles muy altos de IgE específica a Ole e 1, mientras los mismos pacientes daban resultados negativos frente a Che a 1, Lol p II y Phl p II. Por lo tanto la presencia de IgE específica a Ole e 1 en el suero de pacientes sensibilizados no conducía a reactividad cruzada con polen de no Oleaceas.

Estos experimentos resultaron ser razonablemente explicados comparando las secuencia de aminoácidos de los miembros de esta familia de proteínas. Valores de



identidad superiores al 80 % (91% al 95% de similitud) eran obtenidos para los miembros de la familia *Oleaceae* e inferiores al 50 % (<59 % de similitud) para el resto de los miembros. Así, todos estos análisis refuerzan el hecho de que la sensibilización a Ole e 1 indica sensibilización primaria al polen de las *Oleaceae*.

Ole e 2 y Ole e 3 como marcadores de polisensibilidad

Ole e 2 y Ole e 3 pertenecen a dos bien conocidas familias de panalérgenos denominados profilinas y polcalcinas respectivamente. Las primeras engloban un amplio número de profilinas de plantas y tejidos animales y las polcalcinas se expresan solamente en polen de árboles, malas hierbas e hierbas. Muchos miembros han sido recogidos como alergénicos: profilinas de frutas, vegetales, pólenes y látex; polcalcinas de *Betulaceae*, *Oleaceae*, *Graminaceae*, *Chenopodiaceae* y *Brassicaceae*. Una propiedad molecular interesante de estas familias de proteínas es la alta conservación de su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional. Mas del 70 % de identidad en la secuencia se obtiene cuando se comparan pares de profilinas y mas del 60 % cuando se comparan pares de polcalcinas. Esto explica el por que están envueltas en el proceso de reactividad cruzada entre distintas plantas.

Ledesma *et al.* han clonado, aislado, secuenciado y producido profilinas recombinantes y polcalcinas de *Oleaceae* y *Chenopodiaceae* (Ledesma *et al.*, 1998. Bardenas *et al.*, 2004). En dos experimentos iniciales demostraron como antisueros policlonales Ole e 3 específicos podían reconocer bandas proteicas de extractos de polen de abedul, trigo, hierbas, lilas y fresno y como esos extractos de polen pueden inhibir la unión al Ole e 3. En estudios mas recientes se obtuvieron resultados similares usando la profilina de *Chenopodium album* y extractos de una variedad de pólenes y alimentos derivados de plantas como fuentes alergénicas (Bardenas *et al.*, 2004b) sugieren que el recombinante Che a 2, la profilina del Quenopodio, es un marcador de la sensibilización a profilina.

La similitud entre las secuencias de aminoácidos de las profilinas y la similitud entre las secuencias de procalcinas pueden ayudar a explicar un resultado obtenido en la práctica: anticuerpos IgE de sueros de pacientes con una prueba de *Prick* positiva a varias



fuentes de polen responden solamente a un alérgeno mayor (Cyn d 1 o Ole e 1) y a profilina o polcalcina cuando se ensayan frente a alérgenos purificados. Estos panalérgenos son responsables de la respuesta positiva de los sueros a un amplio panel de extractos naturales en los cuales el correspondiente miembro de la familia comparte epítomos IgE con la molécula sensibilizante. Por lo tanto estos pacientes no estaban sensibilizados por todos estos pólenes pero permanecían sensibles a ellos. Cada profilina o polcalcina, por ejemplo Ole e 2 y Ole a 3, pueden servir como marcadores de polisensibilización.

Detección de sensibilización a alérgenos minoritarios

La mayoría de los alérgenos del polen de olivo están contenidos en los granos de polen a muy bajas concentraciones, frecuentemente menos del 0.2 % del total de las proteínas. Ole e 1 es una excepción y aunque su cantidad depende de la variedad de *Olea europaea*, representa mas del 20 % de las proteínas. Por lo tanto cuando el extracto completo es usado en ELISA o test de partículas recubiertas de alérgenos, la reactividad IgE a los alérgenos minoritarios puede no ser detectada. Los resultados obtenidos en experimentos de ELISA, comparando la respuesta de pacientes con síntomas de alergia al polen de olivo en la estación polínica con la respuesta a los extractos completos de polen y a algunos alérgenos purificados muestra como en algunos casos de respuesta al extracto completo y a Ole e 1 muy bajos o negativos, la medida de niveles de IgE específica a Ole e 6 o Ole 7 era alta o muy alta. Los ensayos *in vitro* con alérgenos purificados naturales o recombinantes por ELISA, test de partículas sensibilizadas con alérgeno, *immunoblotting* o tecnología de *microarray* pueden detectar y evaluar sensibilidad a alérgenos minoritarios. La producción de alérgenos recombinantes suministra moléculas que están libres de contaminantes alérgénicos de su fuente original.

El diagnóstico de sensibilización a alérgenos minoritarios es importante cuando estos son los únicos inductores de la alergia, como diagnostico de sensibilización a la fuente biológica completa. Es necesario en el caso de algunos alérgenos minoritarios que han sido reseñados ser muy prevalentes en poblaciones específicas con alta exposición al polen o estar asociados con algunas propiedades del perfil clínico de los pacientes. Para pacientes alérgicos al olivo la sensibilidad a Ole e 7 ha sido asociada con propensión a reacciones adversas (Serrano *et al.*, 2007) y la sensibilidad a Ole e 10 con severidad y



persistencia del asma (Quiralte *et al.*, 2005). Como Ole e 10 y el dominio C-terminal de Ole e 9 son polipéptidos homólogos, la correlación entre Ole e 10 y los síntomas de asma pueden estar extendidos a la sensibilidad al dominio C-terminal de Ole e 9. Por lo tanto el diagnóstico de hipersensibilidad a estos alérgenos de olivo puede ser crucial en la práctica clínica y puede ser realizado usando Ole e 10 y el dominio C-terminal de Ole e 9 al estar disponibles por tecnología recombinante. Por lo tanto el análisis *in vitro* con estas moléculas puede permitir el diagnóstico al ser extendido a alérgenos que son altamente prevalentes y estar a bajas concentraciones en el polen.

Inmunoterapia con alérgenos recombinantes

Las vacunas basadas en alérgenos recombinantes están libres de componentes no deseables que pueden inducir nuevas reactividades IgE o reacciones adversas y pueden ser preparadas de acuerdo a un específico perfil alergénico para cada paciente. Además, moléculas hipoalergénicas pueden ser diseñadas para exhibir actividad alergénica reducida y la habilidad para promover la síntesis de respuestas protectoras IgG. Alérgenos recombinantes salvajes de abedul y *Phleum*, así como derivados hipoalergénicos genéticamente modificados de Bet v 1, han sido incluidos en ensayos de inmunoterapia y han mostrado características de vacunación y clínica eficiente. (Valenta *et al.*, 2007). La mayoría de los alérgenos del polen de olivo están disponibles por tecnología recombinante y algunos derivados hipoalergénicos de Ole e 1 han sido producidos. Algunas de estas moléculas han sido probadas en un modelo de alergia en ratón con resultados prometedores (Marazuela *et al.*, 2006. Marazuela *et al.*, 2007). rOle e 1 ha sido incluido en un estudio de reactividad por *test-prick* en pacientes de ocho años (Quiralte *et al.*, 2000). Sin embargo la legislación vigente en España no permite el uso de alérgenos recombinantes para el tratamiento *in vivo*, aunque si pueden ser usados en el diagnóstico.

Restricción genética y prevalencia de la respuesta mediada por IgE

Para que una proteína sea alergénica debe exhibir dos propiedades: en primer lugar debe ser capaz de inducir una respuesta inmunológica mediada por IgE, lo cual implica una fase de sensibilización en donde existe la cooperación necesaria entre



células dendríticas, linfocitos TH₂ y linfocitos B; y en segundo lugar, que determine una respuesta clínica en el individuo que está sensibilizado a ella. Para los clínicos, los alérgenos deben ser herramientas que les ayuden a comprender la enfermedad alérgica y, de forma especial, el modo de enfermar los pacientes.

La demostración de una respuesta IgE frente a este grupo de proteínas alergénicas en cada uno de los pacientes con rinitis y asma inducidos por polen de olivo podría, por tanto, mejorar sustancialmente el diagnóstico de este tipo de alergia, y permitir la identificación, al menos parcial, de algunos de los factores específicos de influencia en la historia natural de los diferentes fenotipos clínicos relacionados con la polinosis por *O. europaea* (Quiralte *et al.*, 2007).

Sin duda alguna, el análisis de los factores de restricción en la respuesta mediada por IgE frente a los alérgenos del polen de olivo, van paralelos al proceso de caracterización de cada uno de ellos y de la disponibilidad de uso en los sujetos clínicamente sensibles a *O. europaea*. En este sentido, se ha demostrado una asociación positiva entre ciertos alelos HLA y la respuesta IgE frente a Ole e 1, Ole e 2 y Ole e 3 en dos poblaciones no relacionadas, concretamente con el haplotipo HLA-DRB1*0701-HLA-DQB1*0201 (Quiralte *et al.*, 2005. Cárdaña *et al.*, 2000).

En un estudio reciente, se realizó el tipaje genómico de los *loci* HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en un grupo de 156 pacientes con alergia a polen de olivo que mostraban IgE frente a 8 alérgenos de polen de olivo detectados por ELISA y por prueba cutánea (Quiralte *et al.*, 2005). El HLA-DR2(15) se asoció significativamente a la presencia de IgE-anti Ole e 10 en esta población de pacientes. Estos datos son especialmente relevantes si consideramos que uno de los fenotipos IgE analizados, la IgE anti-Ole e 10, se correlacionaba con asma de severidad grave en este grupo de pacientes (Quiralte *et al.*, 2005).

La relación entre los antígenos de clase II del sistema HLA y la respuesta de anticuerpos frente a los alérgenos específicos constituye uno de los campos más extensamente estudiados (Blumenthal, 2005). Han sido descritos factores genéticos y medioambientales asociados con la alergia al polen de olivo (Cardaba *et al.*, 2000. Cardaba *et al.*, 2002. Geller-Bernstein *et al.*, 2002). Sin embargo, la regulación ge-



nética de la respuesta alérgica es compleja, probablemente no solo debida al hecho de que algunos genes interactúen con un componente medioambiental, sino debida a su propia interacción.

Los genes que codifican IL-4 e IL-13, juegan un papel en la regulación de la IgE en las reacciones alérgicas. El cambio de isotipo de inmunoglobulina M a E en linfocitos B activados está influenciado por la activación de la vía de las citoquinas IL-4/IL-13. El grupo de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz (Llanes *et al.*, 2009) ha estudiado la posible implicación de los polimorfismos de genes que codifican interleucinas en la sensibilización al polen de oliva, encontrando como el polimorfismo IL-13 C-1112T era un factor protector, mientras el IL-13 R130Q lo era de riesgo. Llama la atención como los polimorfismo de IL-4RA pese a no mostrar relación con ningún fenotipo estudiado, la interacción entre IL4RA 150V/Q551R, estaba fuertemente asociada con el asma bronquial. IL13 e IL4RA pueden ser considerados marcadores del asma bronquial en la alergia al polen de olivo.

El conocimiento de la estructura primaria de los alérgenos, por ejemplo el Ole e 1, y su posterior clonaje y expresión en sistemas heterólogos, ha posibilitado la investigación de la respuesta proliferativa de células mononucleares frente a péptidos sintéticos de Ole e 1 en pacientes alérgicos a este alérgeno y con ello, establecer los epítomos inmunodominantes. Así, por ejemplo, por análisis de la respuesta proliferativa de linfocitos T, frente a un panel de péptidos sintéticos derivados de la molécula de Ole e 1, se han establecido dos regiones inmunodominantes, localizadas en el extremo carboxiterminal de la molécula (Cárdaba *et al.*, 1998). Además, mediante el uso de varios anticuerpos monoclonales específicos de Ole e 1, se han detectado cuatro epítomos adicionales para los linfocitos B (Gonzalez *et al.*, 2006).

Por otro lado, hay evidencias que sugieren que ciertos factores ambientales pueden tener un impacto en la prevalencia de IgE frente a determinados alérgenos. Algunos datos preliminares sugieren que la frecuencia de la respuesta IgE frente a alérgenos varía notablemente entre las zonas de alta exposición (zonas de monocultivo, como Jaén) y baja exposición (como por ejemplo, puede ser Madrid). Entre estos alérgenos destacan: Ole e 2, ole e 6, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10, que solo se muestran como alérgenos mayoritarios en zonas de alta exposición al polen (Florido *et al.*, 2000. Rodríguez *et al.*, 2001).



La respuesta IgE frente a polen de olivo es extremadamente compleja (Figura 7). Esta alergodiversidad se pone de manifiesto, de una parte, con la observación de diferentes frecuencias de sensibilización (o prevalencias IgE) entre los ocho alérgenos estudiados por nosotros y de otra, con la demostración de patrones diferenciados de cosensibilización a diferentes alérgenos de olivo en los distintos individuos (Quiralte *et al.*, 2007).

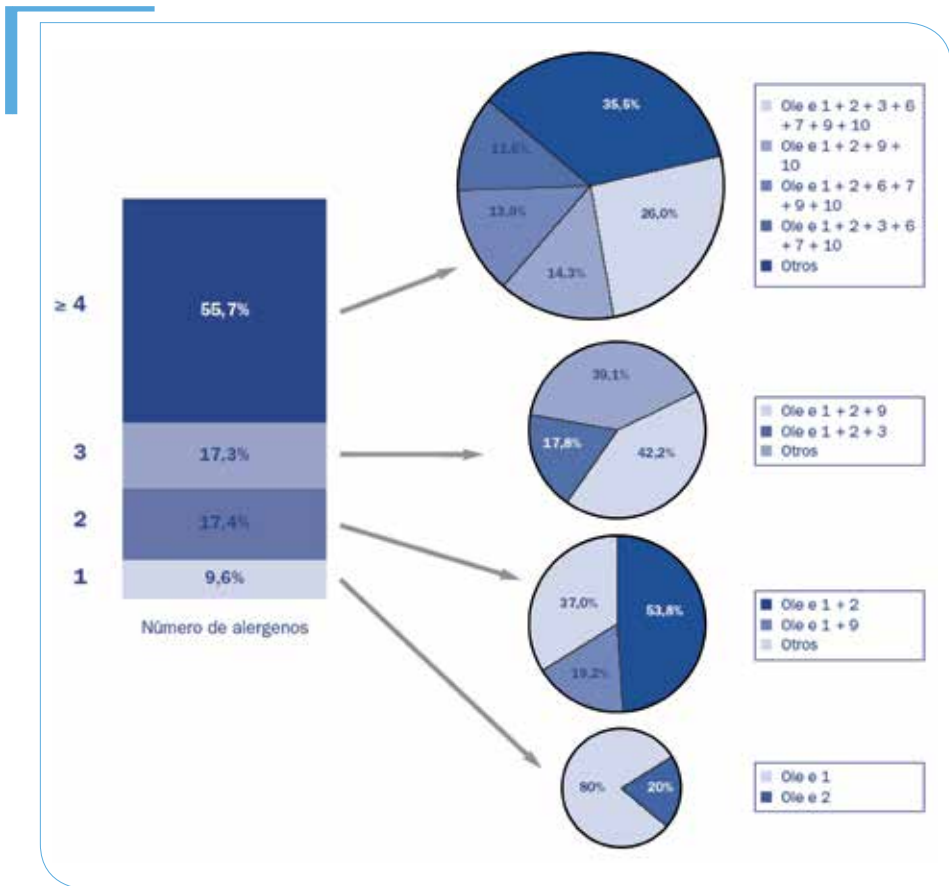


Figura 7. Distribución de la prevalencia de IgE (en porcentaje) de ocho alérgenos del polen de olivo (Ole e 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 y 10) por número de alérgenos/paciente y por patrones de sensibilización mas frecuentes.



De acuerdo con estos resultados, los alérgenos principales del polen de olivo en nuestra población fueron Ole e 1, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10 (Quiralte *et al.*, 2005. Quiralte *et al.*, 2007). Mientras que por otro lado, los patrones de reactividad frente a tres o más alérgenos se encontraron en aproximadamente las tres cuartas partes de los pacientes, con 45 patrones diferentes en un número relativamente reducido de 156 pacientes (Quiralte *et al.*, 2007).

Alérgenos del polen de olivo y fenotipos clínicos

Los alérgenos del polen de olivo pueden producir patrones específicos de respuesta mediada por IgE, bien cuando esta se evalúa cuantitativamente en términos de alérgenos mayoritarios *versus* minoritarios, o bien cuando se describen los *cluster* de sensibilización frente a cada uno de los alérgenos que condicionan sensibilización en un individuo determinado (Quiralte *et al.*, 2007).

Existen algunas evidencias que sugieren que ambos fenómenos de alergodiversidad podrían jugar un importante papel en el desarrollo de los diferentes itinerarios clínicos de los diversos síndromes relacionados con la polinosis. (Quiralte *et al.*, 2009)

La Profilina del polen de olivo y el Ole e 10 como marcadores del asma

En los últimos años, nuestro grupo ha analizado el papel de cada uno de los alérgenos en la patogenia de los diferentes síndromes respiratorios relacionados con la polinosis por *O. europaea*. En un reciente estudio demostramos que la presencia de IgE anti-Ole e 2 se asoció significativamente con el asma bronquial ($p=0.04$, OR 2.2, CI 1.9-5.1) y la reactividad frente a Ole e 10 mostraba una relación de mayor intensidad ($p=0.007$, OR 3.8, CI 1.3-6.1), mientras que esta relación no se detectó en los otros cuatro alérgenos ensayados en la misma muestra de pacientes: Ole e 1, Ole e 3, Ole e 6 y Ole e 7 (Quiralte *et al.*, 2005).

Por tanto, las sensibilizaciones frente a profilina de polen de olivo y frente a Ole e 10 se asocian significativamente con el asma bronquial. Nosotros hemos demostrado



que la sensibilización a ambos alérgenos en un mismo individuo, tiene un efecto sinérgico y supone hasta un riesgo cuatro veces mayor de desarrollar asma bronquial. Además, los pacientes con IgE anti-Ole e 10 presentan un mayor número de días de asma que el resto de los pacientes, con una mayor frecuencia de síntomas nocturnos, uno de los rasgos clínicos del asma moderada/grave. (Quiralte *et al.*, 2005).

En su conjunto, todos estos datos sugieren que la reactividad frente a algunos alérgenos del polen de olivo (como Ole e 2 y el Ole e 10) permitiría identificar un subgrupo de pacientes que se encuentran en riesgo de padecer una enfermedad respiratoria alérgica mas intensa.

Ole e 7 y el síndrome polen-frutas

La sensibilización a alimentos de origen vegetal puede ocurrir como consecuencia de una sensibilización primaria a algunos inhalantes como los pólenes. El síndrome polen-frutas puede presentar un amplio espectro clínico en los pacientes polínicos, que varía desde síntomas restringidos exclusivamente a la mucosa orofaríngea, como es el síndrome oral, hasta aquellos que desarrollan urticaria generalizada, angioedema o anafilaxia (Egger *et al.*, 2006).

En el año 2002, evaluamos los diferentes fenotipos IgE a alérgenos de olivo en pacientes que presentaban de forma concomitante una polinosis por *O. europaea* y alergia a frutas (Flórido *et al.*, 2002). En este estudio se evaluaron 140 pacientes con alergia al polen de olivo, de los que 39 presentaban una alergia a alimentos de origen vegetal. Diecisiete de ellos, fueron diagnosticados en base a una clínica inequívoca de anafilaxia, asociada a una prueba cutánea positiva al alimento implicado, y en los 22 restantes, el síndrome oral se demostró con una prueba de provocación oral doble ciego controlada frente a placebo, positiva con diferentes frutas: melocotón, pera, melón y kiwi.

La sensibilización a Ole e 7, una PTL, se asoció significativamente a las formas clínicas mas graves de alergia a alimentos. Sin embargo, los datos disponibles indican una limitada similitud con otras PTL alérgicas presentes en alimentos de origen vegetal



(como melocotón, manzana, fresa, albaricoque, avellana, y naranja) por lo que este hallazgo clínico no puede ser explicado por la existencia de una reactividad cruzada significativa entre ambas fuentes alergénicas (Rodríguez *et al.*, 2007).

Por otro lado, los pacientes con síndrome oral presentaron una frecuencia de IgE anti-profilina cercana al 90 %, mientras que los pacientes con anafilaxia a frutas mostraron una frecuencia menor en la reactividad frente a este alérgeno que la observada en el grupo control (Florida *et al.*, 2002) (Tabla 3).

TIPO DE ALERGIA A FRUTAS		
	SÍNDROME ORAL	ANAFILAXIA
Ole e 1	89,7	100
Ole e 2	89,7	61,1
Ole e 3	53,8	44,4
Ole e 6	43,6	72,2
Ole e 7	35,5	77,8
Ole e 8	7,7	4,2
Ole e 9	44,4	66,6
Ole e 10	51,2	55,6

Tabla 3. Distribución de la prevalencia IgE (en porcentaje) frente a ocho alérgenos de polen de olivo (Ole e 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) en 39 pacientes con síndrome polen-frutas.

Ole e 9 y Ole e 10, dos alérgenos, tres itinerarios clínicos de la polinosis

En el año 2006, se evaluó el uso *in vitro* de los dominios recombinantes NtD y CtD de Ole e 9 en 33 pacientes alérgicos al polen de olivo clasificándolos de acuerdo con sus perfiles de sensibilización (Palomares, 2006b). Un 94 % de los pacientes se mostraron reactivos a alguno de los dominios, un 79 % presentó una respuesta positiva a rNtD, un 67 % a rCtD y un 52 % a ambos dominios. Un 42 % de todos los pacientes estaban específicamente sensibilizados a un solo dominio, rNtD (27 %) o rCtD (15 %).



Si hasta ahora hemos intentado definir la alergodiversidad en el modelo de polen de olivo como una característica biológica propia, que afecta a cada uno de los fenotipos clínicos relacionados con la polinosis, el Ole e 9, sin duda, da a este hecho una nueva e inesperada dimensión. (Treviño *et al.*, 2008. Palomares *et al.*, 2006).

Hay evidencias que sugieren que las respuestas específicas frente a cada uno de los dominios de Ole e 9 pueden ser marcadores útiles de ciertos itinerarios clínicos de la enfermedad en, al menos, dos poblaciones diferenciadas de pacientes.

El primer grupo de ellas, identifica a aquellos pacientes alérgicos a polen de olivo que están en riesgo de desarrollar alergia a alimentos de origen vegetal, debido a la existencia de sensibilización frente a rNtD de Ole e 9, que es la parte de la molécula que presenta actividad 1,3-betaglucanasa, y que muestra reactividad cruzada *in vivo*, por ejemplo frente a tomate, plátano y látex (Palomares *et al.*, 2006).

La segunda subpoblación de pacientes es aquella que presenta una IgE anti-rCtD de Ole e 9. Debido a que este dominio presenta una importante homología estructural (hasta un 53 % de identidad) y una elevada reactividad cruzada con Ole e 10, la sensibilización a rCtD Ole e 9 puede permitir identificar, del mismo modo que lo hace Ole e 10, las formas clínicas más graves de enfermedad respiratoria (Quiralte *et al.*, 2005).

El descubrimiento del Ole e 10, en el año 2005, nos ha permitido definir una nueva familia de proteínas que presenta una elevada reactividad cruzada con otras especies vegetales. Ole e 10 podría estar involucrado, como alérgeno candidato, junto con el NtD Ole e 9, en el desarrollo del síndrome polen-látex-frutas (Barral *et al.*, 2005. Quiralte *et al.*, 2007).

Este nuevo itinerario clínico dentro de la polinosis por *O. europaea*, que puede conducir al desarrollo de alergia al látex, se debe a que el Ole e 10 muestra tanto epítomos B frente a proteínas presentes en otros pólenes de las familias: *Oleaceae*, *Graminaceae*, *Betulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cupressaceae* y *Parietaria spp*, como también exhibe reactividad cruzada con el látex y ciertos alimentos de origen vegetal: kiwi, tomate, patata y melocotón.



Además, el látex contiene alérgenos que muestran una homología estructural con otros presentes en el polen de olivo, como son: Hev b 8 (una profilina, como Ole e 2) y Hev b 10 (una Mn SOD, como Ole e 5) que podrían estar involucrados en el futuro en fenómenos de reactividad cruzada adicionales en el síndrome polen-látex-frutas.



Bibliografía

Alche JD, Castro AJ, Olmedilla A, et al. The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci* 1999; 112: 2501-2509

Arias de Saavedra JM. Alergia al polen de olivo. Discurso de ingreso en la Academia Iberoamericana de Farmacia. Baeza 1998. Publicaciones Caja Rural de Jaén. Dep. Legal J-581-98

Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, et al. Cloning and expresión of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 365-372

Barber D, Carpizo K, García- Rumbao MC, et al. Allergenic variability in *Olea* pollen. *Ann Allergy* 1990; 64: 43-46

Bardenas R, Villalba M, Pascual CV, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopod album* pollen: isolation, amino acid sequences and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 1192-1198

Bardenas R, Villalba M, Rodríguez R. Recombinant expression purification and cross reactivity of chenop profilin rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem*. 2004; 385: 731-737

Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and show intra and inter-specie cross-reactivity. *J Immunol* 2004; 172: 3644-3651

Barral P, Tejera ML, Treviño MA, Batanero E, Villalba M, Bruix M, Rodríguez R. Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen in *Pichia pastoris* yeast. Detection of partial oxidation of methionine by NMR. *Protein Exp Purif*. 2004; 37: 336-343

Barral P, Suarez C, Batanero E, Alonso C, Alche JD, Rodríguez-García MI, et al. An olive pollen protein with allergenic activity Ole e 10 defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem J*. 2005; 390: 77-84

Barral P, Batanero E, Villalba M, Rodríguez R. Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris* evidence of post-translational modifications. *Protein Exp Purif*. 2005; 44:147-154



Barral P, Serrano AG, Batanero E, Pérez-Gil J, Villalba M, Rodríguez R. A recombinant functional variant of the olive pollen allergen Ole e 10 expressed in baculovirus system. *J Biotechnol.* 2006; 121: 402-409

Batanero E, Villalba M, Rodríguez R. Glycosilation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of carbohydrate moiety. *Mol Immunol* 1994; 31: 31-37

Batanero E, Villalba M, Ledesma A, et al. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur. J. Biochem.* 1996; 241: 772-778

Batanero E, Ledesma A, Villalba M, Rodríguez R. Purification, amino acid séquence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett* 1997; 410: 293-296

Batanero E, Ledesma A, Garcia-Cao M, et al. Prevalence of olive pollen allergens and its relationship to airborne pollen counts and cross-sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: S93 (Abstract)

Blanca M, Boulton P, Brostoff J, González-Reguera I. Studies of the allergens of *Olea europaea* pollen. *Clin. Allergy* 1983; 13: 473-478

Blumenthal MN. The role of genetic in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 141-145

Boluda L, Alonso C, Fernandez-Caldas E. Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 210-216

Bousquet J, Cour P, Guerin B, Michel FB. Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin Allergy* 1984; 14: 249-258

Brito FF, Gimeno PM, Carmes J, Martin R, Fernandez-Caldas E, Lara P, López-Fidalgo J, Guerra F. *Olea europaea* pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2011; 106(2): 146-152

Butteroni C, Afferni C, Barletta B, Lacovacci P, Corinti S, Brunetto B, et al. Cloning and expression of the *Olea europaea* Ole e 5, the pollen Cu/Zn superoxide dismutase. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 9-17

Cárdaba B, Del Pozo V, Jurado A, Gallardo S, Cortegano J, Arrieta I, et al. Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 413-422



Cárdaba B, Cortegano J, Florido F, Arrieta I, Aceituno E, del Pozo V, Gallardo S, Rojo M, Palomino P, Lahoz C. Genetic restrictions in olive poller allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 292-298

Cárdaba B, Cortegano J, Florido F, Civantos E, del Pozo V, Gallardo S, Rojo M, Palomino P, Lahoz C. Update in the understanding of genetic predisposition to olive pollen sensitization. *Allergy* 2002; 57(suppl 71): 41-46

Casanovas M, Florido F, Saenz de San Pedro B, Gonzalez P, Martinez-Alzamora F, Marañón F, Fernandez-Caldas E. Sensibilization to *Olea europaea*: geographical differences and discrepancies. *Allergol et Immunopathol* 1997; 25: 159-166

Chapman MD. Allergen Nomenclature. In "Allergens and Allergen Immunotherapy" 3rd Edition. Editors, Richard F. Lockey, Dennis K. Leford. 2008; pp 47-58

D'Amato G, Liccardi, G. Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clinical and Experimental Allergy* 1994; 24: 210-219

Davies RR, Smith IP. Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clin Allergy* 1973; 3:263-267

De Cesare F, Pini C, Di Felice G, et al. Purification and fine characterization of a major allergen from *Olea europaea* pollen extract. *Allergy* 1993; 48: 248-254

Egger M, Mutschlechner S, Woppner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* 2006; 61: 461-476

Florido JF, González P, Arias de Saavedra JM, Quiralte J, Peralta V, Saenz de San Pedro B. High levels of olive pollen and clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 133-137

Florido JF, Quiralte J. Connotaciones etiopatogénicas del asma bronquial inducido por polen de olivo. En: Prieto L, ed. *Facetas Inéditas en Asma Bronquial*. Madrid Editores Médicos SA 2000: 289-304

Florido F, Quiralte J, Arias de Saavedra JM, Saenz de San Pedro B, Martín E. An allergen from *Olea europaea* pollen (Ole e 7) is associated with plant-derived food anaphylaxis. *Allergy* 2002; 57 (Suppl 71): 53-59

Geller-Berstein C, Lahoz C, Cárdaba B, Hassoun G, Iancovici-Kindo M, Kenett R, Waise Y. Is it "bad hygiene" to inhale pollen in early life?. *Allergy* 2002; (Suppl 71): 37-40



Gonzalez EM, Villalba M, Rodriguez R. Allergenic cross-reactivity of olive pollen. *Allergy* 2000; 55: 658-663

González EM, Villalba M, Quiralte J, Batanero F, Roncal F, Albar JP, et al. Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. *Mol Immunol* 2006; 43: 570-578

Huecas S, Villalba M, Gonzalez E, Martinez-Ruiz A, Rodríguez R. Production and detailed characterization of biological active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*. 1999; 261: 539-546

Huescas S, Villalba M, Rodriguez R. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a β -1,3-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence and tissue specificity. *J Biol Chem* 2001; 276: 27959-27966

Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergens-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 761-771

Lauzurica P, Gurbindo C, Maruri N, Galocha B, Diaz R, González J, García C, Lahoz C. Olive (*Olea europaea*) pollen allergens-I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol Immunol*. 1988;25:329-335

Lauzarica P, Maruri N, Galocha B, et al. Olive (*Olea europaea*) pollen allergens – II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol Immunol* 1988; 25: 337-344

Lave S, Datt Z. The necessity of cross-pollination for fruit set of Manzanillo olives. *J Hort Sci* 1978; 53: 261-266

Ledesma A, Rodriguez R, Villalba M. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy* 1998; 53: 520-526

Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem*. 1998; 258: 454-459

Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett* 2000; 466: 192-196

Ledesma A, Villalba M, Vivanco F, Rodriguez R. Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens. *Allergy* 2002; 57: 40-43



Ledesma A, Moral V, Villalba M, Salinas J, Rodríguez R. Ca²⁺-binding allergens from olive pollen exhibit biochemical and immunological activity when expressed in stable transgenic Arabidopsis. FEBS Journal. 2006; 273: 4425-4434

Liccardi G, D'Amato M, D'Amato G. 1996. Oleaceae pollinosis. A review. Int Arch Allergy Immunol 1996; 111: 210-217

Linhart B, Valenta R. Molecular design of allergy vaccines. Curr Opin Immunol. 2005; 17: 646-655

Llanes E, Quirarte J, López E, Sastre B, Charcátegui M, del Pozo V, Palomino P, Lahoz C, Cárdena B. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. Int Arch Allergy Immunol 2009; 148: 228-238

Lombardero M, Quirce S, Duffort O, et al. Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. J Allergy Clin Immunol 1992; 89: 884-894

López-Pascual E, Arias de Saavedra JM, Navarrete MA, Saenz de San Pedro B, Palacios L, Anguita JL, López-Urbano MJ, Florido F, Cardaba B, Rodríguez R, Lahoz C, Quirarte J. Alergia al polen de olivo: patrón de sensibilización y valor diagnóstico de 8 alérgenos de *Olea europaea*. XXXIV Reunión de la Sociedad Andaluza de Alergología. Mojácar. Junio de 2005.

Marazuela EG, Batanero E, Prado N, García MS, Palomares O, García H, Villalba M, Rodríguez R. Intranasal administration of a mutant of Ole e 1, the main olive pollen allergen suppressed antigen-specific T and B responses in a mouse model of allergy. 25th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna Austria 2006. Abstract 1668

Marazuela E, Rodríguez R, Barber D, Villalba M, Batanero E. Hypoallergenic mutants of Ole e 1, the major olive pollen allergen as candidates for allergy vaccines. Clin Exp Allergy. 2007; 37: 251-260

Martínez A, Asturias JA, Palacios R et al. Identification of a 36-kDa olive-pollen allergen by invitro and invivo studies. Allergy 2000; 54: 384-392

Moretini A, Pulsell A. L'Azione del vento nel trasporto del polline dell'olivo. Annali della Speri Agraria (N.W) Roma 1953

Palomares O, Villalba M, Quirarte J, Polo E, Rodríguez R. 1-3- β -glucanases as candidates in latex-pollen-vegetables food cross-reactivity. Clin Exp Allergy. 2005; 35: 345-351



Palomares O, Swoboda I, Villalba M, Balic N, Spitzauer S, Rodriguez R, et al. The major allergens of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to *Oleaceae*. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 110-118

Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Rodriguez R. Allergenic contribution of the IgE-reactive domains of the 1,3-beta-gluconase Ole e 9: diagnostic value in olive pollen allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 61-65

Palomares O, Fernandez Nieto M, Villalba M, Rodriguez R, Cuesta-Herranz J. Occupational allergy in researcher due to Ole e 9, an allergenic 1,3- β -glucanase from olive pollen. *Allergy* 2008; 63: 784-785

Quiralte J, González E, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Saénz de San Pedro B, Rodríguez R. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000; 122: 101-107

Quiralte J, Florido F, Arias de Saavedra JM, Gomez A, Saenz de San Pedro B, González E, Rodríguez R. Olive allergen-specific IgE responses in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Allergy* 2002; 57(Suppl 71): 47-52

Quiralte J, Llanes E, Barral P, Arias de Saavedra JM, Saenz de San Pedro B, Villalba M, et al. Ole e 2 and Ole e 10 new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy* 2005; 60: 360-365

Quiralte J, Palacios I, Rodriguez R, Cárdena B, Arias de Saavedra JM, Villalba M, et al. Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007; 17 Suppl 1: 24-30

Quiralte J. Alérgenos restricción genética y asma: el modelo del polen de olivo. En: *Las bases alérgicas del asma*. Quirce S, Quiralte J. Ed. mra. Barcelona 2009: 79-88

Rodriguez R, Villalba M, Monsalve RI, et al. Perfiles de reconocimiento alérgico del polen de olivo. Implicación en la diagnosis e inmunoterapia. *Rev Acad Cienc Exactas Fis Natural (España)* 1998; 92: 253-528

Rodriguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Immunol* 2001; 125: 185-195

Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, González EM, Monsalve RI, Huecas S, Tejera ML, Ledesma A. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002; 57(Suppl 71): 6-16



Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca et al. Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17 (Suppl 1): 4-10

Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Salamanca G. Emerging pollen allergens. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61: 1-7

Rubio N, Brieva A, Alcázar B. Purification of allergens by high-performance liquid chromatography. IV Purification of the allergens of olive pollen (*Olea europaea*). *J Chromatogr* 1987; 403: 312-318

Salamanca G, Rodríguez R, Quiralte J, Moreno C, Pascual C, Barber D, Villalba M. Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree *FEBS Journal* 2010; 277: 2729-2739

Serrano Delgado P. Sensibilización a alérgenos minoritarios de *Olea europaea* como causa de reacciones sistémicas por inmunoterapia alérgeno específica (doctoral thesis). Córdoba (Spain). University of Córdoba. 2007

Subiza FJ. Recuento de pólenes. En: Pelaez A, Dávila I, eds. *Tratado de Alergología*. Madrid. Ergon 2007, p 415-24

Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Identification, isolation and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 797-802

Treviño MA, García-Mayoral MF, Barral P, Villalba M, Santoro J, Rico M, et al. NMR solution structure of Ole e 6 a major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem* 2004; 279: 39035-39041

Treviño MA, Palomares O, Castrillo J, Villalba M, Rodríguez R, Rico M, et al. Solution structure of the C-terminal domain of Ole e 9, a major allergen of olive pollen. *Protein Science* 2008; 17: 371-376

Twel D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol General Genet* 1989; 217: 240-245

Valenta R, Duchene M, Erner C, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant panallergens. *J Exp Med* 1992; 175: 377-385

Valenta R, Lidholm J, Neiderberger V, Hayek B, Fraft D, Gröndlund H. The recombinant allergen-based concept of component resolved diagnostics and immunotherapy (CDR and CRIT). *Clin Exp Allergy*. 1999; 29: 896-904



Valenta R, Kraft D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 718-727

Valenta R, Neiderberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J allergy Clin Immunol*. 2007; 119: 826-830

Vela C, Platas C, Gurbindo C, et al. Fractionation and biological characterization of *Olea europaea* pollen extract. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol* 1982; 68: 289-294

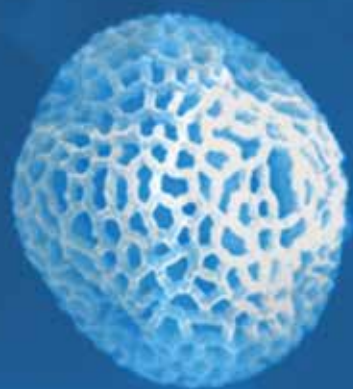
Villalba M, López-Otín C, Martín-Orozco E, et al. Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 523-528

Villalba M, Batanero E, López-Otín C, et al. The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem* 1993; 216: 863-869

Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem*. 1994; 269: 15217-15222

Waisel Y, Geller-Bernstein C, Keynan N, Arad G. Antigenicity of the pollen proteins of various cultivars of *Olea europaea*. *Allergy* 1996; 51: 816-825

Wheeler AW, Hickman BE, Fox B. Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen. *Mol Immunol* 1990; 27: 631-636



INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA