

Resumen

El polen de olivo se libera en altas cantidades al final de la estación primaveral y es una de las principales causas de la alergia tipo I en áreas donde el olivo se cultiva de forma extensiva. La caracterización de los alérgenos que provocan esta alergia es de gran utilidad para la estandarización de los extractos utilizados en inmunoterapia. La variabilidad cualitativa y cuantitativa de diversos alérgenos, debido a la presencia de diferentes isoformas y proporciones dependiendo del cultivar, ha dificultado la estandarización del contenido de los extractos. Por otra parte, los alérgenos son proteínas que deben jugar un papel importante en la biología del polen, influenciando por tanto, la reproducción sexual y la fructificación del olivo, siendo este proceso de considerable importancia agronómica. Dada la cantidad limitante de polen de olivo, así como la escasa disponibilidad de muestras séricas de pacientes con polinosis, es necesaria la optimización de protocolos para la inmunodetección de alérgenos del polen y comprobación de la reactividad de las inmunoglobulinas E (IgEs) frente a éstos. Por estos motivos, se ha diseñado un sistema multiplex para la inmunodetección de diversas proteínas independientemente del origen de la especie del anticuerpo a ensayar. Este sistema se ha aplicado a la detección y cuantificación simultánea de cuatro alérgenos en experimentos de inmunotransferencia en un gran número de variedades de olivo. Ello ha permitido la clasificación de los cultivares en 14 grupos según su contenido en estos alérgenos, en orden a simplificar los test de reactividad de IgEs y la elección de inmunoterapia específica. Además se ha ensayado este sistema para la localización espacial de los alérgenos en el grano de polen mediante microscopía láser confocal y electrónica de transmisión, mostrando evidencias de la función de estos alérgenos. Los resultados de los ensayos abarcan una aproximación de la influencia de parámetros meteorológicos y fenológicos del olivo en los niveles de estos alérgenos en su polen. Además se ha estudiado cómo estos alérgenos podrían influir en variables de importancia agronómica.

Summary

Olive tree pollen is liberated in high amounts at the end of spring season. It is one of the main causes of type I allergy in areas where olive tree is under extensive cultivation. The characterization of allergens that provoke this allergy is an important tool for standardization of extracts used in immunotherapy. The qualitative and quantitative variability of allergens, due to the presence of different isoforms depending of olive cultivars, has difficulted the standardization of allergen content in extracts.

On the other hand, allergens are proteins that must play an important role in the pollen biology, therefore influencing the sexual reproduction and the fructification of the olive tree, being this process of considerable agronomic importance. In consideration of the limitant amounts of olive tree pollen and the slight available of serum samples from patients suffering polinosis, protocols are necessary to optimization immunodetection of pollen allergens and to test the reactivity of the E immunoglobulins (IgEs). For these reasons, a multiplex system has been designed, allowing the immunodetection of several proteins independently of the animal species origin from the antibody to be tested. This system has been applied to detection and simultaneous quantification of four olive pollen allergens in experiments by western blotting, using an elevated number of olive cultivars. It has allowed the classification of cultivars in 14 groups according to its content in these allergens, in order to simplify the IgEs reactivity test and the selection of specific immunotherapy. Also, this system has been essayed for the spatial location of the pollen grain allergens by confocal laser microscopy and transmission electron microscopy, showing evidences of the role of these allergens. The essays results include an approach of the influence of metecological parameters and phenological parameters of the olive tree over allergen levels from its pollen. Also, has been studied how allergens might influence variables with agronomic importance.



Diseño y aplicaciones de un sistema multiplex para la detección y caracterización de proteínas alergénicas en el polen del olivo (*Olea europaea* L.).



Tesis Doctoral

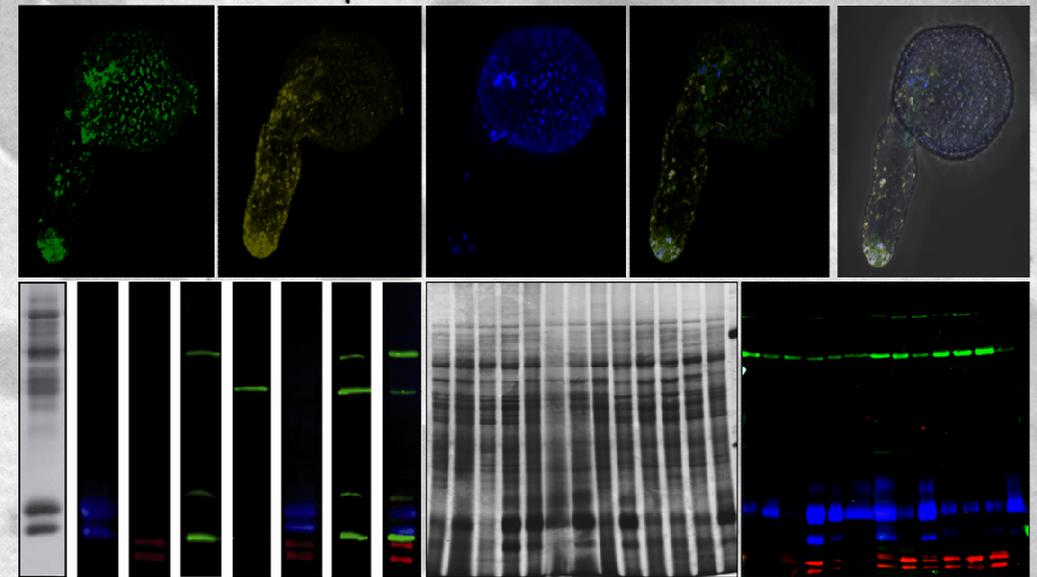


CSIC



TESIS DOCTORAL

Diseño y aplicaciones de un sistema multiplex para la detección y caracterización de proteínas alergénicas en el polen del olivo (*Olea europaea* L.).



Sonia Morales Santana
Granada, 2012

Universidad de Granada



Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas



Diseño y aplicaciones de un sistema multiplex para la detección y
caracterización de proteínas alergénicas en el polen de olivo
(*Olea europaea* L.).

Tesis doctoral

Sonia Morales Santana

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sonia Morales Santana
D.L.: GR 2179-2012
ISBN: 978-84-9028-066-9

Diseño y aplicaciones de un sistema multiplex para la detección y
caracterización de proteínas alergénicas en el polen de olivo
(*Olea europaea* L.).

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas
Dña. Sonia Morales Santana para optar al grado de Doctora

Fdo.: Sonia Morales Santana

Vº Bº

El director de la tesis doctoral

Fdo.: Dr. Juan de Dios Alché Ramírez
Investigador Científico del CSIC

Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), en el grupo de investigación BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE PLANTAS (grupo PAIDI BIO-283) del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. El trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación siguientes financiados por fondos FEDER: MCINN BFU 2004-00601/BFI, BFU2008-00629, y JA (Proyecto de Excelencia) P2010-AGR6274.

*Esta tesis doctoral está dedicada
a mi madre,
Evangelina,
por enseñarme a leer.*

Agradecimientos

La finalización de esta tesis ha supuesto una gran satisfacción personal por lo aprendido, y la estimulación por todo aquello que me resta explorar.

Mi agradecimiento a la Dra. Maribel Rodríguez, que hizo posible el contacto con mi director de tesis, el Dr. Juan de Dios Alché, a quien debo la consecución del doctorado en el área de conocimiento que siempre deseé. Su afán perfeccionista me enseñó que todo se puede hacer mejor.

Me considero afortunada por haber contado con la amistad de todos los componentes del grupo de biología reproductiva de plantas y de los compañeros y compañeras de la Estación Experimental del Zaidín durante todos estos años. A todos ellos quiero expresar mi más sincero agradecimiento. En especial, quisiera compensar con estas letras a Dori Zafra y Rosa Luque, por hacerme disfrutar del tiempo compartido, sobre todo, durante los meses de recogida de muestras de polen en los campos de olivos. A Germán por estar siempre dispuesto a mejorar el sistema de recolección de polen y el mantenimiento de estacas de olivo. Al Dr. Antonio Jesús Castro, por padecer estoicamente mis deliberaciones científicas, y al Dr. José Carlos Jiménez y a Juan David Rejón por las no tan científicas. También quisiera dedicar un saludo afectuoso a un compañero que está presente en mi recuerdo, y que me hizo disfrutar de la primera tesis presenciada en la Estación Experimental del Zaidín, el Dr. Abdel Mounim Khalifa.

A aquellas personas que, de alguna manera, han seguido mi trabajo y mi formación científica hasta el día de lectura de esta tesis. Es el caso de los componentes del grupo del Dr. Javier Martín, del Dr. Mario Delgado, del Dr. Antonio Estévez y del Dr. José Antonio García. En especial, a Gisela y Elena por su apoyo incondicional. A María, Patri y Juandi por su esmero y sus apreciaciones siempre bienvenidas.

Las numerosas dificultades durante el desarrollo de esta tesis fueron superadas gracias a los ánimos brindados por mis allegados, que me han alentado en los momentos de incertidumbre. A todos ellos, amigos de dentro y fuera de la ciencia, deseo expresar mi gratitud.

A toda mi familia le dedico mi más sincero agradecimiento, con el compromiso de devolverles la atención que esta tesis les ha robado. A mi madre, Evangelina, por inculcarme su tesón y por reconfortarme en los momentos de aflicción. A mi padre, José María, por enseñarme que la curiosidad se cura explorando, y por mostrarme el valor de la responsabilidad y el esfuerzo. A mi hermano, José Luis, a Meli y a mis sobrinas, Noelia y Eva, por animarme y recibirme siempre al calor del fuego lento. A mi siempre amiga Keni.

A Rober. Por privarse de mi tiempo, por su infinita paciencia y entereza durante estos años. Su dedicación me ha impulsado a que esta tesis pueda culminar.

RESUMEN

El polen de olivo se libera en altas cantidades al final de la estación primaveral y es una de las principales causas de la alergia tipo I en áreas mediterráneas y en otras zonas de climas templados donde el olivo se cultiva de forma extensiva. La alergia al polen de olivo tiene un impacto negativo sobre la calidad de vida de los pacientes y su prevención y tratamiento se asocian a altos costes económicos.

La caracterización de los alérgenos que provocan esta alergia es de gran utilidad para la estandarización de los extractos utilizados en la práctica clínica de la inmunoterapia. La variabilidad cualitativa y cuantitativa de diversos alérgenos, debido a la presencia de diferentes isoformas y proporciones dependiendo del cultivar, ha dificultado la estandarización del contenido de los extractos. Esta variabilidad intercultivar se encuentra escasamente representada en los extractos comerciales, resultando en diferencias importantes entre estas preparaciones y la exposición real a un alérgeno en el entorno del paciente.

Los extractos dirigidos a inmunoterapia presentan habitualmente una amplia fluctuación en su contenido proteico total, en su contenido en alérgenos individuales y en la potencia alérgica. Además, no suele disponerse de información del origen del cultivar del cual procede el extracto.

Por otra parte, los alérgenos son proteínas que deben jugar un papel importante en la biología del polen, influenciando por tanto, la reproducción sexual y la fructificación del olivo, siendo este proceso de considerable importancia agronómica.

Dada la cantidad limitante de polen de olivo, por su producción exclusiva en primavera, así como la escasa disponibilidad de muestras séricas de pacientes con polinosis de olivo, es necesaria la optimización de protocolos para la inmunodetección de alérgenos del polen y comprobación de la reactividad de las inmunoglobulinas E (IgEs) frente a éstos. Su aplicación facilitaría la estandarización de extractos para el diagnóstico y terapia de pacientes alérgicos a polen de olivo, y la detección de IgEs específicas para un alérgeno determinado, con el objetivo de conseguir terapias más eficaces. Además, el estudio de la función de estos alérgenos en el grano de polen podría orientarse a la mejora de la producción del olivar y a la

selección de variedades destinadas a cultivo intensivo con bajo potencial alergénico.

Por estos motivos, se ha diseñado un sistema multiplex para la inmunodetección de diversas proteínas independientemente del origen de la especie del anticuerpo a ensayar. Este sistema se ha aplicado a la detección y cuantificación simultánea de los alérgenos mayoritarios Ole e 1 y Ole e 9, y para los minoritarios Ole e 2 y Ole e 5 en experimentos de inmunotransferencia en un gran número de variedades de olivo. Ello ha permitido la clasificación de los cultivares en 14 grupos según su contenido en estos alérgenos, en orden a simplificar los test de reactividad de IgEs y la elección de inmunoterapia específica. Además se ha ensayado este sistema para la localización espacial de los alérgenos en el grano de polen mediante microscopía láser confocal y electrónica de transmisión, mostrando evidencias de la función de estos alérgenos.

Los resultados de los ensayos abarcan una aproximación de la influencia de parámetros meteorológicos y fenológicos del olivo sobre los niveles de estos alérgenos en el polen de olivo. Además se ha estudiado cómo estos mismos alérgenos podrían influir sobre variables de importancia agronómica, tales como la capacidad germinativa del grano de polen, la variación en sus niveles durante la germinación de éste y los fenómenos de autocompatibilidad.

SUMMARY

Olive tree pollen is liberated in high amounts at the end of spring season. It is one of the main causes of type I allergy in mediterranean areas and in other regions of moderate climates where olive tree is under extensive cultivation. Allergy to olive tree pollen has a negative impact on the life quality of patients and its prevention and treatment is associated to elevated economic costs.

The characterization of allergens that provoke this allergy is an important tool for extract standardization used in clinic practice of immunotherapy. The qualitative and quantitative variability of allergens, due to the presence of different isoforms depending of olive cultivars, has diffculted the standardization of allergen content in extracts. This inter-cultivar variability is rarely represented in commercial extracts, resulting in important differences between these preparations and the real exhibition to allergens at the patient environment.

Extracts administred by immunotherapy usually present a wide fluctuation in total protein amounts, allergen content and allergenic potency. Also, it is frequent a lack of information from cultivar origin which the extract has been processed.

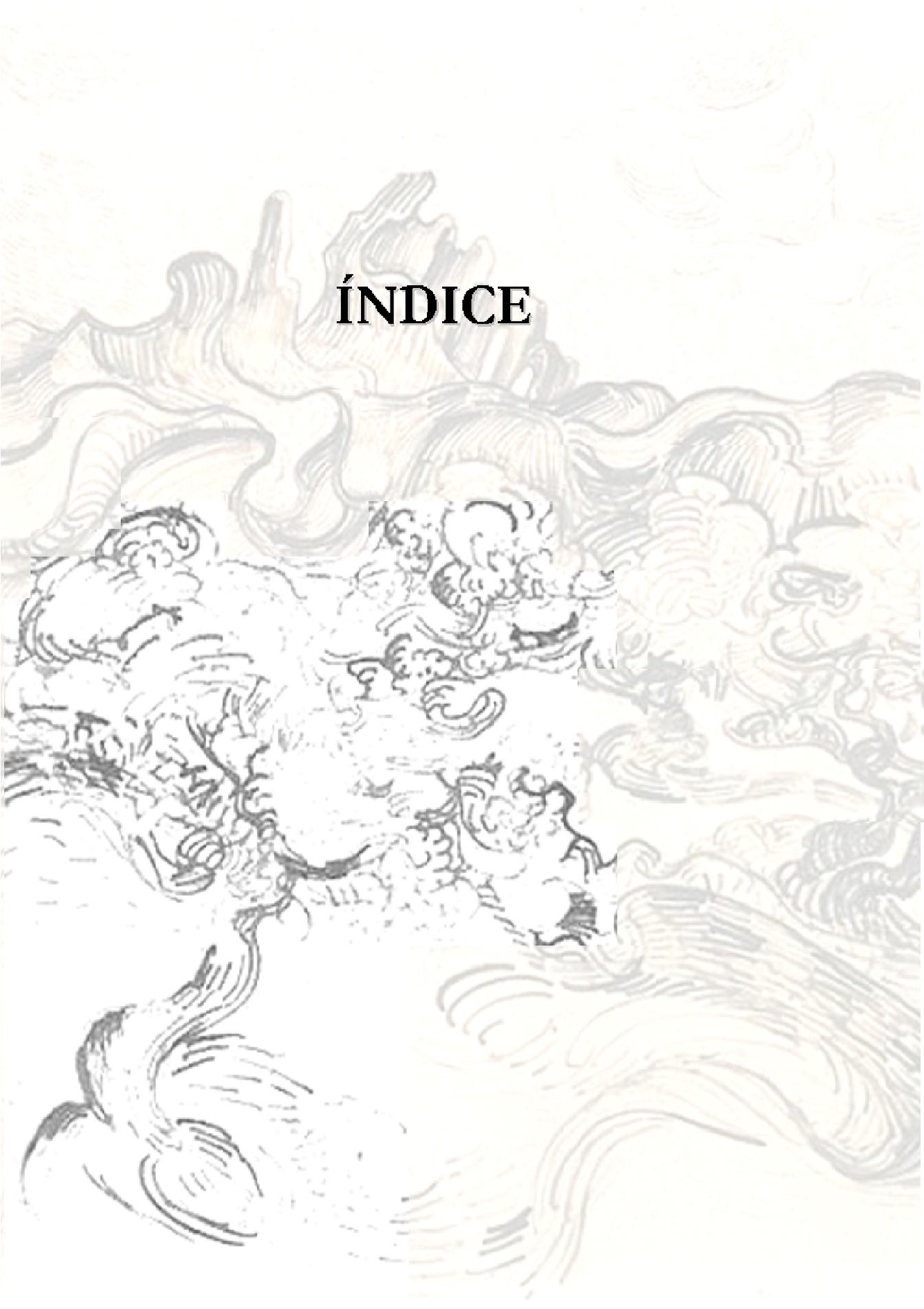
On the other hand, allergens are proteins that must play an important role in the pollen biology, therefore influencing the sexual reproduction and the fructification of the olive tree, being this process of considerable agronomic importance.

In consideration of the limitant amounts of olive tree pollen, by its exclusive production in spring season, and the slight available of serum samples from patients with polinosis of olive tree, protocols are necessary to optimization immunodetection of pollen allergens and to test the reactivity of the E immunoglobulins (IgEs). Its application would facilitate the extract standardization to diagnosis and therapy of allergy patients to olive pollen, and detection of specific IgEs for each allergen, to obtain more effective therapies. Also, the study of the allergen role in the pollen grain might be directed to the progress of the olive fruit production and to selection of varieties destined to intensive culture with low allergenic potency.

For these reasons, a multiplex system has been designed, allowing the immunodetection of several proteins independently from the animal

species origin of the antibody to be tested. This system has been applied to detection and simultaneous quantification of the major allergens Ole e 1 and Ole e 9, and for the minor allergens Ole e 2 and Ole e 5 in experiments of western blotting, using an elevated number of olive cultivars. It has allowed the classification of cultivars in 14 groups according to its content in these allergens, in order to simplify the IgEs reactivity test and the selection of specific immunotherapy. Also, this system has been essayed for the spatial location of the pollen grain allergens by confocal laser microscopy and transmission electron microscopy, showing evidences of the role of these allergens. The essays results include an approach of the influence of meteorological parameters and phenological parameters of the olive tree over allergen levels from olive pollen. Also, it has been studied how the same allergens might influence variables with agronomic importance, such as the germinative capacity of the pollen grain, the change in its levels during the germination and the autocompatibility phenomena.

ÍNDICE



Van Gogh. *Olive trees in a mountain landscape*

Saint-Rémy: June-late in month, 1889

The Museum of Modern Art

New York, New York, United States of America

Agradecimientos	I
Resumen	III
Summary	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La reacción alérgica	
1.1.1 Etapa de sensibilización	1
1.1.2 Etapa de provocación	2
1.2 Alérgenos	3
1.2.1 Características moleculares	3
1.2.2 Fuentes biológicas y patrón alergénico	4
1.3 Influencia de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de alergia	6
1.3.1 Polimorfismo alergénico	6
1.3.2 Individuos atópicos	7
1.3.3 Factores de riesgo ambientales	8
1.4 Diagnóstico y terapia de la alergia tipo I. Estrategias para su mejora	10
1.4.1 Diagnóstico	10
1.4.2 Tratamiento	10
1.4.3 Estrategias para la mejora de la diagnosis e inmunoterapia	11
Estandarización	11
Purificación de alérgenos	12
Estrategias biotecnológicas	13
1.5 Polinosis	13
1.5.1 Polinosis en el área mediterránea	14
1.6 El olivo como fuente de alérgenos polínicos	15
1.6.1 Origen y propagación del cultivo	15
1.6.2 Aspectos botánicos	16
1.6.3 Desarrollo del grano de polen	17
1.6.4 Alergia al polen de olivo	20
1.6.5 Alérgenos del polen de olivo	20
1.6.6 Polimorfismo en los alérgenos del polen de olivo	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Materiales	30

3.1.1	Polen maduro	30
3.1.2	Extractos proteicos liofilizados de polen de olivo	30
3.1.3	Sueros de pacientes alérgicos a olivo	32
3.2	Métodos	33
3.2.1	Análisis bioquímicos	33
	Germinación <i>in vitro</i> del polen de olivo	33
	Extracción de proteínas totales de polen de olivo	33
	Precipitación de proteínas	34
	Cuantificación proteica	34
	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	35
	Tinción de geles SDS-PAGE con plata	36
	Tinción de geles SDS-PAGE con azul Coomassie	37
	Transferencia electroforética de geles a membranas	37
	Inmunodetección estándar de geles a membrana	38
	Inmunodetección multiplex sobre membrana con anticuerpos de la misma especie	40
	Revelado de actividad peroxidasa	43
	Documentación de geles y membranas	43
3.2.2	Métodos de análisis celular	44
	Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)	44
	Inmunolocalización convencional de proteínas a TEM	45
	Inmunolocalización múltiple con anticuerpos de la misma especie a TEM	46
	Procesamiento convencional para inmunolocalización a microscopía confocal (CLSM)	47
	Inmunolocalización convencional para CLSM	48
	Procesamiento de alta permeabilización para inmunolocalización a CLSM	49
	Inmunolocalización multiplex para CLSM	50
3.2.3	Métodos de análisis estadístico	51
4.	RESULTADOS	53
4.1	Desarrollo y optimización de un sistema analítico y cuantitativo de detección multiplex de alérgenos del polen de olivo.	53

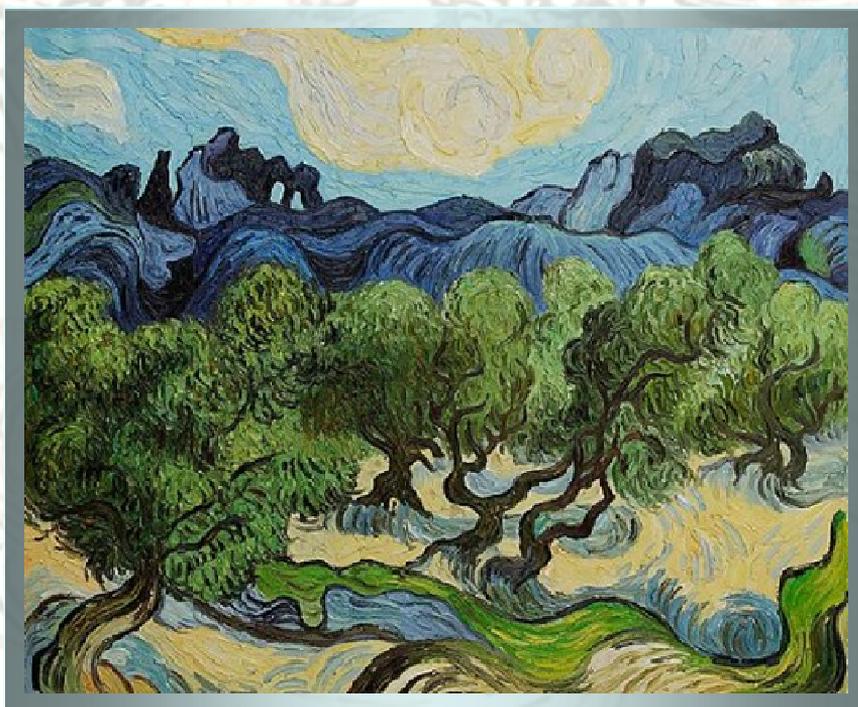
4.2 Utilización del sistema desarrollado para caracterizar el polimorfismo alérgico a lo largo de una amplia representación del germoplasma de esta especie.	57
4.2.1 Correlación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9	63
4.2.2 Asociación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 con la capacidad germinativa del polen de olivo.	65
4.2.3 Asociación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 con el índice de compatibilidad del polen de olivo.	68
4.2.4 Asociación entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 del polen de olivo con su época de floración.	73
4.3 Expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en siete cultivares durante varios años e implicación de factores ambientales.	77
4.3.1 Expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en siete cultivares durante varios años.	77
4.3.2 Implicación de factores ambientales en la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	79
4.4 Caracterización de la expresión y la reactividad diferencial de las proteínas Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el polen de <i>Olea europaea</i> (variedad de referencia Picual) durante diversas etapas de su germinación <i>in vitro</i>, así como la cinética de liberación de proteínas alérgicas al medio de cultivo.	86
4.4.1 Análisis de la expresión de Ole e 1 durante la germinación <i>in vitro</i> de polen de olivo.	86
4.4.2 Análisis de la expresión de Ole e 2 durante la germinación <i>in vitro</i> de polen de olivo.	89

4.4.3	Análisis de la expresión de Ole e 5 y otras superóxido dismutasas (SODs) durante la germinación <i>in vitro</i> de polen de olivo.	90
4.4.4	Análisis de la expresión de Ole e 9 durante la germinación <i>in vitro</i> de polen de olivo.	91
4.5 Aplicaciones clínicas prácticas.		
	Determinación de la antigenicidad y alergenicidad de distintos extractos comerciales procedentes de distintos cultivares. Agrupación del germoplasma analizado, de acuerdo a los niveles de alérgenos en cada una de las variedades.	94
4.5.1	Detección multiplex y cuantificación de alérgenos procedentes de extractos comerciales de seis cultivares, usados para diagnóstico e inmunoterapia.	94
4.5.2	Reactividad a IgE procedente de un conjunto de sueros de pacientes hipersensibles a polen de olivo frente a proteínas de polen de olivo.	96
4.5.3	Agrupación de las variedades estudiadas en el capítulo 4.2 según su contenido en los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	98
4.6 Aplicación del sistema multiplex a la localización simultánea de alérgenos a nivel celular, mediante microscopía confocal sobre el grano de polen de olivo de la variedad Picual durante su germinación, y adaptación del método para microscopía electrónica.		
4.6.1	Inmunolocalización simple sobre polen de olivo del alérgeno Ole e 1 durante la germinación del polen.	101
4.6.2	Inmunolocalización sobre polen de olivo de la variedad Picual del alérgeno Ole e 2 (profilina) y su ligando, actina, durante la germinación <i>in vitro</i> del polen.	102
4.6.3	Inmunolocalización multiplex usando anticuerpos contra Ole e 1 (anti-ratón), Ole e	

2 y Ole e 9 (anti-conejo, ambos procedentes de la misma especie).	105
4.6.4 Inmunolocalización simple de profilinas y actina a TEM en granos de polen.	108
4.6.5 Inmunolocalización simple de Ole e 9 a TEM en granos de polen.	110
4.6.6 Inmunolocalización múltiple a TEM usando anticuerpos contra actina (anti-ratón), Ole e 2 y Ole e 9 (anti-conejo, ambos procedentes de la misma especie) en granos de polen maduro.	111
5. DISCUSIÓN	113
5.1 El método multiplex es una herramienta versátil en la detección de múltiples antígenos en polen de olivo, independientemente del origen de la especie de los anticuerpos.	113
5.2 Diversidad cuantitativa y cualitativa de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en los cultivares de olivo e implicaciones en la biología reproductiva del olivar.	120
5.3 Las temperaturas, precipitaciones y humedad relativa correlacionan con el contenido alergénico de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen de olivo de siete variedades a lo largo de diversos años.	127
5.4 Dinámica cíclica de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y liberación al medio de cultivo durante la germinación <i>in vitro</i> del grano de polen de olivo.	132
5.5 Antigenicidad y alergenicidad diferencial de distintos extractos comerciales procedentes de distintos cultivares y agrupación de 57 cultivares de acuerdo o a los niveles de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	140

5.6 Localización y aproximación a la función de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 9 y de actina, ligando de Ole e 2, en el grano de polen de olivo.	141
6. CONCLUSIONES	147
7. BIBLIOGRAFÍA	150
8. ANEXOS	166
8.1 Listado de figuras	166
8.2 Listado de tablas	169
8.3 Abreviaturas	171
8.4 Publicaciones y comunicaciones a congresos	173

INTRODUCCIÓN



Van Gogh. *Olive trees with the Alpilles in the Background*
Saint-Rémy: June, 1889
The Museum of Modern Art
New York, New York, United States of America

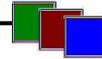


1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA REACCIÓN ALÉRGICA

Los procesos alérgicos están experimentando un aumento de su incidencia clínica en la población mundial, afectando al 25% de los habitantes en los países desarrollados (Dahl *et al.* 2004). La respuesta alérgica ha sido definida como una respuesta excesiva y alterada del sistema inmune frente a determinados antígenos, por lo general inoocuos, llamados alérgenos (Kay 1997). Según el patrón clínico de la enfermedad, existen cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad, denominadas tipo I - tipo IV. La alergia atópica es una reacción de hipersensibilidad inmediata de tipo I, mediada por una producción masiva de anticuerpos IgE frente a ciertos alérgenos y depende de la interacción entre el antígeno y los anticuerpos IgE unidos a mastocitos. La causa de la reacción alérgica es la liberación de histaminas y otros mediadores químicos y los síntomas asociados ocurren inmediatamente. Las bases moleculares y celulares de estos procesos no se conocen con exactitud, aunque se pueden diferenciar dos etapas en el desarrollo de la hipersensibilidad: sensibilización y provocación (Figura 1).

1.1.1 Etapa de sensibilización: Una reacción alérgica está precedida por una fase de sensibilización, en la cual se producen IgE específicas frente a una primera exposición al alérgeno. Las IgE, producidas por las células plasmáticas, se unen a la superficie de mastocitos y basófilos. Cuando se produce la entrada del alérgeno ingerido, inyectado o inhalado, éste es captado por las células presentadoras de antígeno (APC; células dendríticas, macrófagos o monocitos). Las APC procesan las moléculas alérgicas, generando fragmentos peptídicos asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Estos fragmentos contienen los determinantes antigénicos que serán expuestos en la superficie celular de las APC, en el seno de una molécula del MHC-II. Las células T colaboradoras nativas reconocen los determinantes antigénicos de dichos fragmentos peptídicos expuestos en la superficie de las APC, induciendo su diferenciación a células T colaboradoras de tipo 2 (Th2), las cuales secretan interleuquinas 4 y 13 entre otros mediadores químicos. Dichas interleuquinas actúan sobre las células B, promoviendo su activación y diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE. Las IgE producidas se enlazan a receptores Fc, presentes en la superficie de mastocitos y basófilos que se encuentran



en una alta concentración en los individuos atópicos. De esta forma, habrá tanto mastocitos en los tejidos, como basófilos circulantes listos para reaccionar en el próximo contacto con el alérgeno.

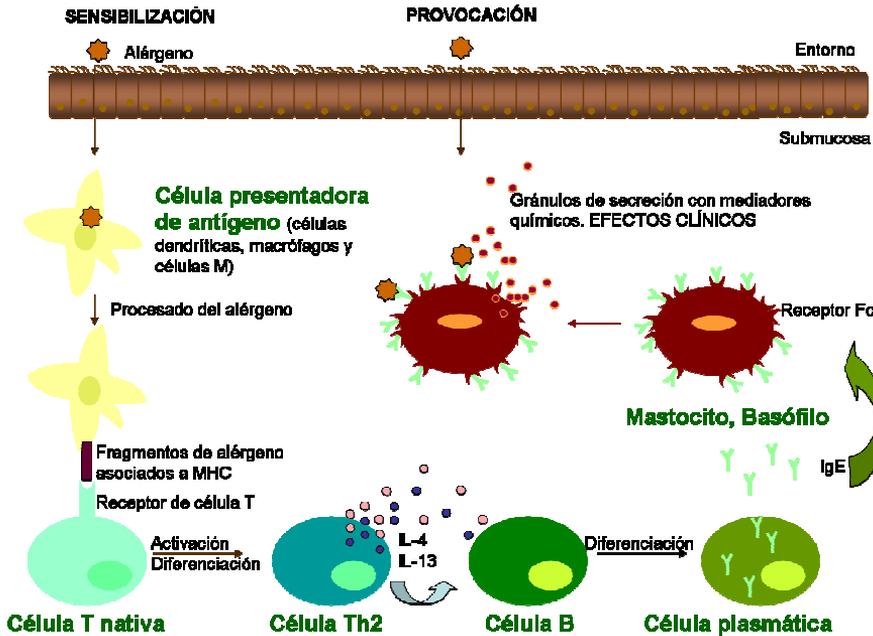


Figura 1. Representación de la secuencia de acontecimientos de la respuesta inmediata dependiente de linfocitos T en la alergia tipo I. Modificado de Huecas (2001).

1.1.2 Etapa de provocación: En el momento de un nuevo contacto con el alérgeno (respuesta alérgica temprana o inmediata), éste se enlaza a la IgE específica de la superficie de mastocitos y basófilos, desencadenando la desgranulación por exocitosis de estas células, liberando altos niveles de una gran variedad de mediadores químicos preformados, tales como histamina y enzimas. Además se produce una acumulación de eosinófilos y otras células inflamatorias, atraídas hacia la zona de la reacción alérgica, debido a la acción de moléculas de atracción quimiotáctica. La reacción se manifiesta con fenómenos como edema, rinitis, asma y shock anafiláctico.

La fase temprana es seguida a menudo por una reacción de fase tardía, en el caso de altos niveles de exposición al alérgeno. La fase tardía implica la síntesis *de novo* en eosinófilos (reclutados en la fase temprana), de mediadores lipídicos proinflamatorios de la familia de los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, etc.) y moléculas



citotóxicas (Méndez de Inocencio 2009). Una vez liberados estos componentes, se produce inflamación y daño tisular, con un incremento de la permeabilidad vascular.

1.2 ALÉRGENOS

1.2.1 Características moleculares

Los alérgenos son antígenos, en su mayoría de naturaleza proteica, capaces de inducir una reacción alérgica de Tipo I mediada por anticuerpos específicos IgE en individuos susceptibles de desarrollar respuesta alérgica. La amplia variedad funcional y estructural de los alérgenos no ha permitido encontrar un perfil de características comunes que explique su naturaleza alergénica. Sin embargo, ciertas propiedades intrínsecas de éstos contribuyen a la alergenicidad, tales como el tamaño, solubilidad, estabilidad, composición de carbohidratos (glicoproteínas) y actividad enzimática o surfactante. En el caso de moléculas alergénicas de origen proteico, el límite inferior de tamaño se encuentra alrededor de 5-10 kDa y está determinado por la mínima complejidad para que una molécula sea inmunogénica. Las partículas volátiles de diverso origen (polen, esporas) pueden contener alérgenos. Los alérgenos transportados pueden actuar a través de la inhalación de la partícula (aeroalérgenos) y posterior liberación de ésta, posibilitando la penetración del alérgeno a través de las mucosas. Los alérgenos deben presentar un tamaño tal que permita atravesarlas. En general se trata de proteínas menores de 70 kDa (Mygind 1996). Los alérgenos, además, deben ser moléculas de alta solubilidad y estabilidad en fluidos corporales. Los alérgenos inhalados de alta solubilidad tienen facilitada su liberación desde las partículas volátiles para alcanzar el sistema respiratorio (Chapman 1998).

En cuanto a la composición de los carbohidratos en alérgenos glicoproteicos, los monosacáridos en células de mamíferos presentan raramente fucosa, y nunca xilosa, residuos frecuentes por otra parte en glicoproteínas vegetales. Las fracciones glicosídicas que contengan fucosa y xilosa podrían ser reconocidas por el sistema inmunológico como elementos extraños, aunque su presencia no es garantía de alergenicidad. A modo de ejemplo, el alérgeno glicoproteico Ole e 1 del polen de olivo posee un sitio de glicosilación compartido para dos oligosacáridos mayoritarios, uno rico en manosa y otro híbrido con xilosa. Experimentos de desglicosilación de Ole e 1 proporcionan un derivado con una menor capacidad de unirse a las inmunoglobulinas IgE de los sueros de los pacientes atópicos que la del alérgeno



glicosilado original (Batanero *et al.* 1996b; Batanero *et al.* 1994). Este efecto producido por la desglicosilación ha sido demostrado también para los alérgenos glicoproteicos de abeja PLA₂ (Prenner *et al.* 1992; Weber *et al.* 1987) y los inhibidores de α -amilasa de los pólenes de cebada y trigo (García-Casado *et al.* 1996; Sanchez-Monge *et al.* 1992).

La gran variedad funcional de los alérgenos muestra que características como la actividad enzimática no son necesarias para la alergenicidad. Muchos alérgenos potentes no son enzimáticamente activos, aunque la actividad proteolítica de algunos de ellos puede contribuir a la alergenicidad, facilitando la penetración en el epitelio pulmonar de otros alérgenos. Así mismo, las propiedades surfactantes de determinados alérgenos podrían influir en su alergenicidad favoreciendo la penetración en el tejido pulmonar, por disminución de la tensión superficial del agua. Es el caso de la fosfolipasa PLA₂ del veneno de abeja y de las lipocalinas de caballo Equ c 1, Equ c 4 y Equ c 5 (Goubran Botros *et al.* 2001).

1.2.2 Fuentes biológicas y patrón alergénico.

La capacidad de una molécula para inducir alergia guarda relación directa con su grado de accesibilidad al organismo. Debido a ello, se ha seguido el criterio de la vía de acceso al individuo alérgico para clasificar las diversas fuentes biológicas de los principales alérgenos existentes en la naturaleza (Tabla 1). Los alérgenos se pueden clasificar igualmente en función de otros múltiples criterios, entre ellos, su origen animal o vegetal, el lugar prioritario de su exposición (alérgenos de interior o exterior), sus distintas actividades biológicas demostradas experimentalmente o su homología con proteínas de función conocida.

Un paciente alérgico puede desencadenar una respuesta alérgica frente a un único alérgeno, o frente a varios alérgenos de una o más fuentes. Los pacientes pueden reaccionar produciendo IgE específica contra uno o más epítomos o determinantes antigénicos de un único alérgeno, que pueden ser diferentes de los epítomos reconocidos por otro paciente para el mismo alérgeno.

Dependiendo de la fuente alergénica, se pueden encontrar patrones alergénicos muy simples, conteniendo un bajo número de alérgenos, como es el caso de los venenos de avispa, o bien complejos, conteniendo un elevado número de alérgenos, como en el polen de olivo, en el que es posible clasificar alérgenos en función de la



frecuencia con la que son reconocidos por una población de pacientes alérgicos. Así, en extractos biológicos complejos, se puede realizar una

Tabla 1. Principales fuentes biológicas de alérgenos. Los alérgenos más frecuentemente asociados a enfermedades atópicas son los inhalados (aeroalérgenos) y los ingeridos (alérgenos alimentarios), encontrándose también alérgenos que actúan por inyección o por contacto, como son el veneno de insectos y el látex.

Fuente	Familia	Género o especie
Alérgenos inhalados		
Pólenes		
Gramíneas		
	<i>Poaceae</i>	<i>Poa sp.</i> , <i>Dactylis sp.</i> , <i>Phleum sp.</i> , <i>Lolium sp.</i> , <i>Avena sp.</i> , <i>Oryza sp.</i> , <i>Triticum sp.</i>
Malezas		
	<i>Amaranthaceae</i>	<i>Chenopodium sp.</i> , <i>Salsola sp.</i> , <i>Amaranthus sp.</i> , <i>Atriplex sp.</i> , <i>Beta sp.</i>
	<i>Compositae</i>	<i>Ambrosia sp.</i> , <i>Artemisia sp.</i> , <i>Taraxacum sp.</i> , <i>Helianthus sp.</i>
	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago sp.</i>
	<i>Polygonaceae</i>	<i>Rumex sp.</i>
Árboles y arbustos		
Angiospermas		
	<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus sp.</i> , <i>Castanea sp.</i> , <i>Fagus sp.</i>
	<i>Betulaceae</i>	<i>Betula sp.</i> , <i>Alnus sp.</i> , <i>Carpinus sp.</i> , <i>Corylus sp.</i>
	<i>Oleaceae</i>	<i>Olea sp.</i> , <i>Fraxinus sp.</i> , <i>Ligustrum sp.</i> , <i>Jasmine sp.</i>
	<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans sp.</i> , <i>Carya sp.</i>
	<i>Fabaceae</i>	<i>Prunopsis sp.</i> , <i>Acacia sp.</i>
	<i>Salicaceae</i>	<i>Salix sp.</i> , <i>Populus sp.</i>
	<i>Ulmaceae</i>	<i>Ulmus sp.</i>
	<i>Aceraceae</i>	<i>Acer sp.</i>
	<i>Moraceae</i>	<i>Morus sp.</i> , <i>Ficus sp.</i>
	<i>Mirtaceae</i>	<i>Eucalyptus sp.</i> , <i>Callistemon sp.</i> , <i>Melaleuca sp.</i>
	<i>Hamamelidaceae</i>	<i>Liquidambar sp.</i> , <i>Hamamelis sp.</i>
	<i>Platanaceae</i>	<i>Platanus sp.</i>
Gimnospermas		
	<i>Cupressaceae</i>	<i>Cupressus sp.</i> , <i>Juniperus sp.</i> , <i>Thuja sp.</i> , <i>Sequoia sp.</i> , <i>Cryptomeria sp.</i>
	<i>Taxodiaceae</i>	<i>Taxodium sp.</i>
	<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus sp.</i> , <i>Abies sp.</i>
Hongos		
		<i>Alternaria sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Epicorrum sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Curvularia sp.</i> , <i>Stemphylium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Chaetomium sp.</i> , <i>Coprinus sp.</i> , <i>Drechslera sp.</i>
Ácaros		
		<i>Dermatophagoides sp.</i> , <i>Blomia sp.</i> , <i>Lepidoglyph sp.</i> , <i>Acarus sp.</i> , <i>Tirophagus sp.</i> , <i>Cycoptobagrus sp.</i> , <i>Euroglyphus sp.</i> , <i>Chortoglyphus sp.</i>
Animales		
		<i>Felix domesticus</i> (gato), <i>Cannis domesticus</i> (perro), <i>Mus musculus</i> (ratón), <i>Rattus norvegicus</i> (rata), <i>Equus caballus</i> (caballo).
Insectos		
		<i>Blatella germanica</i> (cucaracha), <i>Chironomus thumi thumi</i> (mosquito)
Semillas (Harinas)		
		<i>Secale cereale</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Triticum aestivum</i>
Alérgenos alimentarios		
Leche, huevo, cereales, frutos secos, soja, trigo, pescado y mariscos.		
Semillas: sésamo, girasol, algodón, amapola, guisantes, lentejas.		
Frutas: manzana, melocotón, kiwi, melón.		
Especias: ajo, canela, mostaza.		
Alérgenos inyectados		
Vespídos		
		<i>Apis mellifera</i> , <i>Vespula vulgaris</i> , <i>Polistes annularis</i>
Hormigas		
		<i>Solenopsis invicta</i>
Alérgenos de contacto		
Látex		
		<i>Hevea brasiliensis</i>



clasificación de alérgenos en principales y secundarios, de forma que se considera que un alérgeno es principal cuando es reconocido por más del 50% de los pacientes (King *et al.* 1964), y secundario cuando el porcentaje es menor del 50%. Los alérgenos conocidos reciben un nombre sistemático siguiendo la nomenclatura de la IUIS (International Union of Immunology Societies) (King *et al.* 1994).

Por otra parte, existen situaciones en las que un alérgeno distinto y de otra fuente natural al que causó la sensibilización es capaz de producir IgE, debido a un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos, por compartir una estructura tridimensional similar o bien por compartir epítomos relevantes. A este fenómeno se le llama reactividad cruzada. Los panalérgenos son aquellos antígenos responsables de la reactividad cruzada entre especies relacionadas taxonómicamente o no.

1.3 INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE LA ALERGIA.

La alergia es una enfermedad cuyo desarrollo está influido de forma decisiva no sólo por factores genéticos e intrínsecos de la fuente alérgica, sino también por condicionantes ambientales como la dosis y la ruta de exposición del alérgeno, presencia de adyuvantes y la predisposición genética del individuo (Pomes 2002).

1.3.1 Polimorfismo alérgico

La mayoría de alérgenos son de naturaleza proteica, y presentan epítomos o determinantes antigénicos para células B, células T e IgE. Algunos alérgenos pueden estar constituidos por varias moléculas similares en su secuencia de aminoácidos. Las variaciones en la secuencia determinan el grado de polimorfismo alérgico, denominándose isoalérgenos a aquellos alérgenos con una identidad de al menos un 67% en su secuencia de aminoácidos. Por otra parte, se denominan isoformas o variantes a aquellos isoalérgenos con secuencias muy similares, con sustituciones únicamente en un bajo número de aminoácidos. El polimorfismo alérgico puede ser debido a la presencia de familias génicas o de variantes alélicas, como se ha observado entre otros en alérgenos del polen de Ambrosía (Griffith *et al.* 1991).

Los polimorfismos alérgicos pueden inducir una respuesta inmune con características diferenciales. Cuando la variación de la secuencia



entre isoalérgenos o isoformas (polimorfismo) se da en un fragmento polipeptídico reconocido por las células T, células B o por las IgE de pacientes alérgicos, esta variación puede afectar a la capacidad alérgica. Por ello, la presencia de isoformas en diferentes proporciones en una fuente alérgica puede influir decisivamente en la capacidad alérgica de ésta. Éste es el caso de los extractos de olivo de diferentes orígenes varietales (Alche *et al.* 2007).

1.3.2 Individuos atópicos

Los individuos atópicos son aquellos que presentan una predisposición hereditaria a producir niveles elevados de anticuerpos IgE en respuesta a la exposición de un alérgeno que no provoca respuesta en individuos normales. Diversos estudios han puesto en evidencia la importancia de la predisposición genética en la respuesta inmune de los procesos alérgicos (Ballesta 1998; Blumenthal *et al.* 1981; Cookson *et al.* 1989; Jenkins *et al.* 1997; Liu *et al.* 2003; Moffatt and Cookson 1998; Wadonda-Kabondo *et al.* 2004). Sin embargo, la elucidación de los genes que la determinan es complicada, y no han sido identificados de forma definitiva, aunque se han descrito múltiples genes candidatos (Figura 2).

Los estudios genéticos de la respuesta alérgica se han abordado mediante la identificación de polimorfismos en genes candidatos a estar implicados, principalmente, en los puntos claves del reconocimiento del antígeno a través del receptor de las células T y los implicados en el control de la producción de IgE.

Los análisis de genética poblacional han permitido establecer asociaciones entre antígenos del MHC de clase II de humanos o HLA-II (human leukocyte class II), localizados en el cromosoma 6 humano, y la respuesta IgE específica a distintos alérgenos. Así, como ejemplo, se ha observado la asociación entre el alérgeno del polen de *Artemisia vulgaris* Art v 1 y el haplotipo HLA-DR1, en el polen de *Ambrosia artemisiifolia* (Jahn-Schmid *et al.* 2008), la asociación de Amb a 5 y el haplotipo HLA-DR2/Dw2 (Marsh *et al.* 1982), entre los alérgenos de *Lolium perenne* Lol p I y Lol p II con el haplotipo HLA-DR3 (Freidhoff *et al.* 1988) y el alérgeno del olivo Ole e 1 con los haplotipos HLA-DR7 y HLA-DQ2 (Cardaba *et al.* 1996).

Así mismo, se ha estudiado la asociación entre la atopía y el polimorfismo de ciertos genes, codificantes de citoquinas, para comprobar la participación de estos polimorfismos en el control de la respuesta de IgE. Entre los más relevantes destacan polimorfismos en el gen del cromosoma 5 humano que codifica para IL-4, IL-5, IL-13 e



IL-12p40 (Heinzmann *et al.* 2000; Llanes *et al.* 2009; Miescher and Vogel 2002). Además, se han diseñado estudios para determinar la influencia de polimorfismos en los genes que codifican proteínas de importancia fisiopatológica, como la vía de las prostaglandinas (Oguma *et al.* 2004; Sanz *et al.* 2009) o la vía de los leucotrienos (Arriba-Mendez *et al.* 2008).

Otros estudios recientes están relacionando varios genes con los procesos alérgicos mediante potentes análisis de asociación por rastreo genómico (GWAS). Algunos de ellos son genes codificantes de la interleuquina 33 y su receptor, o los genes denominados ORMDL3 y GSDML (Ober and Yao 2011), así como como los genes STAT6 o los genes codificantes de la cadena alfa del receptor de alta afinidad de IgE (*FCER1A*) (Weidinger *et al.* 2008).

1.3.3 Factores de riesgo ambientales

La prevalencia de enfermedades alérgicas de tipo I está aumentando considerablemente en las últimas dos décadas, particularmente, en los países industrializados y en los centros urbanos de los países occidentales. En vista del corto intervalo de tiempo, los factores genéticos no permiten explicar la etiología de esta prevalencia. El factor hereditario se ha estimado en aproximadamente un 60% (Strachan 1995), sugiriendo una influencia clara del entorno. Por ello, se han llevado a cabo un alto número de estudios poblacionales epidemiológicos y clínicos, estableciéndose asociaciones con factores relacionados con el estilo de vida (Figura 2). Así, los factores prenatales que aumentan la probabilidad de padecer alergia atópica son el tabaquismo (Yuan *et al.* 2003), padecer gripe durante la gestación (Calvani *et al.* 2004) o infecciones respiratorias (Hughes *et al.* 1999). También se han encontrado factores postnatales, como la disminución de la duración de la lactancia materna (Oddy *et al.* 2003), el tabaquismo pasivo en la infancia (Baier *et al.* 2002; Kabesch *et al.* 2004), o la exposición precoz a un alérgeno (Holt 1995; Lau *et al.* 2000). Además, exposiciones elevadas a un alérgeno en el entorno laboral son causa de alergia ocupacional (Lachowsky and Lopez 2001).

La teoría con mayor impacto en la explicación del aumento de la prevalencia de las enfermedades atópicas ha sido la hipótesis de la higiene, planteada hace 22 años por Strachan (Strachan 1989). Esta hipótesis propone que la ausencia o la reducción de infecciones de origen microbiano o vírico (que normalmente estimularían al sistema



inmune), facilitarían el desarrollo de reacciones inmunes alérgicas, permitiendo una mayor sensibilización y progreso de la enfermedad. De esta forma, la reducción de infecciones debido a la mejora de la higiene en los países desarrollados, el uso de vacunas y antibióticos, y una mejor sanidad pública, contribuirían a la modificación del balance de la respuesta inmune alérgica (respuesta mediada por células Th2) sobre la respuesta frente a patógenos (respuesta mediada por células Th1). Esta teoría está apoyada por diversos estudios epidemiológicos, que muestran un riesgo menor de desarrollar enfermedades alérgicas en los casos de ser integrantes de familias numerosas (Strachan 1989), vivir en granjas con animales (Kilpelainen *et al.* 2000), convivir con mascotas (Anyo *et al.* 2002; Gern *et al.* 2004), o haber sufrido infecciones por hepatitis A, *Helicobacter pylori* o de *Toxoplasma gondii* (Matricardi *et al.* 2002). Sin embargo, la hipótesis de la higiene es aún controvertida, y sus mecanismos moleculares no han sido claramente identificados (Romagnani 2004).

Predisposición genética para la atopía

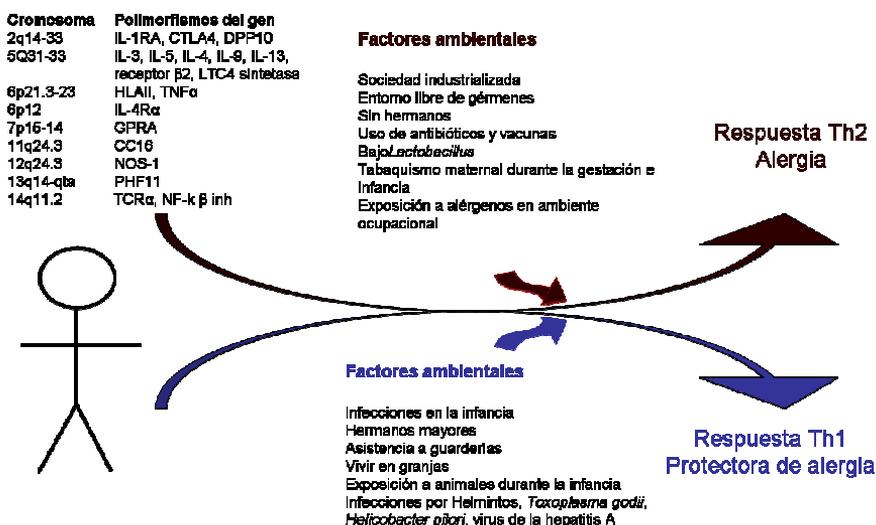


Figura 2. Factores genéticos y ambientales involucrados en el desarrollo de la sensibilización y progresión de las enfermedades alérgicas. Modificado de Umetsu (Umetsu *et al.* 2002).

Por otra parte, existen evidencias de otros factores ambientales que exacerbaban una enfermedad alérgica preestablecida (adyuvantes). Así, por ejemplo, los altos niveles de polución aumentan la respuesta alérgica potenciando sus síntomas (Burastero *et al.* 2009; von Mutius 1999), debido a la presencia en la atmósfera de adyuvantes como el



ozono, el dióxido de nitrógeno (NO₂), el dióxido de azufre (SO₂) y partículas resultantes de la combustión del gasóleo. Estas últimas pueden concentrar en su superficie a los alérgenos y actuar como transportadores hasta alcanzar los pulmones (Knox *et al.* 1997).

1.4 DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DE LA ALERGIA TIPO I. ESTRATEGIAS PARA SU MEJORA.

De forma general, la diagnosis e inmunoterapia de la alergia hace uso actualmente de extractos crudos preparados a partir de homogeneizados de las fuentes naturales alergénicas, lo que permite detectar únicamente la fuente biológica de sensibilización y no el alérgeno causante de ésta. Se están proponiendo diversas alternativas que pretenden profundizar en la especificidad de la reacción en cada paciente, aumentando la individualización terapéutica con vistas a mejorar la eficacia.

1.4.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la alergia de tipo I se basa en una combinación de criterios sintomáticos clínicos y características fisiopatológicas, determinadas por pruebas *in vivo*, tales como las epicutáneas SPT (Skin Prick Test), o pruebas de provocación nasal u oral con el extracto alergénico, o con pruebas *in vitro* como la radioalergoabsorción (RAST). Los ensayos SPT consisten en la punción de la piel mediante una lanceta. Una vez depositado el extracto alergénico en la piel, se evalúa la superficie inflamada, en concreto la respuesta edematosa y el eritema que lo rodea en la zona de punción. Estas pruebas se complementan con los ensayos RAST, de detección de IgE específicas, denominado también como ensayo de potencia biológica. Los ensayos RAST se realizan a partir de una muestra de sangre y permiten cuantificar los niveles de IgE específica presentes en el suero del paciente, y tienen la ventaja de que no se ven afectados por la toma de drogas, tales como los antihistamínicos.

1.4.2 Tratamiento

Una vez diagnosticada la alergia, el tratamiento sintomático consiste en la administración de fármacos que mitiguen los síntomas clínicos de esta afección. El tratamiento incluye alternativas como la administración de anti-histaminas, β 2-agonistas, corticosteroides y



estabilizadores de células mastocíticas. Los tratamientos etiológicos duraderos consisten generalmente en inmunoterapia específica. Ésta se fundamenta en la administración repetitiva de dosis crecientes de un extracto de proteínas a la que el paciente está sensibilizado, aumentando su tolerancia y disminuyendo la reacción en exposiciones posteriores. Existen diversas teorías sobre cómo los tratamientos de inmunoterapia consiguen reducir paulatinamente los síntomas. Una de las más aceptadas consiste en que la inmunoterapia desvía la respuesta inmune alérgica Th2 hacia una respuesta Th1. En la respuesta Th2, las células T estimulan a las células B para que produzcan altos niveles de IgE específica. La inmunodesviación inducida por la inmunoterapia cambia la respuesta de la célula T, que estimula a las células B para que produzcan anticuerpos IgG, los cuáles bloquean la respuesta Th2, interceptando a los alérgenos antes de que se enlacen a IgE o a células mastocíticas (Durham and Till 1998; Shamji and Durham 2011).

1.4.3 Estrategias para la mejora de la diagnosis y la inmunoterapia específica

La utilización de extractos biológicos para la diagnosis e inmunoterapia presenta diversos problemas. Entre ellos, figuran la variabilidad en la composición de los extractos, la presencia en los mismos de moléculas alergénicas a las que el paciente no es alérgico (con los consiguientes riesgos de una diagnosis incorrecta, nuevas sensibilizaciones y reacciones sistémicas) y en casos como la polisensibilización, una eficacia limitada. Todo ello restringe la utilización de la inmunoterapia específica. Se están llevando a cabo diversas estrategias para resolver estos problemas, entre las que cabe destacar la estandarización y purificación de los extractos, así como nuevas alternativas biotecnológicas.

Estandarización: Para lograr una reproducibilidad aceptable de los extractos es necesaria su estandarización, controlando la composición de cada uno de los alérgenos (e isoformas si corresponde) de los que está constituido el extracto, cuantificando su concentración, comprobando su estabilidad, y midiendo su actividad alérgica total (potencia biológica).

El sistema de estandarización biológica se suele referir a la potencia de la respuesta IgE de una población, representada por la reacción de un conjunto de sueros de pacientes alérgicos al alérgeno o alérgenos de un extracto. Habitualmente se lleva a cabo en extractos naturales de la fuente alérgica, conteniendo una mezcla de alérgenos mayoritarios y



minoritarios. Los alérgenos mayoritarios pueden constituir un elevado porcentaje de la proteína total del extracto. En este caso, el resto de alérgenos pueden quedar levemente representados en el extracto (van Ree 1997; 2007). Por este motivo, la respuesta del conjunto sérico está dominada por los alérgenos mayoritarios, quedando la respuesta a los alérgenos minoritarios muy diluida debido a que no todos los pacientes son alérgicos a éstos. En consecuencia, solo los alérgenos mayoritarios muestran diferencias en la estandarización biológica. Debido a ello, la cuantificación de los alérgenos en el caso de extractos naturales es de gran importancia para llevar a cabo diagnósticos e inmunizaciones correctas en pacientes alérgicos a alérgenos minoritarios.

La fuente del alérgeno usada para la preparación de los extractos alérgicos naturales o recombinantes puede reflejar diferentes isoformas del alérgeno o proporciones de éstas en los extractos. Además, el contenido en las isoformas alérgicas varía dependiendo del origen geográfico de la fuente, por lo que pacientes alérgicos de distintas áreas pueden exhibir diferencias en los perfiles de sensibilización a moléculas alérgicas (Moverare *et al.* 2002).

La presencia de dichas isoformas de alérgenos da lugar a una notable variabilidad en la composición de un alérgeno, que puede cambiar considerablemente de unas preparaciones a otras. Este hecho puede dificultar el reconocimiento de los pacientes a un determinado extracto. La complejidad de la obtención de múltiples variantes del alérgeno, bien de origen natural o recombinante, hace que para el diseño de extractos efectivos con fines inmunoterapéuticos sea necesario conocer los alérgenos de una fuente biológica dada.

Purificación de alérgenos: El objetivo de la purificación del extracto es eliminar del extracto crudo el material no antigénico potencialmente irritante, que puede interferir en la diagnosis y además, promover nuevas sensibilizaciones (Rodríguez *et al.* 2000).

Los productos no relevantes en el tratamiento pueden ser moléculas que ejerzan un efecto coadyuvante, o por el contrario enmascarar ciertos alérgenos del extracto disminuyendo su capacidad de unir IgEs (Rodríguez *et al.* 2000). Como ejemplo, en el polen de olivo se observan gran cantidad de lípidos que deben extraerse con disolventes orgánicos antes de proceder a la preparación del extracto salino de proteínas.

Para eliminar además de las impurezas, otras proteínas alérgicas que no interesan, de modo que sólo queden los alérgenos a los que el



paciente es alérgico, se han llevado a cabo purificaciones de alérgenos a partir del aislamiento de su fuente natural. Estos procesos presentan muchas dificultades técnicas y un bajo rendimiento, por lo que se está recurriendo a la producción recombinante de alérgenos, que permite conseguir cantidades ilimitadas de alérgenos y definir el perfil de sensibilización de cada paciente en la diagnosis con dichos extractos aislados individualmente (Chapman *et al.* 2000). Se han llegado a desarrollar microarrays para testar 94 alérgenos específicos (Hiller *et al.* 2002), en su mayoría recombinantes, representativos de las fuentes biológicas alérgicas más comunes. Con estos extractos diagnósticos se pueden ser discriminan las moléculas que causan la alergia.

Estrategias biotecnológicas: La inmunoterapia específica presenta riesgo de anafilaxia debido a efectos mediados por IgE. Los tratamientos actuales se realizan inicialmente con dosis bajas del extracto alérgico, incrementándolas paulatinamente hasta lograr un estado de tolerancia. Algunos pacientes pueden desencadenar una respuesta Th2 exacerbada, en vez de la desviación buscada de la respuesta hacia Th1. Una solución para ello estriba en la búsqueda de alérgenos o isoformas hipoalérgicas (Ferreira *et al.* 1996) naturales, recombinantes o fragmentos de éstos (Valenta *et al.* 2011), con una baja reactividad a IgE y que reconozcan a los epítomos de las células T. Sin embargo, los ensayos clínicos de inmunoterapia con alérgenos recombinantes se están únicamente llevando a cabo en la actualidad para el alérgeno mayoritario Bet v 1 del polen de abedul o con derivados hipoalérgicos de alérgenos recombinantes del polen de abedul (Bet v 1) y del polen de *Phleum pratense* (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b y Phl p 6) (Valenta *et al.* 2011).

1.5 POLINOSIS

Entre los tipos de hipersensibilidad de tipo I, la alergia a los pólenes, también denominada polinosis, es la más común, afectando del orden del 11-19 % de la población del oeste de Europa y aproximadamente al 20% de la población española. Los síntomas originados por la alergia a pólenes son de carácter estacional. Se producen cuando los granos de polen se ponen en contacto con las mucosas. Como consecuencia el polen se hidrata liberando altas cantidades de proteínas, desencadenando la reacción alérgica. Las manifestaciones típicas derivadas de la polinosis son mucosidad, rinitis alérgica, picor de ojos, nariz y garganta y conjuntivitis alérgica. Además, diversos estudios han descrito que los alérgenos se pueden encontrar en la



atmósfera asociados a partículas de menor tamaño que un grano de polen, tales como gránulos de almidón (Suphioglu *et al.* 1992), gránulos procedentes de citoplasma de polen (Abou Chakra *et al.* 2011), partículas de platino derivadas de la polución ambiental (Burastero *et al.* 2009) y otra serie de partículas que facilitarían su penetración en las vías respiratorias distales, induciendo además procesos asmáticos.

La incidencia de la polinosis depende de diversos factores aerobiológicos, tales como la composición de la vegetación (Corsico *et al.* 2000), el grado de urbanización (Crimi *et al.* 1999), las condiciones climáticas (Latalova M. 2002), la fecha y la duración de la exposición al polen, y la fenología de las plantas alergénicas (Emberlin *et al.* 2002). Además, el grano de polen debe reunir ciertos requisitos para llevar a cabo un transporte eficaz de los alérgenos y causar alergia. Entre los más importantes están: un diámetro de polen comprendido entre 15 y 60 μm , siendo lo suficientemente ligero para ser desplazado a largas distancias por el aire (polen anemófilo), pertenecer a una especie ampliamente representada en un área geográfica y producirse en gran cantidad, contener un componente antigénico capaz de inducir sensibilidad, y liberar fácilmente los alérgenos al llegar a las mucosas del individuo alérgico (Coca *et al.* 1931).

1.5.1 Polinosis en el área mediterránea

El clima del área mediterránea se caracteriza por unos inviernos templados y unos veranos muy secos. Ello propicia una vegetación diferenciada de otras zonas europeas, favoreciendo la producción de especies polínicas incluídas en los géneros *Parietaria*, *Olea* y *Cupressus*, escasamente representadas en el norte de Europa y en la zona centroeuropea (D'Amato and Liccardi 1994).

El análisis del contenido polínico de muestras aerobiológicas de la atmósfera de varias ciudades mediterráneas permite identificar tres estaciones polínicas de plantas, cuyo polen presenta una elevada capacidad alergénica (D'Amato and Liccardi 1994; D'Amato *et al.* 1991; D'Amato 2009; D'Amato *et al.* 2001).

Una estación baja en polen en invierno (diciembre a finales de marzo), marcada por la polinización de árboles de las familias *Cupressaceae*, *Corilaceae*, *Acacieae* y algunas *Betulaceae*. Un periodo con alta cantidad de polen, correspondiente a la estación de primavera y verano (abril-julio), que es la más relevante desde el punto de vista alergológico. En este periodo, se desarrolla la polinización de las familias *Gramineae*,



Urticaceae, *Platanaceae* y *Oleaceae*. Y por último, el periodo correspondiente a la estación de verano y otoño (agosto-octubre) que está marcado por la polinización de plantas de la familia *Urticaceae*, algunas de la familia *Gramineae* y otras plantas herbáceas, tales como las de la familia *Chenopodiaceae* y *Asteraceae*.

1.6 EL OLIVO COMO FUENTE DE ALÉRGENOS POLÍNICOS

1.6.1 Origen y propagación del cultivo

El olivo (*Olea europaea* L.) es el árbol frutal más extensamente cultivado del mundo ((FAO 2008) y es originario del Mediterráneo oriental (Besnard and Bervillé 2000). Empezó a cultivarse para aprovechar sus frutos (las aceitunas), de los que se extrae el aceite (aceite de oliva), así como su madera. El cultivo del olivo se expandió por todas las riberas mediterráneas debido al alto valor de su producción. Actualmente, el olivo sigue ejerciendo una importante influencia económica y social, ya que constituye la base de las economías locales donde se cultiva. Además de las áreas mediterráneas, su cultivo se ha extendido a algunas zonas climáticas templadas, como California, Argentina, Australia y el sur de África (figura 3).

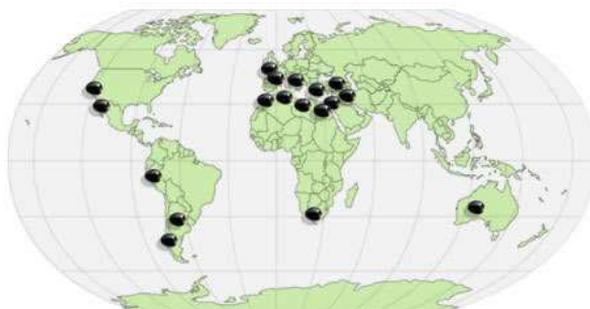


Figura 3. Distribución geográfica del cultivo en el mundo (<http://www.olives.com>).

Durante todo su periodo de difusión desde el extremo oriental del mediterráneo hacia el oeste, el olivo ha sido objeto de selección por sus características de interés agronómico y propagado de forma vegetativa, siendo ello una de las principales razones de la marcada homogeneidad genética en las variedades cultivadas. El número estimado de variedades descritas mediante marcadores pomológicos es de 2.000 (Lavee 1994). Se han catalogado como autóctonas 1.200



variedades (Bartolini 1994; 1998). En España se han descrito 272 variedades, de las cuales, en Andalucía se cultivan 156 (Rallo 2005).

1.6.2 Aspectos botánicos

La familia *Oleaceae*, a la que pertenece el olivo, abarca aproximadamente 29 géneros, entre las que se incluyen especies de interés comercial como el fresno (*Fraxinus excelsior*), el jazmín (*Jasminum officinale*), o el lilo común (*Syringa vulgaris*). El olivo (*Olea europaea*) es una especie arbórea que alcanza de media unos 4 a 8 m de altura, de tronco erecto, robusto y nudoso, con hojas perennes de forma lanceolada y opuestas (Figura 4), que pueden medir de 2 a 8 cm de longitud. El haz de éstas es verde-grisáceo, mientras que el envés es de color plateado. Las flores son hermafroditas, pequeñas y actinomorfas, con cuatro pétalos de color blanco y dos estambres opuestos. Las flores están reunidas en inflorescencias paniculadas con 10-40 flores dependiendo del cultivar. El fruto es una drupa altamente oleosa, de color verde al inicio de su formación y negro cuando alcanza su maduración completa (Barranco *et al.* 2008).

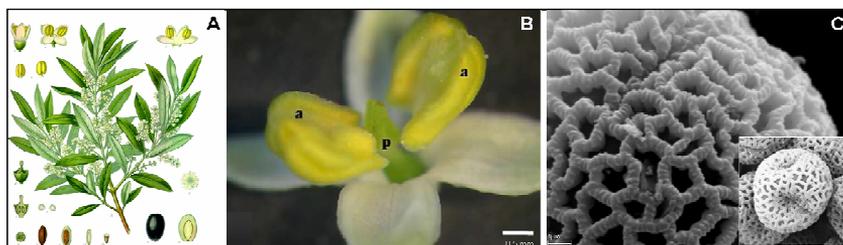


Figura 4. Detalle de **A)** una rama de olivo (Köhler 1887), **B)** de una flor de olivo, mostrando las dos anteras (a) y el pistilo (P) (Serrano *et al.* 2008) y **C)** exina reticulada de un grano de polen de olivo (Alché *et al.* 2010).

El grano de polen de olivo maduro es trizonocolporado, isopolar, con simetría radial, subcircular-lobulado en visión polar, con un perímetro de 22-28 μm . Es elíptico en visión ecuatorial, con un perímetro de 19-30 μm . Posee una exina gruesa y reticulada, típica de la familia de las oleáceas (De Linares 2007). El grano maduro de polen de olivo es bicelular.

La polinización del olivo es anemófila, aunque los granos se pueden transportar también por insectos (De Linares 2007).



El gran interés económico en la producción del olivo hace que la reproducción sexual de éste sea de crucial importancia, ya que afecta a los porcentajes de producción del fruto, la aceituna

La estructura de la mayoría de las flores, incluidas las del olivo, favorecen que su propio polen, se deposite en el estigma de la misma flor. Las adaptaciones evolutivas de las plantas han propiciado la polinización cruzada, como estrategia para promover la formación de poblaciones genéticamente diferentes. Entre los mecanismos de esterilidad desarrollados destaca la autoincompatibilidad, por la cual una planta hermafrodita fértil es incapaz de producir cigotos tras la autopolinización (de Nettancourt 1997). Las pruebas de paternidad con marcadores moleculares han mostrado evidencias de sistemas de incompatibilidad en determinadas variedades de olivo.

1.6.3 Desarrollo del grano de polen

El grano de polen, o gametofito masculino, es un organismo haploide esencial en el ciclo de vida de las plantas con semillas (espermatofitas), ya que tiene la capacidad de formar un cigoto tras la unión con el gameto femenino, llevando a término la reproducción sexual de estas plantas. La formación y maduración del polen se produce en dos fases distintas y sucesivas, la microesporogénesis y la microgametogénesis (Figura5). La microesporogénesis se produce en los sacos polínicos (microesporangios) de las anteras, en los que se forman células independientes haploides denominadas microsporas a partir de una división meiótica de las células madres del polen diploides. La microgametogénesis comienza con la extensión de la microspora comúnmente asociada con la formación de una vacuola única. La vacuolización está acompañada por el desplazamiento del núcleo de la microspora a una posición excéntrica contra la pared de la microspora. En esta posición el núcleo se somete a la primera mitosis que causa la formación de dos células desiguales en tamaño y función que son la célula vegetativa y la célula generativa. La célula vegetativa es grande y la célula generativa es pequeña, cada una conteniendo un núcleo haploide. La célula generativa posteriormente se separa de la pared de grano de polen y es englobada por la célula vegetativa que forma una estructura única de una célula dentro de otra célula. La célula generativa englobada se divide una vez más por mitosis, de forma simétrica, para formar dos células espermáticas que quedan imbuídas dentro del citoplasma de la célula vegetativa. Esta última división mitótica, dependiendo de las especies, se produce antes de que el polen sea liberado (polen tricelular) o dentro del tubo polínico durante



el proceso de la germinación (polen bicelular); tal es el caso del polen de olivo. La célula vegetativa es responsable del crecimiento del tubo polínico hacia la célula huevo o megaspora, mientras las dos células espermáticas están implicadas en la fertilización y en la formación de la semilla.

El grano de polen maduro se encuentra rodeado por dos paredes. La interna o intina, compuesta por celulosa, pectina, polisacáridos, entre ellos calosa, y proteínas. Todos estos elementos conforman la pared del tubo polínico en el proceso de germinación del grano de polen. La capa externa o exina está compuesta fundamentalmente por esporopolenina, un politerpeno muy resistente a la degradación química y a agresiones mecánicas.

La deshidratación del polen, producida antes de su liberación de la antera, induce un estado quiescente que le confiere una elevada resistencia a agresiones ambientales. Una vez liberado el polen, éste es transportado mediante el viento (polinización anemófila) insectos (polinización entomófila) u otros agentes de origen físico o biológico hasta el estigma de una flor compatible. Cuando el grano de polen entra en contacto con el estigma se inicia su germinación. Éste atraviesa el estilo hasta llegar al ovario. El proceso comienza con la rehidratación del grano de polen, desencadenándose una serie de procesos celulares que conducen a la profusión del tubo polínico en el estigma. De forma resumida, dichos procesos consisten en una reorganización citoplasmática, la generación de un gradiente de calcio y la deposición de calosa en uno de los poros que deja la exina, del cual emergerá el tubo polínico. La célula vegetativa inicia el crecimiento del tubo polínico por elongación de la capa interna del grano de polen, la intina.

Los fenómenos de elongación celular se encuentran limitados a la extremidad del tubo. El crecimiento se realiza mediante la generación de un flujo continuo de vesículas derivadas del Golgi que contienen materiales precursores de la pared del tubo, y que se mantiene por la continua actividad del citoesqueleto (Li YQ. *et al.* 1997). Durante el crecimiento del tubo polínico, se produce un desplazamiento del citoplasma y las células espermáticas hacia el ápice y la deposición de calosa impide su retroceso. El tubo polínico se nutre de los tejidos del estilo, hasta ponerse en contacto con el saco embrionario. En este momento el tubo polínico libera las dos células espermáticas. Una se fusiona con la ovocélula y otra con la célula central diploide del saco



embrionario, dando lugar al cigoto diploide y a un núcleo triploide en el saco embrionario, respectivamente. El cigoto, mediante división celular, da lugar al embrión. La célula triploide formará el tejido de nutrición del embrión o endospermo.

El proceso de germinación del grano de polen se puede reproducir *in vitro*, permitiendo el estudio de la expresión de las proteínas alergénicas, algunas de las cuales, son liberadas durante la rehidratación del polen o durante su germinación, tanto desde su pared, como del interior del mismo (Alche *et al.* 2004; Morales *et al.* 2008; Suen *et al.* 2003).

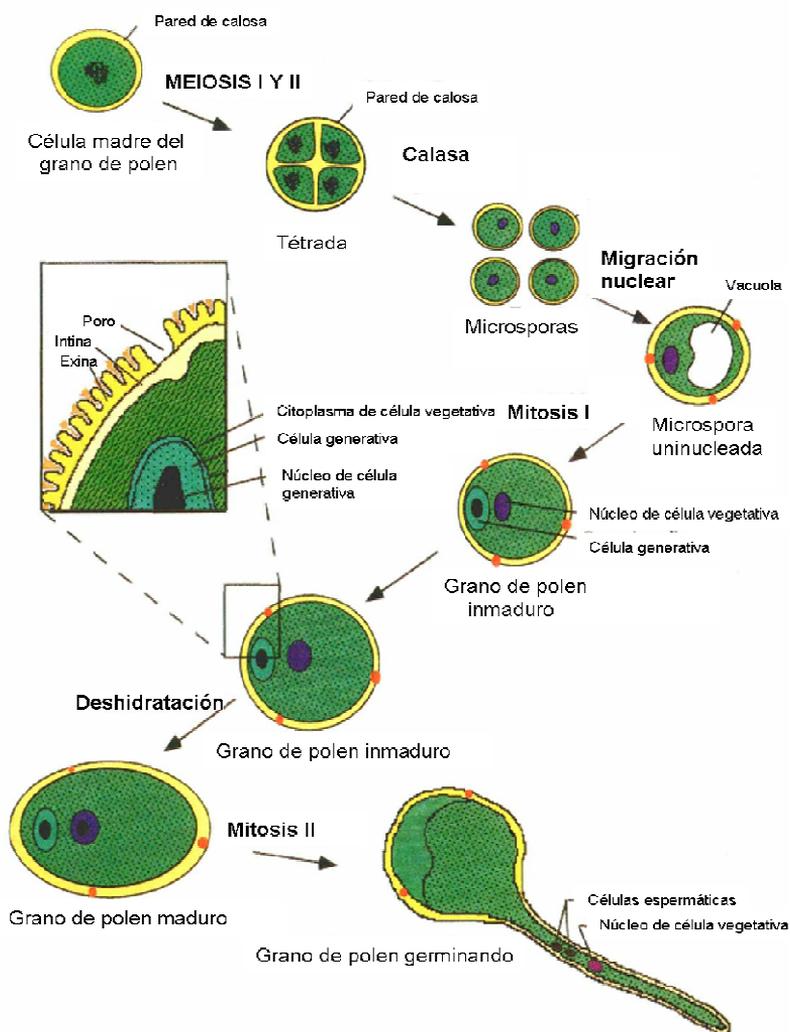


Figura 5. Esquema de la microesporogénesis y la microgametogénesis de la mayoría de angiospermas (polen bicelular). Adaptado de Mckormick (McCormick 1993).



1.6.4 Alergia al polen de olivo

El olivo libera altos niveles de polen al final de la primavera (abril-mayo). El polen de olivo es una de las causas principales de alergia Tipo I en las regiones donde su cultivo está ampliamente extendido, especialmente en España, Grecia y el sur de Italia y de Francia (Wheeler 1992). En Andalucía existe una amplia tradición olivarera, por ello, la incidencia de la polinosis al olivo se acrecienta respecto a zonas del norte de España. La incidencia de la alergia al olivo en pacientes con alergia tipo I supera el 97 % en Jaén, 90 % en Sevilla (Subiza *et al.* 1998), 81 % en Granada (Díaz de la Guardia *et al.* 1991), 72% en Córdoba (Domínguez 1995), 69 % en Málaga (Torrecillas *et al.* 1996) y 66.2% en Almería (Sabariego 2003). El patrón de reconocimiento de alérgenos en el extracto del polen de olivo depende del área geográfica donde viven los pacientes. De esta forma, se verifica que pacientes de Jaén o Córdoba muestran un alergograma o perfil alergénico más complejo, determinado por mayores niveles de IgE específicas respecto a los pacientes de Madrid, donde los niveles de polen de olivo en la época de polinización son mucho menores que en Andalucía (Casanovas *et al.* 1997; Rodríguez *et al.* 1998).

La polinosis debida al olivo se caracteriza por síntomas clínicos de rinitis, conjuntivitis, y/o asma bronquial. En consecuencia, la alergia tiene un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y está asociada con altos costes económicos (Meltzer 2001), representando un objetivo relevante de prevención en dichas áreas.

1.6.5 Alérgenos del polen de olivo

El grano de polen de olivo posee un perfil alergénico complejo (Rodríguez *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 2001). El extracto proteico del polen de olivo en SDS-PAGE está caracterizado por un gran número de bandas proteicas, reconocidas por anticuerpos IgE de sueros de pacientes sensibilizados. Hasta el momento, se han identificado y caracterizado hasta 11 alérgenos (Tabla 2).

Algunos de ellos son miembros de familias de proteínas conocidas, como profilinas (Ole e 2), proteínas de unión a Calcio (Ole e 3 y Ole e 8), superóxido dismutasas (Ole e 5), proteínas de transferencia de lípidos o LTPs (Ole e 7), β -glucanasas (Ole e 9), proteínas de unión a carbohidratos (Ole e 10) o pectin metil-esterasas (Ole e 11). La expresión recombinante de algunos de estos alérgenos en bacterias, levaduras, células de insectos, o en *Arabidopsis thaliana* ha permitido su



estudio a nivel molecular, resolviendo los problemas de bajo rendimiento en la purificación a partir del extracto natural de polen.

Tabla 2. Alérgenos descritos del polen de olivo. ^a Las masas moleculares se han determinado mediante espectrometría de masas (*) o SDS-PAGE (**).

Alérgeno	PM (kDa) ^a	Expresión recombinante	Homología	Prevalencia (%)
Ole e 1	16.3*	<i>E. coli</i> <i>P. Pastoris</i> <i>A. thaliana</i>	Fra e 1, Syr v 1, Lig v 1, Pla 11, Che a 1, LAT52, Lol p 11, Zmc 13	55-90
Ole e 2	14-16**	<i>E. coli</i>	Profilinas	24
Ole e 3	9.2*	<i>E. coli</i> <i>A. thaliana</i>	Polcalcinas	20
Ole e 4	32**	-----	-----	80
Ole e 5	16**	<i>E. coli</i>	Superóxido dismutasas	35
Ole e 6	5.8*	<i>P. pastoris</i>	-----	10-55
Ole e 7	9.9-10.3*	-----	LTPs	47
Ole e 8	18.8**	<i>E. coli</i> <i>A. thaliana</i>	Polcalcinas	3-4
Ole e 9	46.4*	<i>P. pastoris</i>	1,3-β-glucanasas	65
Ole e 10	10.4*	<i>P. pastoris</i> <i>S. frugiperda</i> (células de insecto)	Homología con Ole e 9	55
Ole e 11	37.4**	<i>P. pastoris</i>	Pectin metilesterasa	60-75

Ole e 1 está considerado como el principal alérgeno del polen de olivo, por su prevalencia entre pacientes atópicos y la alta proporción de proteína que supone respecto al contenido total de un extracto proteico de polen, en comparación con otros alérgenos de olivo (Lombardero *et al.* 1992). Se ha determinado su secuencia aminoacídica (Villalba *et al.* 1993), constituida por 145 aminoácidos, con una masa molecular de 16.33 kDa. La proteína es de carácter glicoproteico. Contiene un grupo glicosídico unido covalentemente a la Asn-111 (De Cesare *et al.* 1993). Debido a las variantes de glicosilación, que se distribuyen incluso de manera específica entre cultivares (Castro *et al.* 2010b), presenta un perfil complejo de varias bandas en SDS-PAGE, formado por dos bandas mayoritarias de 18.5 y 20 kDa, esta última glicosilada, y dos componentes minoritarios de 22 y 40 kDa que corresponden a una molécula con un mayor contenido en azúcares y a la forma dimérica de 20 kDa, respectivamente (Villalba *et al.* 1993). La fracción oligosacáridica de Ole e 1 está implicada en su actividad alérgica, así como en la



reactividad cruzada con proteínas de plantas taxonómicamente no relacionadas con el olivo (Batanero *et al.* 1996b). Ole e 1 se ha clonado y secuenciado (Hamman Khalifa 2008; Lombardero *et al.* 1994; Villalba *et al.* 1994), obteniéndose hasta 24 isoformas diferentes. Ello es debido a las numerosas microheterogeneidades en la secuencia nucleotídica de Ole e 1, que pueden resultar en sustituciones de aminoácidos, influenciando cambios en el plegamiento de la proteína natural, así como en la capacidad de unión a moléculas IgE (Gonzalez *et al.* 2002). La función biológica de Ole e 1 en el polen de olivo es desconocida, aunque se ha sugerido, por su homología con la proteína de tomate LAT52, que debe participar en vías de señalización, controlando los procesos previos a la germinación, emergencia del tubo polínico y guía del tubo polínico a través del pistilo de la flor de olivo. Se ha descrito un incremento de transcritos durante la germinación y crecimiento del tubo polínico, así como un aumento de la proteína tras emerger el tubo polínico, liberándose una parte al medio de cultivo durante la germinación del polen (Alche *et al.* 2004).

Ole e 2 pertenece a la familia de las profilinas, ampliamente distribuidas en la mayoría de las células eucarióticas (Gibbon *et al.* 1997; Sohn and Goldschmidt-Clermont 1994). Las profilinas son proteínas muy solubles, y multifuncionales. Las funciones son dependientes de su interacción con sus ligandos naturales. Pueden actuar secuestrando monómeros de actina, regulando la polimerización de filamentos, o se pueden unir a fosfoinosítidos, poli-L-prolina, y proteínas ricas en motivos de prolina. Por ello, se ha sugerido, además de su implicación en los cambios de la arquitectura celular por modulación del citoesqueleto, su implicación en la transducción de señales.

Las profilinas han sido reconocidas como alergénicas en varias fuentes vegetales tales como pólenes, frutas y vegetales. Su ubicuidad, unida a su secuencia altamente conservada, hace que hayan sido consideradas panalérgenos, causantes de reactividad cruzada (Valenta *et al.* 1992). Ole e 2 muestra una prevalencia del 24% en pacientes atópicos (Quiralte *et al.* 2007). La profilina del olivo ha sido purificada a partir del extracto de polen (Ledesma *et al.* 1998a), y ha sido caracterizada, clonada y secuenciada (Asturias *et al.* 1997). Ole e 2 posee un alto grado de polimorfismo tanto en su secuencia nucleotídica, como en la aminoacídica, presentando tres isoformas en el polen de olivo, con peso molecular en SDS-PAGE en el rango de 14-16 kDa (Morales *et al.* 2008). Al igual que ocurre con Ole e 1, se



libera en parte al medio de cultivo durante la germinación del polen. Esta alta solubilidad de ambas proteínas facilita su disponibilidad a las células epiteliales de las mucosas, y las convierte en potentes alérgenos. En el grano de polen en germinación, Ole e 2 se acumula tanto en la región apical del tubo polínico, como en el área próxima a la apertura por la cual emerge éste (Morales *et al.* 2008).

Ole e 3 y **Ole e 8** han sido identificadas como proteínas alergénicas de olivo, pertenecientes a la familia de proteínas polcalcinas, que son proteínas ligantes de Ca^{2+} en polen (Batanero *et al.* 1996a; Ledesma *et al.* 1998b). Poseen motivos estructurales *EF-hand* (Ledesma *et al.* 2000), consistentes en 12 residuos de aminoácidos consecutivos y altamente conservados que forman un lazo capaz de unir iones calcio (Ledesma *et al.* 1998b). Ole e 3 y Ole e 8 contienen dos y cuatro motivos, respectivamente.

Ole e 3 es una proteína pequeña, constituida por 84 aminoácidos, con una elevada homología con otras proteínas de pólenes de distintas especies ligantes de Ca^{2+} , por lo que presenta reactividad cruzada (Batanero *et al.* 1996a; Ledesma *et al.* 1998b). Este alérgeno se produce específicamente en polen y no se expresa en otros tejidos (Alché *et al.* 2003).

Ole e 8 es una proteína consistente en 171 aminoácidos y ha sido clonada, secuenciada y expresada en *E. coli* (Ledesma *et al.* 2000). Este alérgeno está presente en muy bajos niveles en el grano de polen de olivo, de ahí la prevalencia del 3-4% en pacientes atópicos (Ledesma *et al.* 2002).

Ole e 4 es un alérgeno de polen de olivo que ha sido purificado y parcialmente caracterizado (Boluda *et al.* 1998). El análisis de la secuencia de aminoácidos de Ole e 4 no reveló homología con otras proteínas. Ole e 4 tiene una masa molecular aparente de 32 kDa, está constituido por una sola cadena polipeptídica y presenta al menos tres isoformas de pI entre 4.6 y 5.1.

Ole e 5 es un alérgeno que fue parcialmente purificado y caracterizado como una proteína de 16 kDa (Boluda *et al.* 1998). La secuencia amino-terminal mostró un alto grado de homología con superóxido dismutasas (SODs) de diversas especies de plantas. Las SODs catalizan la dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, formando parte de los sistemas celulares de defensa antioxidante. Ole e 5 es reconocido por el 30% de los pacientes sensibilizados al olivo. Posteriormente, se clonó y expresó en *E. coli*



(Butteroni *et al.* 2005), resultando ser una Cu/Zn SOD de 152 aminoácidos y un peso molecular teórico de 15.3 kDa. La elevada identidad de Ole e 5 con SODs de otras especies (80-90%), unida a su ubicuidad, indica que este alérgeno podría presentar reactividad cruzada. Alché y colaboradores verificaron la presencia de Ole e 5 en el citoplasma de la célula vegetativa y generativa, así como en la pared del grano de polen mediante microscopía electrónica de transmisión, sugiriendo que las Cu/Zn SODs podrían tener una función de protección contra el estrés oxidativo durante el desarrollo del polen (Alché *et al.* 1998).

Ole e 6 es una proteína que se ha aislado del polen de olivo, se ha clonado y secuenciado (Batanero *et al.* 1997). Su secuencia aminoacídica presenta 50 residuos, con un elevado número de cisteínas (Trevino *et al.* 2004). Su peso molecular es de 5.8 kDa, y no se ha encontrado homología con ninguna proteína. Las isoformas recombinantes de Ole e 6 han sido caracterizadas tras su expresión en *P. pastoris* (Barral *et al.* 2004b).

La prevalencia de Ole e 6 varía mucho en diferentes áreas geográficas, llegando desde el 10 hasta el 55% en áreas donde el olivo es extensamente cultivado (Batanero *et al.* 1997).

Ole e 7 es una proteína que presenta homología con la familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTP). Fue purificada del polen de olivo y caracterizada, con una masa molecular aparente de 10 kDa (Tejera *et al.* 1999). La secuencia primaria ha sido determinada parcialmente. Se ha encontrado una notable heterogeneidad en la secuencia aminoacídica, confirmada mediante análisis por espectrometría de masas, que indica que Ole e 7 está compuesto por varias isoformas. La frecuencia de reconocimiento por sueros de pacientes alérgicos a olivo es del 47%. Debido a la ubicuidad de su distribución en las diferentes especies vegetales, y a la homología que presenta con diversas especies vegetales, presenta reactividad cruzada y se ha propuesto como panalérgeno (Díaz-Perales *et al.* 2000). Por otra parte, Ole e 7 está implicada en el mecanismo de defensa contra patógenos (Wirtz 1997).

Ole e 9 es una proteína que ha sido aislada, caracterizada y secuenciada (Huecas *et al.* 2001). Su peso molecular es de 46,4 kDa, y está compuesta por 460 aminoácidos. Tiene carácter polimórfico, y presenta dos dominios estructuralmente e inmunológicamente independientes (Palomares *et al.* 2005; Palomares *et al.* 2003). El



dominio N-terminal, de 36 kDa, con actividad 1,3- β -glucanasa e implicado en reactividad cruzada con diferentes especies vegetales, alimentos derivados de plantas y látex (Palomares *et al.* 2005) y el dominio C-terminal, de 10 kDa, que enlaza 1,3- β -glucanos, y cuya secuencia presenta homología con Ole e 10 (Palomares *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2007).

Las 1,3- β -glucanasas son una familia de proteínas relacionadas con la patogénesis, es decir, con los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, así como con procesos normales del desarrollo de éstas. Ole e 9 es la primera 1,3- β -glucanasa detectada en polen, donde podría ejercer un papel biológico durante la formación del mismo, durante el desarrollo del tubo polínico, o bien de defensa ante el ataque de agentes patógenos.

Esta proteína está implicada en la respuesta alérgica del 65% de los pacientes que sufren polinosis de olivo.

Ole e 10 es una proteína aislada a partir del extracto salino del polen de olivo, clonada y secuenciada. Contiene 102 aminoácidos, y presenta homología con el dominio C-terminal del alérgeno Ole e 9. Se ha descrito reactividad cruzada a nivel de IgE entre ambos alérgenos, así como la implicación de Ole e 10 en fenómenos de reactividad cruzada entre distintos pólenes, alimentos y látex, por lo que ha sido propuesta como candidata a estar involucrada en el síndrome polen-látex-frutas (Barral *et al.* 2004a). La prevalencia entre pacientes sensibilizados al olivo es del 55%.

Ole e 10 une carbohidratos solubles, por lo que se propuso como primer miembro de una nueva familia de unión de carbohidratos, la familia CBM43. La familia de las CBMs (carbohydrate-binding modules) son los módulos no catalíticos más comunes asociados con enzimas con función de hidrólisis de pared celular en plantas. La co-localización de Ole e 10 con calosa (un 1,3-beta-glucano) en el tubo polínico sugiere una función de este alérgeno en el metabolismo de los carbohidratos y en la remodelación de la pared del tubo polínico durante la germinación del grano de polen (Barral *et al.* 2005).

Ole e 11 es el último alérgeno que ha sido identificado, clonado y secuenciado en el polen de olivo (Salamanca *et al.* 2010). Está integrado por 342 aminoácidos, con un peso molecular de 37,4 kDa. El alérgeno presenta homologías con enzimas pectin metilesterasas (PME). Las enzimas PMEs están implicadas en procesos de reproducción y de fertilidad masculina en polen. La prevalencia entre



diferentes poblaciones de individuos alérgicos fluctúa entre el 55.9% y el 75.6%.

1.6.6 Polimorfismo en los alérgenos del polen de olivo

Los estudios realizados para caracterizar las proteínas alergénicas del polen de olivo muestran que el polimorfismo está presente en una gran parte de estos alérgenos. En este contexto, observamos que Ole e 1 presenta un amplio polimorfismo, tanto en su secuencia nucleotídica como aminoacídica (Hamman Khalifa 2008; Lombardero *et al.* 1994; Villalba *et al.* 1993; Villalba *et al.* 1994), así como una amplia diversidad generada por los componentes de las cadenas oligosacáridicas (Castro *et al.* 2010a). También se ha descrito la presencia de heterogeneidades en la secuencia de Ole e 2 (Asturias *et al.* 1997; Jiménez López 2008; Martínez *et al.* 2002), de Ole e 5 (Alché *et al.* 1998; Boluda *et al.* 1998; Zafra 2007), Ole e 7 (Tejera *et al.* 1999), y Ole e 9 (Huecas *et al.* 2001). Los polimorfismos de Ole e 9 pueden ser atribuidos a la presencia de microheterogeneidades en la cadena peptídica y/o en la cadena oligosacáridica del alérgeno, que presenta dos posibles sitios de N-glicosilación, tal como ocurre con Ole e 1.

El amplio polimorfismo en los alérgenos se evidencia aún más entre diferentes cultivares de olivo. Los estudios de caracterización de secuencias de cDNA de Ole e 1 en un pequeño número de cultivares han mostrado la existencia de un alto número de microheterogeneidades entre cultivares, mientras que la variabilidad intra-cultivar fue mucho menor (Hamman Khalifa 2008).

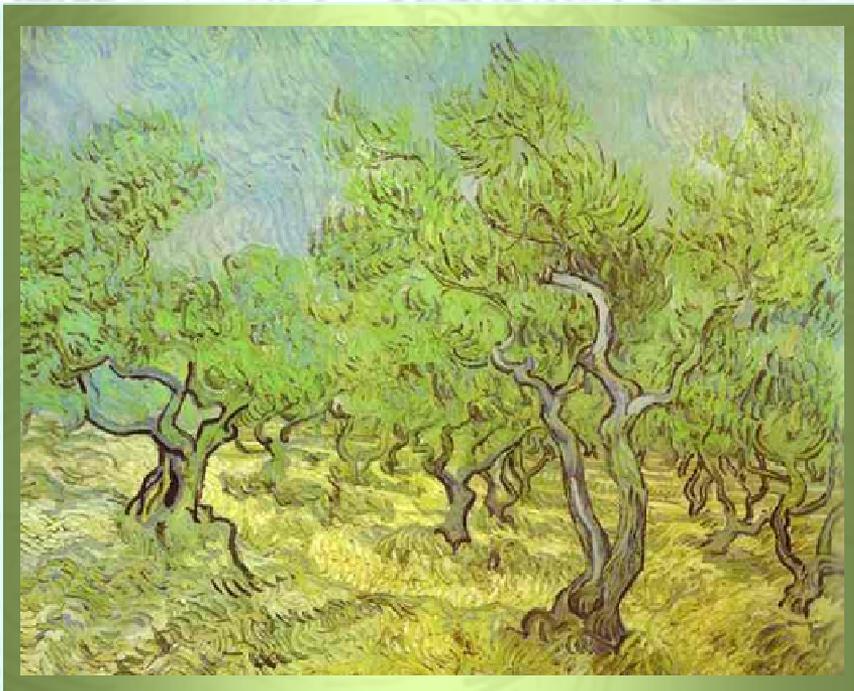
Los estudios de heterogeneidad en la secuencia de los alérgenos, y la caracterización de los niveles de expresión en diferentes cultivares se han comenzado a extender a diversos alérgenos, tales como Ole e 2, Ole e 3, Ole e 5, y Ole e 6, que han sido analizados en un pequeño número de cultivares, dando como resultado la presencia de diferencias significativas (Alché *et al.* 2003; Hamman Khalifa 2005; Jiménez López 2008).

Napoli y colaboradores han obtenido idénticos resultados, mostrando diferencias significativas en la composición alergénica de un pequeño número de extractos de polen de olivo de diferentes cultivares analizados mediante espectrometría de masas (Napoli *et al.* 2006). Además de las diferencias cualitativas en la composición de alérgenos, varios estudios han descrito diferencias cuantitativas en la expresión de los alérgenos del polen entre diferentes variedades (Barber *et al.* 1990; Castro *et al.* 2003) y en la reactividad de los sueros frente a éstos

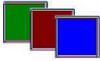


dependiendo del cultivar de olivo (Carnes Sanchez *et al.* 2002; Castro 2001; Conde Hernandez *et al.* 2002; Fernandez-Caldas *et al.* 2007; Geller-Bernstein *et al.* 1996; Waisel and Geller-Bernstein 1996). Estos estudios han permitido identificar a Ole e 1 como una de las principales causas de las diferencias observadas. Las diferencias se mantienen a lo largo de los años, sugiriendo que esta variabilidad es intrínseca a los cultivares (Fernandez-Caldas *et al.* 2007). Sin embargo, la implicación de otros alérgenos distintos a Ole e 1 puede ser excluída.

OBJETIVOS



Van Gogh. *Olive orchard*
Saint-Rémy: June-mid in month, 1889
Kröller-Müller Museum
Otterlo, Netherlands



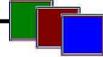
2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha consistido en la optimización de un sistema de detección múltiple de proteínas y su aplicación a inmunotransferencias, microscopía láser confocal y microscopía electrónica de transmisión. Mediante este sistema se han determinado simultáneamente cuatro alérgenos de polen de olivo y sus isoformas. La aproximación a la función de estos alérgenos en el grano de polen se ha realizado mediante la relación entre estos alérgenos con diversos parámetros de la biología del grano de polen y su distribución espacial. Además, se ha observado la incidencia de parámetros de la biología del cultivar y variables climatológicas sobre la expresión de los alérgenos. Los resultados propuestos podrían mejorar la reproducción sexual del olivo, la productividad del olivar y contribuir a la prevención, diagnóstico y terapia de la alergia al polen de olivo.

Los objetivos específicos en esta tesis se detallan a continuación:

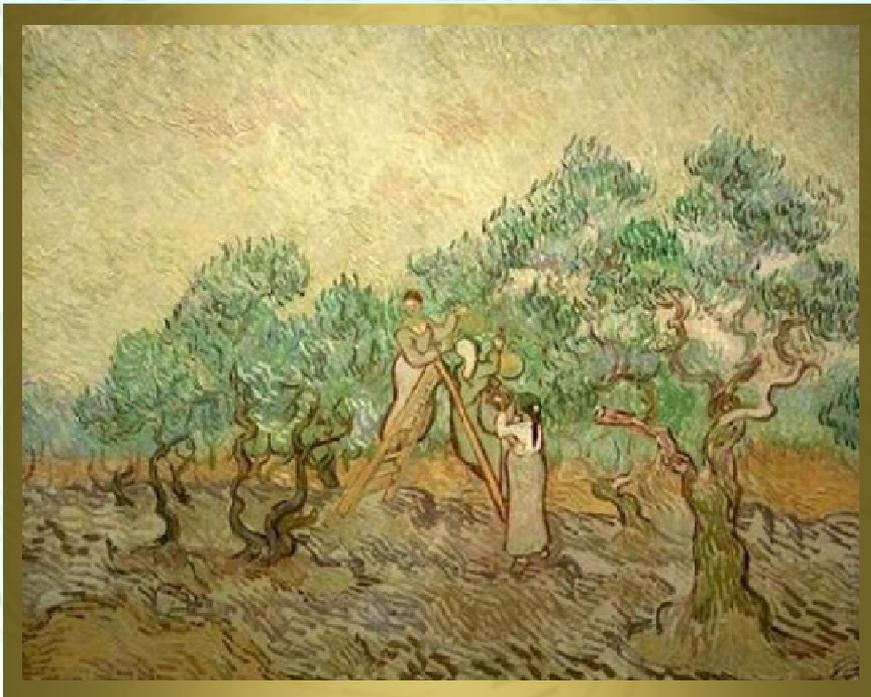
- 1) Desarrollo y optimización de un sistema analítico y cuantitativo de detección multiplex de alérgenos del polen de olivo, basado en un sistema de inmunolocalización con anticuerpos de la misma o de diferentes especies y revelado mediante métodos de fluorescencia.
- 2) Utilización del sistema desarrollado para caracterizar el polimorfismo alérgico a lo largo de una amplia representación del germoplasma de esta especie y estudiar su relación con parámetros de la biología del grano de polen y del cultivar.
- 3) Analizar la expresión de los alérgenos en siete cultivares durante diversos años y estudiar la implicación de factores ambientales.
- 4) Analizar la expresión de estos alérgenos en la variedad de referencia Picual durante el proceso de germinación *in vitro*, así como la cinética de liberación de proteínas alérgicas al medio de cultivo.
- 5) Aplicaciones clínicas prácticas. Determinación de la antigenicidad y alergenidad de extractos comerciales procedentes de distintos cultivares. Agrupación del amplio germoplasma analizado, de acuerdo a los niveles de alérgenos en cada una de las variedades, con el fin de simplificar los test de vacunas estandarizados y diagnosticar de forma personalizada a los pacientes alérgicos a polen de olivo.

Objetivos

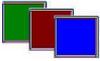


6) Aplicación del sistema multiplex a la localización simultánea de alérgenos a nivel celular, mediante microscopía confocal sobre el grano de polen de olivo durante su germinación, y adaptación del método para microscopía electrónica.

MATERIAL Y MÉTODOS



Van Gogh. *Olive picking*
Saint-Rémy: December, 1889
National Gallery of Art
Washington D.C., United States of America



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Polen maduro

La presente investigación comienza con la recolección de polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) al final de cada periodo de floración (meses de mayo y junio). El material procedente de 52 variedades y 5 cruzamientos fue recolectado entre los años 2000 y 2007. En la tabla 3 aparecen los datos concernientes al origen de recolección de cada variedad y cruzamientos utilizados para este estudio. Así mismo, se indica la denominación de las variedades españolas (Barranco D. 2005) subdivididas en principales, secundarias, difundidas y locales. Los datos del origen de cada cultivar de olivo, tanto los originarios de España, como de otros países de la cuenca mediterránea, proceden del COI (Consejo Oleícola Internacional, <http://www.coi.org/>).

Se utilizaron dos métodos de recolección: el método por aspiración directa de polen a partir de las inflorescencias, y el método basado en introducir las inflorescencias dentro de bolsas de papel. En este último, se retiran las bolsas pasados de 3 a 5 días. En ambos casos, el material obtenido fue filtrado a través de tamices de 150 μm y posteriormente, de 50 μm , con objeto de eliminar restos vegetales (hojas, pétalos, anteras, etc...). A continuación, el polen tamizado fue congelado en nitrógeno líquido y preservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.1.2 Extractos proteícos liofilizados de polen de olivo

La empresa Inmunal S.A.U. suministró diversos extractos liofilizados de polen de olivo, entre los que figuran extractos de *Olea europaea* L. (genérico, sin origen varietal establecido), así como extractos univarietales de polen de olivo de las variedades Picual, Arbequina, Cornicabra, Verdial de Vélez-Málaga y Lechín de Sevilla.

3.1.3 Sueros de pacientes alérgicos a olivo

Los sueros de ocho pacientes alérgicos al polen de olivo fueron amablemente cedidos por el Dr. Fernando Florido, de la Unidad de alergología del servicio de alergia del Hospital Clínico San Cecilio, en



Tabla 3. Variedades y cruzamientos de olivo en los que se basa el estudio. Colección de la que procede cada variedad: BGMO (Banco mundial de germoplasma de olivo del CIFA “Alameda del Obispo”, Junta de Andalucía, Córdoba); BGOJ (Banco de germoplasma de olivo del CIFA “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, Jaén); MCO (Museo de la cultura del olivo, Baeza, Jaén); GUE (Guéjar Sierra, Granada). *: Asignación numérica a las variedades.

Cultivar	Colección	Denominación	Origen	Clasificación*
Aceitera	BGMO		—	32
Cruzamiento 2-67	BGMO		—	38
Cruzamiento 8-7	BGMO			39
Híbrido 39-51	BGMO		—	10
Híbrido 40-52	BGMO		—	13
Híbrido 41-54	BGMO		—	14
Arbequina	BGMO	Principal	España	2
Blanqueta	BGMO	Principal	España	4
Changlot real	BGMO	Principal	España	40
Cornuculo de Jaén	MCO	Difundida	España	37
Cornicabra	BGOJ	Principal	España	5
Farga	MCO	Principal	España	43
Gordal de Sevilla	MCO	Principal	España	9
Hojiblanca	BGMO	Principal	España	15
Lechin de Granada	BGOJ	Principal	España	19
Lechin de Sevilla	BGOJ	Principal	España	20
Loaime	BGMO	Secundaria	España	21
Lucio	GUE	Secundaria	España	22
Macho de Jaén	BGOJ	Local	España	45
Manzanilla de Jaén	MCO	Difundida	España	46
Manzanilla de Sevilla	BGMO	Principal	España	23
Morisca	MCO	Principal	España	48
Morrut	BGMO	Principal	España	24
Negrillo de Estepa	BGMO	Difundida	España	49
Nevadillo negro	BGMO	Secundaria	España	50
Olivo macho	BGOJ	Local	España	51
Pajarcero	BGMO	Difundida	España	52
Picual	BGMO	Principal	España	12



(Continuación tabla 3):

Cultivar	Colección	Denominación	Origen	Clasificación ^a
Picudo	BGOJ	Principal	España	26
Sevillenca	MCO	Principal	España	27
Verdial de Alcaudete	MCO	Difundida	España	56
Verdial de Badajoz	BGOJ	Principal	España	57
Verdial de Huévar	BGMO	Principal	España	29
Verdial de Vélez	BGMO	Principal	España	30
Villalonga	MCO	Principal	España	31
Picholine	BGMO		Francia	53
Kalamon	BGMO		Grecia	17
Koroneiki	MCO		Grecia	44
Bella de España	BGMO		Italia	3
Caninese	BGMO		Italia	35
Coratina	MCO		Italia	36
Dolce agogia	BGMO		Italia	42
Frantoio	BGOJ		Italia	7
Leccino	MCO		Italia	18
Ouvo di piccione	BGMO		Italia	25
Rosciola	MCO		Italia	55
Ayrouni	BGMO		Líbano	34
Picholine marrocaíne	BGMO		Marruecos	54
Galego	BGMO	Difundida	Portugal	8
Sourani	MCO		Siria	28
Chetoui	BGOJ		Túnez	41
Meaky	BGOJ		Túnez	47
Aybalik	MCO		Turquía	33
Domat	BGMO		Turquía	6
Izmir sofralik	BGMO		Turquía	16
Acebuche	MCO	Var. Silvestre	Var. Silvestre	1

Granada. Todos los pacientes seleccionados tenían un historial clínico de rinitis y/o asma estacional durante los meses de abril a junio. Además, los pacientes fueron positivos en las pruebas de punción cutáneas (skin prick test, SPT) al extracto del polen de *Olea europaea* L. Las muestras fueron almacenadas individualmente a -80 °C hasta su



utilización. Se consideraron exclusivamente los pacientes que no habían estado sometidos a inmunoterapia frente al polen de olivo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos de análisis bioquímico

Germinación *in vitro* del polen de olivo

PROCEDIMIENTO:

1. Incubar el polen en cámara húmeda durante 30 min a 30 °C. Se utilizó polen de la variedad de referencia Picual (0,02 g/placa Petri).
2. Diluir el polen en 10 ml de medio de germinación (a) según el protocolo descrito por Mrani-Alaoui (Mrani-Alaoui 2000).
3. Mantener a 25 °C en oscuridad y tomar muestras de polen a diferentes tiempos de germinación, dependiendo del experimento.
4. Separar las fracciones de polen germinado y no germinado (en el caso de muestras germinadas durante 4 h o más) mediante filtros de 20 µm de diámetro. El polen filtrado por la malla, será el polen que no ha germinado. El medio de cultivo se separa del polen no germinado mediante una malla de 5 µm, en la que quedará retenido.

REACTIVOS

(a) Medio de germinación: sacarosa 10 % (p/v), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,03 % (p/v), KNO_3 0,01 % (p/v), MgSO_4 0,02 % (p/v), HBO_3 0,03 % (p/v), polietilenglicol (PEG) 10 % (p/v).

Extracción de proteínas totales de polen de olivo

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar 0,1 gr de polen en un recipiente de cristal. Resuspender en 1,5 ml de tampón de extracción (a). Agitar durante 4 h a 4 °C.
2. Clarificar el sobrenadante, mediante centrifugación a 4 °C y 12.000 r.p.m., durante 30 min, dos veces.
3. Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 20 µm y almacenar en alícuotas a -80 °C.



REACTIVOS:

(a) Tampón de extracción: Tris-HCl 40 mM pH 8,8; Tritón X-100 2% (v/v). Guardar a -20 °C. En el momento de uso, adicionar 10 µl de PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) 100 mM por ml de tampón utilizado.

(b) PMSF 100 mM: Preparar en isopropanol. Almacenar a -20 °C. El PMSF es un agente inhibidor de proteasas. Antes de usar, mantener a temperatura ambiente y disolver los cristales, formados durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

Precipitación de proteínas

PROCEDIMIENTO:

1. Precipitar las proteínas durante 1 h en 5 volúmenes de una solución de precipitación (a) enfriada a -20 °C.
2. Centrifugar a 12.000 r.p.m. a 4 °C durante 30 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado durante 15 min en acetona al 0,2 % de DTT (dithiothreitol), enfriada a -20 °C. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm. Repetir este lavado 3 veces.
4. Dejar secar a temperatura ambiente durante 5-10 min para que se evaporen los restos de acetona.
5. Resuspender el precipitado en tampón de extracción (b).

REACTIVOS:

(a) Solución de precipitación: ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) y DTT 0,2% (p/v) en acetona.

(b) Tampón de extracción: Tris-HCl 40 mM pH 8,8; Tritón X-100 2% (v/v). Guardar a -20 °C. En el momento de uso, adicionar 10 µl de PMSF 100 mM por cada ml de tampón utilizado.

Cuantificación proteica

PROCEDIMIENTO:

El procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas está basado en el método diseñado por Bradford (Bradford 1976):



1. Preparar una curva patrón con muestras de 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 μg de la proteína estándar (bovine serum albumin, BSA) a partir de una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y completar con agua destilada hasta un volumen de 800 μl .
2. Preparar la siguiente mezcla de cada una de las muestras que van a ser cuantificadas: 5 μl del extracto proteico y 795 μl de H_2O destilada.
3. Añadir 200 μl del colorante Bradford a cada muestra y mezclar invirtiendo los tubos.
4. Transcurridos un mínimo de 5 min, en un espectrofotómetro, medir la densidad óptica a 595 nm (DO_{595}) de los diferentes estándar de BSA para determinar la curva patrón. Posteriormente se miden volúmenes conocidos de la muestra. A partir de los valores de densidad óptica obtenidos para las diferentes muestras, se extrapolarán los valores de concentración.

REACTIVOS:

Colorante de Bradford (Bio-Rad, USA): guardar a 4 °C.

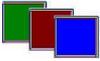
Solución de BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: almacenar a -20 °C.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

PROCEDIMIENTO

Las electroforesis se llevaron a cabo en un sistema discontinuo siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli 1970).

1. Preparar geles de poliacrilamida, según el ensayo a realizar, con gel separador al 12% o al 15 % (a) y gel concentrador al 4 % (b), utilizando un equipo de electroforesis Mini-Protean III o Maxiprotean (Bio-Rad, USA).
2. Preparar las muestras, mezclando 30 μg de proteína total con un tampón de carga 6x (c). Las muestras se sometieron a desnaturalización durante 5 min a 95 °C en un baño termostaticado.
3. Cargar dichas muestras y el marcador de peso molecular correspondiente (Ej. Kaleidoscope Polypeptide Standards, Bio-Rad; Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad; o ECL Plex Fluorescent Rainbow Markers, Amersham) en los pocillos.
4. La electroforesis se desarrolló en un tampón de Laemmli (d).



5. Conectar a fuente de voltaje constante (200 V) hasta el final de la carrera electroforética.

REACTIVOS

(a) Tampón del gel separador: Acrilamida 12% (p/v) ó 15% (p/v) (según ensayo), Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,10% (p/v), APS (ammonium persulfate) 0,055% (p/v), Temed (tetramethylethylenediamine) 0,05% (v/v).

(b) Tampón del gel concentrador: Acrilamida 4% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), APS 0,05 % (p/v) , Temed 0,1% (p/v).

(c) Tampón de carga 6x: Tris-ClH 0,15 M pH 6,8; SDS 12 % (p/v), glicerina 36 % (v/v), β -mercaptoetanol 6 % (v/v) y azul de bromofenol 0,03 % (p/v).

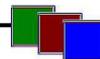
(d) Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v).

Tinción de geles SDS-PAGE con plata

PROCEDIMIENTO

La tinción con plata de los geles procesados mediante SDS-PAGE se realizó según el método de Rabilloud (Rabilloud *et al.* 1994):

1. Fijación: 1-12 h a temperatura ambiente en solución de fijación (a).
2. Sensibilización: 6 h a temperatura ambiente en solución de sensibilización (b) y protegido de la luz.
3. Lavados: 6 lavados de 20 min, cada uno con agua destilada.
4. Tinción: 1-2 h a temperatura ambiente en solución de tinción (c).
5. Lavados: un lavado de 10 segundos con agua destilada.
6. Revelado: 5-10 min a temperatura ambiente en solución de revelado (d).
7. Parada de la reacción: el revelado del gel se detiene con solución de parada de reacción (e) y se mantiene en dicha solución 1 h. Sustituir por agua destilada.



REACTIVOS:

- (a) Solución de fijación: Etanol 30 % (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).
- (b) Solución de sensibilización: Etanol 20 % (v/v), acetato potásico 4,9 % (p/v), tetrationato potásico 0,3 % (p/v), glutaraldehído 0,5 % (p/v).
- (c) Solución de tinción: nitrato de plata 0.2 % (p/v), formaldehído 0,026% (v/v).
- (d) Solución de desarrollo: carbonato potásico 3% (p/v), formaldehído 0,0185 % (v/v), tiosulfato sódico pentahidratado 0,00124 % (p/v).
- (e) Solución de parada: Tris-base 3 % (p/v), ácido acético glacial 2,5 % (v/v).

Tinción de geles SDS-PAGE con azul Coomassie

La tinción con azul de Coomassie de los geles procesados mediante SDS-PAGE se realizó según el siguiente protocolo:

PROCEDIMIENTO:

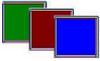
1. Teñir el gel en una solución de tinción (a) durante 6 h en agitación.
2. Lavar con agua destilada.
3. Desteñir el gel con una solución de destinción (b) en agitación para eliminar el exceso de colorante.

REACTIVOS:

- (a) Solución de tinción: ácido acético 10 % (v/v), metanol 25 % (v/v), azul coomassie 0.1% (p/v).
- (b) Solución de destinción: etanol al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v).

Transferencia electroforética de geles a membranas

El sistema de transferencia para geles procesados mediante SDS-PAGE fue llevado a cabo mediante un sistema semiseco (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.



PROCEDIMIENTO:

1. Equilibrar el gel de poliacrilamida en tampón de transferencia (a) durante 30 min.
2. Pretratamiento de la membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride, Biotrace 0,45 mm, PALL): Hidratar la membrana con metanol durante 10 segundos. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
3. Equilibrar la membrana en tampón de transferencia (a) durante 10 minutos.
4. Desarrollar la transferencia a 15 V, durante 30 min en el caso de geles realizados en Miniprotean. En el caso de geles realizados en Maxiprotean realizar la transferencia a 25 V durante 1 h
5. Una vez finalizada la transferencia, secar la membrana sobre papel secante, con el lado de las proteínas transferidas hacia arriba, y guardar a 4 °C hasta su posterior uso, o bien continuar con la inmunodetección.

REACTIVOS

- (a) Tampón de transferencia: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %.

Inmunodetección estándar sobre membrana

PROCEDIMIENTO:

1. Hidratar de nuevo la membrana de PVDF con metanol durante 10 segundos. Lavar con agua destilada durante 5 minutos. Equilibrar en agitación con tampón TBST (a) durante 5 minutos.
2. Bloquear la membrana con una solución de bloqueo (b) 1 h a temperatura ambiente en agitación.
3. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente (ó 12 h a 4 °C) con el anticuerpo primario correspondiente, o con sueros de pacientes alérgicos a polen de olivo (ver tabla 4) diluidos en la misma solución de bloqueo.
4. Lavar tres veces, durante 15 min con TBST (a).
5. Incubar durante 1 h a T^a ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (ver tabla 5), diluido en tampón TBST (a).



6. Lavar la membrana con tampón TBST tres veces, durante 15 min a T^a ambiente.

7. Detectar la señal mediante un sistema compatible con el anticuerpo secundario utilizado.

REACTIVOS

(a) TBST: Tris-ClH 10 mM pH 7,4, cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,3 % (v/v).

(b) Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 10 % (p/v) en tampón TBST.

Nota:

Anti-Ole e 1 (10H1) fue cedido por el Dr. Carlos Lahoz, Fundación Jiménez Díaz, Madrid (Lauzurica *et al.* 1988).

Anti-Ole e 2: antisuero policlonal desarrollado en conejo frente al fragmento aminoacídico AQSATFPQFKPEEM de la proteína Ole e 2 de olivo (Morales *et al.* 2008).

El anticuerpo comercial utilizado para localizar Ole e 5 (Rabbit anti-Cu/Zn SOD, Agrisera) se hizo contra la Cu/Zn SOD cloroplastídica de *A. Thaliana*.

Anti-Ole e 9: antisuero policlonal desarrollado en conejo frente al fragmento aminoacídico YPYFAYKNQPTPDT de la proteína Ole e 9 de olivo (Genosphere).

Tabla 4. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunodetección de proteínas sobre membrana.

Anticuerpo Primario	Dilución
Monoclonal (ratón) Anti-Ole e 1 (10 H1)	1:20.000
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 2	1:20.000
Policlonal (conejo) Anti-CuZnSOD (Agrisera)	1:500
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 9 (N-terminal)	1:10.000
Sueros de pacientes alérgicos a polen de olivo	1:10



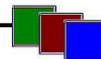
Tabla 5. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunodetección de proteínas sobre membrana.

Anticuerpo Secundario	Dilución
Anti-IgG de ratón (cabra) conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)	1:10.000
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con Alexa Fluor 633 (Molecular Probes)	1:10.000
Fab Anti-IgG de conejo (burro) conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:10.000
Fab Anti-IgG de conejo (burro) no conjugado con fluorocromo (Jackson ImmunoResearch)	1:200
Anti-IgE humana (cabra), conjugado con peroxidasa (Sigma)	1:10.000

Inmunodetección multiplex sobre membrana con anticuerpos de la misma especie

PROCEDIMIENTO:

1. Hidratar de nuevo la membrana de PVDF con metanol durante 10 segundos. Lavar con agua destilada durante 5 minutos. Equilibrar en agitación con TBST (a) durante 5 minutos.
2. Bloquear la membrana con una solución de bloqueo (b) durante 1 h, a temperatura ambiente, en agitación.
3. Incubar simultáneamente durante 1 h a temperatura ambiente (o 12 h a 4 °C) con dos anticuerpos primarios procedentes de diferentes especies (ej. anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 10H1 (ratón) y anticuerpo policlonal anti-Ole e 2 (conejo)) diluidos en la misma solución de bloqueo (ver tabla 4).
4. Lavar tres veces durante 15 min con TBST.
5. Incubar durante 1 h a T^a ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con fluorocromos (ver tabla 5), diluidos en tampón TBST. Éstos han de presentar longitudes de onda de emisión no solapantes (ej. Anti-IgG de ratón (cabra) conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) y Anti-IgG (fragmentos Fab) de



conejo (burro) conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) para detectar Ole e 1 y Ole e 2, respectivamente.

Nota: El anticuerpo secundario (fragmentos Fab Anti-IgG- de conejo (burro) conjugados con Cy3) utilizado para la detección del anticuerpo primario (anti-Ole e 2 de conejo) ha de ser un fragmento Fab, para evitar el enlace con primarios de la segunda ronda de detección (anti-Ole e 5 de conejo).

6. Lavar la membrana con tampón TBST, tres veces, durante 15 min a T^a ambiente.

7. Incubar durante 2 h a temperatura ambiente (ó 12 h a 4 °C) con fragmentos Fab anti-IgG sin conjugar con fluorocromos (ver tabla 5) de la especie a bloquear (en este caso usamos fragmentos Fab anti-IgG de conejo, para bloquear el anticuerpo policlonal anti-Ole e 2 (conejo) ensayado anteriormente). Los fragmentos Fab (ej. Anti-conejo) enlazan con la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) del anticuerpo primario utilizado previamente (ej. procedente conejo), bloqueando la unión de otros anticuerpos secundarios (ej. procedentes de conejo) en los experimentos donde se emplean múltiples anticuerpos procedentes de la misma especie (conejo).

8. Lavar la membrana con tampón TBST, tres veces, durante 15 min a T^a ambiente.

9. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente (ó 12 h a 4 °C) la membrana en una solución de bloqueo con un anticuerpo primario de la misma especie bloqueada previamente. En nuestro caso, se realizaron ensayos con dos anticuerpos simultáneamente (anti-Ole e 5 (conejo) y anti-Ole e 9 (conejo), ya que la diferencia de peso molecular permitió la diferenciación entre las proteínas Ole e 5 y Ole e 9.

10. Lavar la membrana con tampón TBST tres veces durante 15 min a T^a ambiente.

11. Incubar, durante 1 h a T^a ambiente, con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en tampón TBST. Este anticuerpo (ej. Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con Alexa Fluor 633), debe estar conjugado con un fluorocromo de longitud de onda de emisión no solapante (figura 6) con los utilizados anteriormente.

13. Dejar secar la membrana.

14. Detectar la señal emitida por los diferentes fluorocromos con un equipo de escáner que tenga acoplado láseres de excitación adecuados y filtros para detectar específicamente la emisión de los fluorocromos (Pharos FX Plus Molecular Imager, Bio-Rad).



REACTIVOS

(a) TBST: Tris-ClH 10 mM, pH 7,4; cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,3 % (v/v).

(b) Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 10 % (p/v) en tampón TBST.

La figura 6 muestra con flechas la longitud de onda de excitación correspondiente a los tres láseres disponibles en el sistema de escáner utilizado (láser 488, 532 y 633). Así mismo, ilustra la posición de los picos de máxima excitación y emisión para cada anticuerpo conjugado a un fluorocromo:

Verde: Espectro fluorescente de absorción y emisión del anticuerpo anti-IgG de ratón (cabra) conjugado con Alexa Fluor 488. Presenta un pico de excitación a 495 nm y un pico de emisión a 519 nm.

Rojo: Espectro fluorescente de absorción y emisión del fragmento Fab anti-IgG de conejo (burro) conjugado con Cy3. Presenta un pico de excitación a 550 nm, y un pico de emisión a 570 nm.

Azul: Espectro fluorescente de absorción y emisión del anticuerpo anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con Alexa Fluor 633. Presenta un pico de excitación a 632 nm, y un pico de emisión a 647 nm.

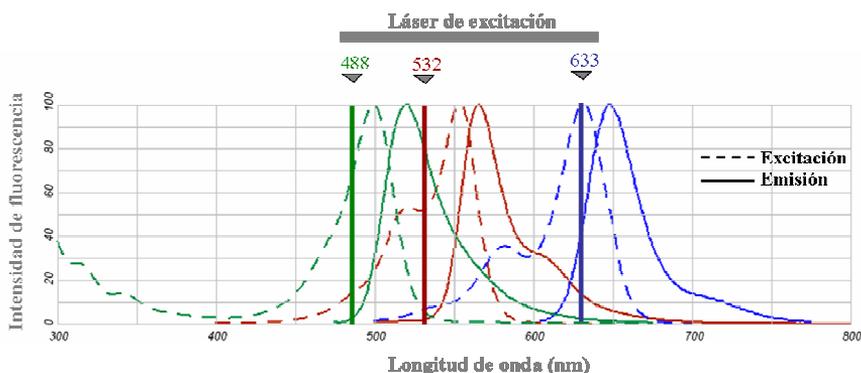
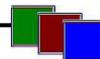


Figura 6. Espectro de excitación y emisión de los anticuerpos conjugados a los fluorocromos ensayados.



Revelado de actividad peroxidasa

PROCEDIMIENTO:

1. Tras incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ver tabla 5), lavar la membrana con TBST 3 veces, durante 10 min a temperatura ambiente.
2. La detección con quimioluminiscencia se llevó a cabo mediante el empleo del reactivo Immun-Star™ WesternCTM (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

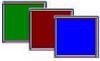
Documentación de geles y membranas

PROCEDIMIENTO:

Para la detección de la quimioluminiscencia se empleó el ChemiDoc XRS Molecular Imager (Bio-Rad).

La lectura de geles SDS-PAGE con tinción de Coomassie o plata se realizó mediante el equipo (Pharos FX Plus Molecular Imager, Bio-Rad) en el modo de luz visible y seleccionando la tinción correspondiente.

Las medidas de fluorescencia se realiza escaneando la membrana, después de la inmunodetección, con un equipo (Pharos FX Plus Molecular Imager, Bio-Rad) dotado de láseres (488, 532 y 635 nm), para excitar y los filtros 530 BP 40, 605 DF 50 y 695 DF para detectar y evitar el solapamiento entre las diferentes emisiones de los fluorocromos conjugados a anticuerpos secundarios (figura 6). En el caso de utilizar distintos fluorocromos, se realiza un escaneo secuencial con los láseres adecuados, que dará como resultado una imagen por cada canal de emisión. Después se realizará un procesamiento de los datos con el software Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad, U.S.A.). En el caso de inmunodetección múltiple de proteínas, permite solapar las imágenes de los tres canales de emisión con la función multicanal.



3.2.2 Métodos de análisis celular

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

PROCEDIMIENTO:

1. Tras la germinación de polen, se toma la muestra en el estadio de germinación de interés, y se adiciona el mismo volumen de solución de fijación (a) que el volumen de muestra, aplicando 1 h de vacío.
2. Eliminar la solución de fijación y lavar tres veces durante 5 minutos con tampón de lavado (b).
3. Deshidratar la muestra mediante cambios sucesivos en:
 - Etanol 30 % a 4 °C durante 1 h,
 - Etanol 50 % a 4 °C durante 1 h,
 - Etanol 70 % a -20 °C durante 12 h,
 - Etanol 90 % a -20 °C durante 6 h,
 - Etanol 100% a -20 °C durante 4 días (renovando la solución transcurridos 2 días).
- 4 Adicionar etanol 100 % y Unicryl (BioCell International) en proporción 1:1 y mantener durante dos días a -20 °C. Repetir el proceso renovando la solución.
5. Sustituir la solución de infiltración por Unicryl puro, y dejarla actuar durante una semana a -20 °C. Repetir la sustitución durante 24 h.
6. Introducir una pequeña cantidad de muestra en cápsulas de gelatina, rellenas previamente con Unicryl y polimerizar con luz UV a -20 °C durante tres días.
7. Recubrir con una fina película de Formvar (c) rejillas de níquel de 300 agujeros. Secar a temperatura ambiente.
8. Obtener secciones ultrafinas (80 nm de grosor) de la muestra incluida y previamente polimerizada en unycril con un ultramicrotomo (Reichert-Jung) y depositarlas sobre las rejillas.



REACTIVOS

(a) Fijador: paraformaldehído 3,7 % (p/v), glutaraldehído 0,1 % (v/v) en tampón MTSB pH 6,9.

(b) Tampón MTSB: ácido sulfónico 1,4-piperazina dietano (PIPES) 50 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mM, ácido etilen glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N,N-tetraacético (EGTA) 5 mM. Ajustar a pH 6,9 con KOH.

(c) Formvar al 0,3 % (p/v) en cloroformo.

Inmunolocalización convencional de proteínas a TEM

PROCEDIMIENTO:

1. Bloquear los sitios de unión inespecíficos incubando las rejillas durante 2,5 h en una solución de bloqueo (a).
2. Lavar con tampón PBS (b) durante 10 minutos.
3. Incubar las secciones con el anticuerpo primario de interés (tabla 6), diluido en solución de bloqueo, durante 2 h a temperatura ambiente.
4. Lavar las rejillas con PBS, 5 veces, durante 5 min cada vez.
5. Incubar las secciones con un anticuerpo secundario (tabla 7), conjugado con oro, durante 2 h a temperatura ambiente.
6. Lavar las rejillas con PBS 5 veces, durante 5 min cada vez.
7. Lavar las rejillas en H_2O bidestilada 3 veces, durante 5 min cada vez.
8. Secar las rejillas a temperatura ambiente.
9. Teñir los cortes con una solución de acetato de uranilo 5 % (p/v) durante 20 min y en oscuridad.
10. Lavar las rejillas en H_2O bidestilada 10 veces durante 3 min cada vez. Dejar secar a temperatura ambiente.
11. Observar los resultados en un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1011, JEOL).

Nota:

Controles Negativos: El tratamiento para las secciones de controles negativos es el mismo, exceptuando la omisión de la incubación con el anticuerpo primario.



REACTIVOS:

- (a) Solución de bloqueo: BSA al 5 % (p/v) en PBS.
- (b) Tampón PBS: 140 mM ClNa, 2,7 mM ClK, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,2

Tabla 6. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y múltiple de proteínas a TEM.

Anticuerpo Primario	Dilución
Monoclonal (ratón) Anti-Ole e 1 (10 H1)	1:10
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 2	1:20
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 9 (N-terminal)	1:15
Sueros de pacientes alérgicos a polen de olivo	1:2
Monoclonal (ratón) Anti-actina (MP Biomedicals)	1:15
Suero preinmune de conejo. IgG inespecífica (Sigma)	1:15

Tabla 7. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y multiplex de proteínas a TEM.

Anticuerpo Secundario	Dilución
Anti-IgG de ratón (cabra) conjugado con oro 20nm (BB International)	1:100
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con oro 40 nm (Emgar)	1:50
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con oro 30nm (Emgar)	1:100
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con oro 15 nm (BB International)	1:100
Fab Anti-IgG de conejo (burro) no conjugado con fluorocromo (Jackson ImmunoResearch)	1:2

Inmunolocalización múltiple con anticuerpos de la misma especie a TEM

PROCEDIMIENTO:

1. Seguir el protocolo descrito para inmunolocalización convencional de proteínas a TEM (paso 1-7), a excepción de que se incubarán simultáneamente dos anticuerpos primarios de diferentes especies, así



como los anticuerpos secundarios correspondientes a las especies ensayadas, conjugados con oro de diferente tamaño, para poder visualizarlos por separado.

2. Incubar 2,5 h a temperatura ambiente, en una solución sin diluir, con fragmentos Fab anti-IgG (tabla 5) de la misma especie que el anticuerpo primario a bloquear, permitiendo así la localización posterior de otra proteína con un anticuerpo de la misma especie que el anticuerpo que se ha bloqueado.
3. Lavar con tampón PBS durante 10 minutos.
4. Incubar con suero preinmune (procedente de la especie que se desea bloquear) al 5% en PBS durante 45 minutos.
5. Lavar con tampón PBS durante 10 minutos.
6. Incubar las secciones con otro anticuerpo primario de interés, diluido en solución de bloqueo, durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo primario ha de ser de la misma especie bloqueada con Fab (a no ser que se disponga de anticuerpos de diferentes especies, con lo que no sería necesario el bloqueo con Fab y el suero preinmune).
7. Seguir el protocolo de inmunolocalización convencional de proteínas a TEM, desde el paso 5, hasta el final. La detección de esta segunda ronda de anticuerpos se realiza utilizando un anticuerpo secundario adecuado, conjugado con oro de diferente tamaño a los utilizados anteriormente.

Procesamiento convencional para inmunolocalización a microscopía confocal (CLSM)

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar las muestras de polen en el estadio de germinación de interés, a 4 °C durante 30 min en una solución de fijación (a).
2. Lavar 3 veces, durante 10 min cada vez, en solución de lavado (b).
3. Permeabilizar con acetona fría (-20 °C) durante 5 minutos.
4. Lavar 3 veces, durante 10 min cada vez, en solución de lavado (b).
5. Incubar con solución de bloqueo (c) durante 20 minutos.
6. Lavar 3 veces, durante 10 min cada vez, en solución de lavado (b).



REACTIVOS:

- (a) Solución de fijación: 4% (p/v) paraformaldehído, 0,1% glutaraldehído en tampón MTSB (ácido sulfónico 1,4-piperazina dietano (PIPES) 50 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mM, ácido etilen-glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N,N_-tetraacético (EGTA) 5 mM). Ajustar a pH 6,9 con KOH.
- (b) Solución de lavado: 0,1 % Triton X-100 en tampón MTSB.
- (c) Solución de bloqueo: 2% BSA en solución de lavado.

Inmunolocalización convencional para CLSM

PROCEDIMIENTO:

1. Incubar la muestra, después de su procesado, con una solución de bloqueo durante 1 h, a temperatura ambiente.
2. Incubar con el anticuerpo primario (ver tabla 8), durante 12 h a 4 °C, diluido en solución de bloqueo (b).
3. Lavar 3 veces, 10 min cada vez, en solución de lavado (a).
4. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con un fluorocromo (ver tabla 9) diluido en solución de bloqueo, durante 2,5 h. Mantener a partir de este momento en oscuridad.
5. Lavar 3 veces, 10 min cada vez, en solución de lavado (a).
6. Lavar en tampón MTSB 2 veces, durante 2 min cada vez.
7. Finalmente, resuspender las muestras en una solución que evita la pérdida de fluorescencia (CITIFLUOR/Glicerol/PBS, Sigma).
8. Observar en un microscopio laser confocal (Nikon C1) equipado con tres láseres, utilizando el adecuado según el fluorocromo ensayado (Ar-488 para fluorocromo Alexa 488, He/Ne-543 para fluorocromo Cy3 y He/Ne-633 para fluorocromo Alexa 633) y un conjunto de filtros de paso de luz (Nikon). El montaje de las secciones en el eje Z tomadas se procesan con el software del equipo (EZ-C1 Gold versión 2.10 build 240, Nikon).

REACTIVOS:

- (a) Solución de lavado: 0,1 % Triton X-100 en tampón MTSB (ácido sulfónico 1,4-piperazina dietano (PIPES) 50 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mM,



ácido etilen glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N,N_-tetraacético (EGTA) 5 mM). Ajustar a pH 6,9 con KOH).

(b) Solución de bloque: 2% BSA en solución de lavado.

Tabla 8. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y multiplex de proteínas a CLSM

Anticuerpo Primario	Dilución
Monoclonal (ratón) Anti-Ole e 1 (10 H1)	1:10
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 2	1:10
Policlonal (conejo) Anti-Ole e 9 (N-terminal)	1:10
Monoclonal (ratón) Anti-actina (MP Biomedicals)	1:5

Tabla 9. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y multiplex de proteínas a CLSM

Anticuerpo Secundario	Dilución
Anti-IgG de ratón (cabra) conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)	1:100
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con Alexa Fluor 633 (Molecular Probes)	1:100
Fab Anti-IgG de conejo (burro) conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:100
Anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con Cy3 (Sigma)	1:100

Procesamiento de alta permeabilización para inmunolocalización a CLSM.

El actual protocolo está basado en procedimientos descritos previamente (Friml *et al.* 2003; Szechynska-Hebda *et al.* 2006), con algunas modificaciones (Morales *et al.* 2008).

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar las muestras de polen en el estadio de germinación de interés, a 4 °C durante 5 min con una solución de fijación al 2% de PF (a). Repetir la fijación con una solución de fijación al 4% de PF (a).



2. Lavar 3 veces, durante 10 min cada vez, en solución de lavado (b).
3. Equilibrar las muestras en solución de equilibrado (c) durante 10 minutos. Repetir 2 veces.
4. Digerir la pared celular del polen con 2% (p/v) de driselasa, 6% (p/v) pectinasa y 4% (p/v) celulasa en solución de equilibrado (c) durante 1h a 50 °C.
5. Lavar con solución de lavado 5 veces, durante 10 min cada vez.
6. Incubar en 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) y 3% de NP-40 in MTSB durante 50 min a temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces durante 10 min cada vez en solución de lavado (b).
8. Realizar una postfijación con una solución de fijación al 4% de PF durante 15 minutos.
9. Lavar 3 veces, durante 10 min cada vez, en solución de lavado (b).

REACTIVOS:

- (a) Solución de fijación: Paraformaldehído (PF) en MTSB (ácido sulfónico 1,4-piperazina dietano (PIPES) 50 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mM, ácido etilen glicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N,N-tetraacético (EGTA) 5 mM). Ajustar a pH 6,9 con KOH.
- (b) Solución de lavado: 0,1 % Triton X-100 en tampón MTSB pH 6,9.
- (c) Solución de equilibrado: MTSB pH 4,5; 0,1% Triton X-100.

Inmunolocalización multiplex para CLSM.

PROCEDIMIENTO:

1. Tras el procesamiento convencional o el de alta permeabilización de muestras de polen, seguir el protocolo descrito, para inmunolocalización convencional de proteínas a CLSM (paso 1-5), a excepción de que se incubarán simultáneamente dos anticuerpos primarios de diferentes especies (tabla 8), así como los anticuerpos secundarios correspondientes a las especies ensayadas (tabla 9), conjugados con fluorocromos de diferente longitud de onda de excitación (ver figura 6), para poder visualizarlos por separado.
2. Incubar 20 min a temperatura ambiente, con fragmentos Fab anti-IgG (tabla 5) de la misma especie que el anticuerpo primario a bloquear, permitiendo así la localización posterior de otra proteína con



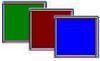
un anticuerpo de la misma especie que se ha bloqueado. La dilución se lleva a cabo en una proporción 1:2 en tampón MTSB.

3. Lavar con tampón MTSB durante 10 minutos.
4. Incubar con un anticuerpo primario de interés (tabla 8), diluido en solución de bloqueo durante 12 h a 4 °C. En este caso, se incubarán anticuerpos primarios de la misma especie animal utilizada en la primera ronda de incubación de anticuerpos primarios. El anticuerpo primario ha de ser contra un antígeno (o epítopo) diferente al detectado previamente y de la misma especie bloqueada con Fab.
5. Lavar con tampón MTSB durante 10 minutos.
6. La detección de este último anticuerpo ensayado se realiza en las mismas condiciones que los anticuerpos secundarios previamente ensayados, utilizando un anticuerpo secundario apropiado (tabla 9), conjugado con un fluorocromo de diferente longitud de onda de excitación de los utilizados anteriormente.

3.2.3 Métodos de análisis estadístico

PROCEDIMIENTO:

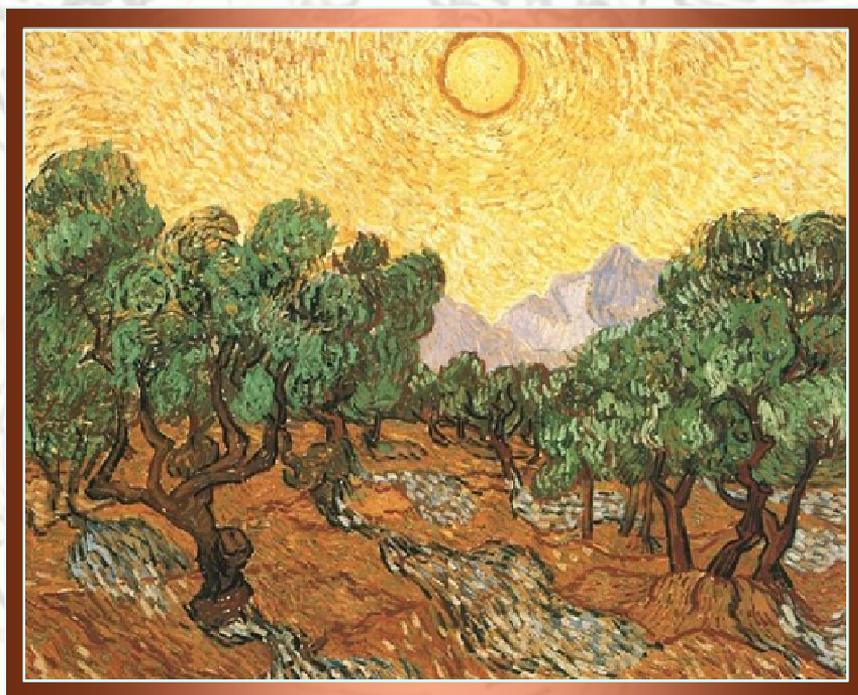
1. Las variables continuas se sometieron al estudio de la distribución de normalidad mediante el test Kolmorov-Smirnov. El estudio de la homocedasticidad o igualdad de varianzas se llevó a cabo mediante el test de Levene.
2. Las asociaciones entre variables continuas se describieron mediante los coeficientes de correlación de Pearson (distribución normal) o Spearman (distribución no normal). Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.
3. Las comparaciones de medias de variables continuas para tres o más grupos se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis (las variables estudiadas no siguieron una distribución normal). Las comparaciones de medias entre dos grupos se realizaron mediante el test de Mann-Whitney (las variables estudiadas no siguieron una distribución normal). Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.
4. Los datos de variables continuas se presentaron como $\text{media} \pm \text{desviación estándar}$. La representación en diagrama de caja correspondiente a datos ordinales, muestra la mediana como una línea horizontal en la caja, el primer y cuarto cuartil como líneas



horizontales en la base y en la zona superior de la caja, respectivamente. El percentil 10 y 90 se muestra en corchetes. Las representaciones en diagramas de cajas y el estudio estadístico se realizaron con el software SPSS 15.0. Las representaciones de valores ordinales en gráficos de barras y puntos conectados por líneas se llevaron a cabo con el software Grahpad Prism 5.02.

}

RESULTADOS



Van Gogh. *Olive trees with yellow sky and sun*
Saint-Rémy: November, 1889
The Minneapolis Institute of Arts
Minneapolis, Minnesota, United States of America



4.1 Desarrollo y optimización de un sistema analítico y cuantitativo de detección multiplex de alérgenos del polen de olivo, basado en un sistema de inmunolocalización con anticuerpos de la misma o de diferentes especies y revelado mediante métodos de fluorescencia.

Se ha desarrollado un método multiplex de 5 pasos (Figura 7), que detecta simultáneamente 4 proteínas alérgicas, llamadas Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en Western blots. Las dianas y anticuerpos usados para ello se resumen en la tabla 10.

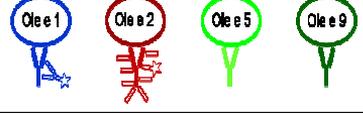
Paso 1	Incubación simultánea con los anticuerpos primarios anti-Ole e 1 (ratón) y anti-Ole e 2 (conejo)	
Paso 2	Incubación simultánea con los anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 conjugados con IgG anti-ratón (cabra) y Cy3 conjugado con fragmentos Fab de IgG anti-conejo (burro)	
Paso 3	Incubación con fragmentos Fab de IgG anti-conejo (burro)	
Paso 4	Incubación con los anticuerpos primarios anti-Ole e 9 (conejo) y anti-Cu/Zn SOD (conejo)	
Paso 5	Incubación con Alexa fluor 633 conjugado con anticuerpo IgG anti-conejo (cabra)	
<ul style="list-style-type: none">  Anti-Ole e 1 de olivo (ratón)  Anti-Ole e 2 de olivo (conejo)  Anti-Cu/Zn SOD cloroplastica de <i>Arabidopsis</i> (conejo)  Anti-N-terminal de Ole e 9 de olivo (conejo)  IgG (H+L) anti-ratón (cabra), conjugado con Alexa fluor 488  IgG (H+L) anti-conejo (cabra), conjugado con Alexa fluor 633  IgG (fragmento Fab) anti-conejo (burro), conjugado con Cy3  IgG (fragmento Fab) anti-conejo (burro) 		

Figura 7. Organigrama para la detección multiplex fluorescente de los alérgenos de polen de olivo Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en inmunotransferencias.

Con la finalidad de demostrar su especificidad, primero se ha ensayado cada anticuerpo de forma individual en blots que contienen extractos proteicos totales de proteínas de polen procedentes del cultivar de olivo Picual (Figura 8, calles 2-5). La imagen muestra que el anticuerpo



anti-Ole e 1 reconoce principalmente 2 isoformas, de aproximadamente 18,4 y 20 kDa, las cuales corresponden a las isoformas no glicosilada y a la monoglicosilada del alérgeno, respectivamente. La banda de 22 kDa, correspondiente a la variante poli-glicosilada, aparece de forma muy débil.

Tabla 10. Dianas y anticuerpos usados para el procedimiento de detección multiplex en experimentos de Western blot

Diana	Anticuerpo primario (especie de origen)	Anticuerpo secundario (especie de origen)
Ole e 1	Anti-Ole e 1 de olivo (ratón)	IgG (H+L) anti-ratón (cabra), conjugado con Alexa fluor 488
Ole e 2 (profilina)	Anti-Ole e 2 de olivo (conejo)	IgG (fragmento Fab) anti-conejo (burro), conjugado con Cy3
Anti-Ole e 2 de olivo (conejo)		IgG (fragmento Fab) anti-conejo (burro)
Cu/Zn SOD cloroplastídica de <i>Arabidopsis</i>	Anti-Cu/Zn SOD cloroplastídica de <i>Arabidopsis</i> (conejo)	IgG (H+L) anti-conejo (cabra), conjugado con Alexa fluor 633
N-terminal de Ole e 9 de olivo	Anti-N-terminal de Ole e 9 de olivo (conejo)	IgG (H+L) anti-conejo (cabra), conjugado con Alexa fluor 633

El ensayo con el anticuerpo anti-Ole e 2 mostró tres bandas reactivas en el rango de 14-16 kDa. El anticuerpo anti-Cu/Zn SOD enlaza con una proteína de aproximadamente 16,4 kDa, correspondiente a la forma citosólica de esta enzima, identificada previamente como el alérgeno Ole e 5 (Boluda *et al.* 1998). Finalmente, el anticuerpo anti-Ole e 9 reconoce una banda proteica de 46 kDa.

Los anticuerpos utilizados muestran especificidad. Sin embargo, el anticuerpo anti-SOD también reconoce una isoforma Cu/Zn SOD de 22 kDa, y una banda de alto peso molecular, de 66 kDa, que debe corresponder a una forma multimérica de la isoforma de 22 kDa. La limitación de disponibilidad de un anticuerpo específico para Ole e 5 en el momento del ensayo, llevó a usar un anticuerpo que muestra reactividad para otras isoformas de Cu/Zn SOD presentes en el grano de polen.

En un paso intermedio, Ole e 1 y Ole e 2 se detectaron simultáneamente en inmunotransferencias usando dos anticuerpos específicos, procedentes de diferentes especies animales. Tal como se



esperaba, la señal resultante es una combinación de los patrones de marcado de Ole e 1 y Ole e 2 (Figura 8, calle 6).

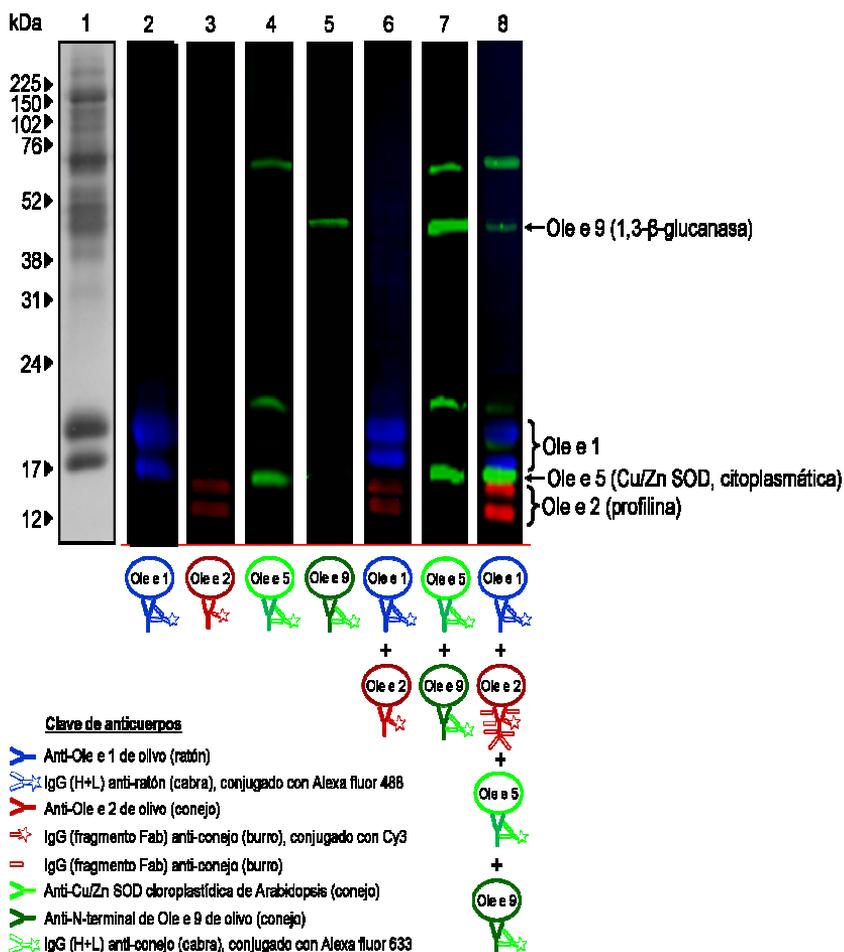


Figura 8. Detección fluorescente de los alérgenos de polen de olivo Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en inmunotransferencias. Para testar la especificidad de los anticuerpos, los extractos proteícos totales de olivo procedentes del cultivar Picual (calle 1, tinción con plata) se transfirieron a membranas de PVDF y se ensayaron con diversos anticuerpos: anti-Ole e 1 de ratón (calle 2), anti-Ole e 2 de conejo (calle 3), anti-Cu/Zn SOD de conejo (calle 4) y anti-Ole e 9 de conejo (calle 5). En un segundo paso, las proteínas Ole e 1 y Ole e 2 (calle 6), así como Ole e 5 y Ole e 9 (calle 7) se detectaron simultáneamente sobre Western blots. Finalmente, usando el diseño del sistema multiplex, los cuatro alérgenos se detectaron simultáneamente sobre el mismo blot (calle 8). Se cargaron treinta microgramos de proteína total por calle. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda del panel.



De la misma forma, Ole e 5 y Ole e 9 se ensayaron simultáneamente, obteniéndose la combinación de los patrones obtenidos para estos alérgenos (Figura 8, calle 7). Finalmente, los cuatro alérgenos se testaron simultáneamente en el mismo blot (Figura 8, calle 8), siguiendo los 5 pasos descritos en la figura 7. El apartado de materiales y métodos “inmunolocalización multiplex sobre membrana” muestra los procesos de forma más detallada. Tras la detección por escaneo en una plataforma apropiada, equipada con tres láseres, a la imagen resultante se le asignó un color falso en cada canal, correspondiendo a la longitud de onda de excitación del fluorocromo usado.

La expresión de los alérgenos se puede cuantificar de forma muy precisa. Sin embargo, solo deben ser comparados por su abundancia cuando los anticuerpos usados en su detección son los mismos. Aunque se han cuantificado todos los alérgenos correspondientes al blot de la figura 8, calle 8, para demostrar la posibilidad de su cuantificación (Figura 9), compararemos únicamente las diferentes isoformas de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2. Las tres isoformas de Ole e 1 presentes, se describen de mayor a menor abundancia tal como sigue: Isoforma de 20 kDa, isoforma de 18,4 kDa e isoforma de 22 kDa. La isoforma de 22 kDa es siete veces menos abundante que la isoforma de 20 kDa, y casi cuatro veces menos abundante que la de 22 kDa. El alérgeno Ole e 2 muestra dos bandas correspondientes al peso molecular de 15,1 kDa y 14 kDa. La diferencia entre éstas es menor que las observadas para las isoformas de Ole e 1. La isoforma de Ole e 2 de 15,1 kDa es 0,3 veces más abundante que la isoforma de 14 kDa.

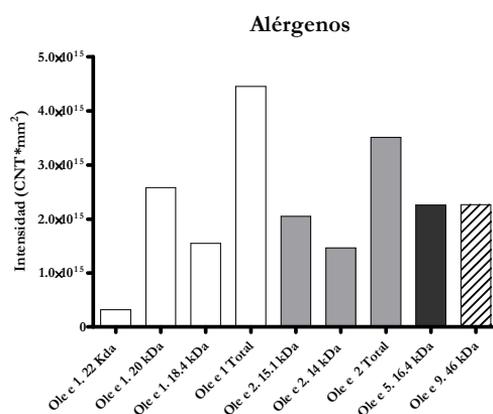


Figura 9. Análisis cuantitativo de la intensidad de las bandas reactivas observadas en el blot multiplex, correspondientes a los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.



4.2 Utilización del sistema desarrollado para caracterizar el polimorfismo alérgico a lo largo de una amplia representación del germoplasma del olivo. Implicaciones en la biología reproductiva de éste.

Se ha ensayado el método multiplex en extractos proteicos de polen de olivo de 57 cultivares diferentes, cubriendo así una gran parte de la variación proteica en la especie *Olea europaea* L. El objetivo fue obtener el perfil antigénico de estas variedades para los cuatro alérgenos anteriormente ensayados en la variedad Picual, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9. Además se evaluó la relación entre la composición alérgica de variedades de olivo con diversos parámetros de repercusión agronómica, como capacidad germinativa del polen, compatibilidad y fenología de la floración.

El estudio de la expresión de los alérgenos se realizó a través de ensayos de SDS-PAGE en geles de alta resolución, de 20 x 18 cm, e inmunotransferencia en modo multiplex.

Los 57 cultivares estudiados se detallaron en la tabla 3 del apartado material y métodos, especificándose su origen, y se relacionaron con un número, que se mostrará de nuevo seguidamente entre paréntesis: Acebuche (1), Arbequina (2), Bella de España (3), Blanqueta (4), Cornicabra (5), Domat (6), Frantoio (7), Gallega (8), Gordal de Sevilla (9), Híbrido 39-51 (10), Picual (12), Híbrido 40-52 (13), Híbrido 41-54 (14), Hojiblanca (15), Izmir sofralik (16), Kalamon (17), Leccino (18), Lechín de Granada (19), Lechin de Sevilla (20), Loaime (21), Lucio (22), Manzanilla de Sevilla (23), Morrut (24), Ovo di piccione (25), Picudo (26), Sevillena (27), Sourani (28), Verdial de Huévar (29), Verdial de Vélez (30), Villalonga (31), Aceitera (32), Aybalik (33), Ayoruni (34), Caninese (35), Coratina (36), Cornezuelo (37), Híbrido 2-67 (38), Híbrido 8-7 (39), Changlot real (40), Chetoui (41), Dolce agogia (42), Farga (43), Koroneiki (44), Macho de Jaén (45), Manzanilla de Jaén (46), Mesky (47), Morisca (48), Negrillo de Estepa (49), Nevadillo (50), Olivo macho (51), Pajarero (52), Picholine (53), Picholine marrocaïne (54), Rosciola (55), Verdial de Alcaudete (56) y Verdial de Badajoz (57).

Los perfiles proteicos de los diversos extractos de polen de variedades se observan en los geles SDS-PAGE teñidos con plata (Figura 10A). Se pueden apreciar bandas de distintas intensidades, entre las que destacan tres formas de la proteína alérgica mayoritaria del polen del olivo, Ole e 1 de 18,4 kDa, 20 kDa y 22 kDa. Los alérgenos Ole e 2,



Ole e 5 y Ole e 9 no se distinguen con facilidad, sin embargo, sí son identificables en las inmunotransferencias realizadas (Figura 10B). El perfil antigénico muestra la gran variabilidad en el patrón de expresión de las isoformas de alérgenos entre cultivares (Figura 10B).

El alérgeno Ole e 1, mostrado en azul, presenta 4 bandas reactivas, cuyas masas moleculares calculadas son: 18 kDa (forma de Ole e 1 no glicosilada), 20 kDa (forma monoglicosilada), 22 kDa (forma diglicosilada) y una banda muy débil de 40 kDa, correspondiendo ésta a una forma dimérica de la isoforma de 20 kDa. El alérgeno Ole e 2, mostrado en rojo, presenta bandas de 15,6 kDa, 15,1 kDa y 14 kDa. Los alérgenos Ole e 5 y Ole e 9 se muestran en verde. La banda correspondiente a Ole e 5, una Cu/Zn-Superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD) presenta un peso molecular de 16,4 kDa, similar al descrito previamente para una subunidad de la enzima Cu/Zn SOD en su forma citosólica en el polen del olivo (Alché 2002; Butteroni *et al.* 2005). La presencia de distintas bandas de superóxido dismutasas (SODs) en los inmunoblots, también en verde, se debe a la utilización de un anticuerpo comercial que fue desarrollado frente a la forma cloroplastídica de la Cu/Zn SOD de *Arabidopsis*. Este anticuerpo reconoce formas citosólicas del enzima a elevadas concentraciones, y parece presentar reactividad cruzada con SOD, diferentes a Ole e 5. El alérgeno Ole e 9 se muestra a un peso molecular correspondiente a 46 kDa.

La intensidad de fluorescencia de cada banda detectada en las inmunotransferencias se midió con objeto de cuantificar el nivel relativo de expresión de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en las 57 variedades analizadas. El análisis densitométrico de la expresión se llevó a cabo en cada una de las bandas mostradas para los alérgenos estudiados, y se calculó la razón entre estas bandas y las correspondientes a la variedad Picual, correspondiente al número 12 de cada uno de los blots. De esta forma, se expresaron las diferencias entre cultivares según su contenido relativo en los alérgenos analizados.

La abundancia relativa de cada isoforma y de la suma total de ellas se muestra para los alérgenos Ole e 1 (figura 11) y Ole e 2 (figura 12), así como la abundancia relativa de las bandas correspondientes a Ole e 5 (figura 13A) y Ole e 9 (figura 13B).

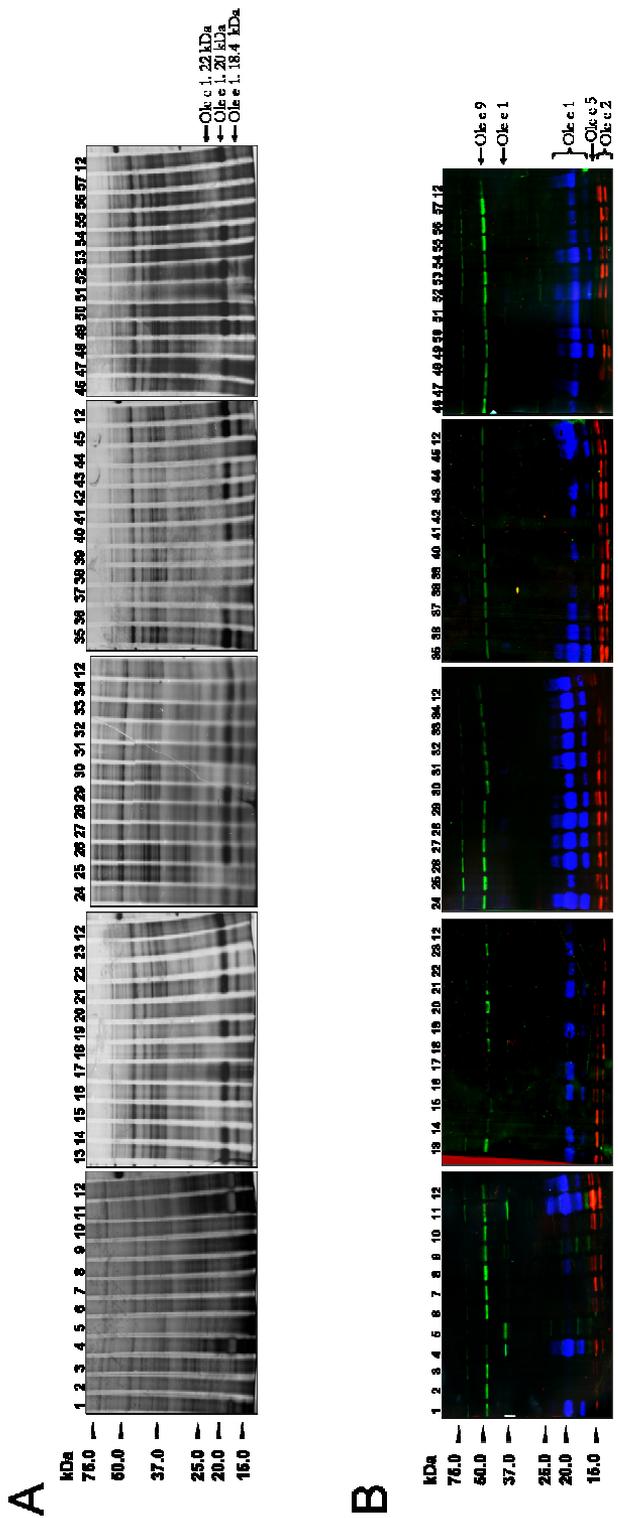


Figura 10. A) Tinción con plata de extractos totales proteicos de 57 cultivares diferentes. **B)** Detección multiplex de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 correspondiente a los mismos extractos descritos en el panel A. Se cargaron 30 microgramos de proteína total por calle. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la imagen.



Los resultados muestran las diferencias cuantitativas de los alérgenos estudiados entre variedades. Las variedades que presentaron de forma notable un mayor o un menor contenido en un determinado alérgeno son las siguientes, expresadas como: “variedades con mayor contenido en el alérgeno / variedades con menor contenido en el alérgeno”. En el caso del alérgeno Ole e 1, en concreto para la banda de 40 kDa (figura 11A), las variedades de mayor y menor contenido fueron Pajarero (52), Picholine marrocaïne (54) / Verdial de Vélez (30), Verdial de Huévar (29). Para la isoforma de 22 kDa de Ole e 1 (figura 11B), fueron Kalamón (17)/ Chetoui (41), Koroneiki (44). El mayor/menor contenido para la isoforma de 20 kDa de Ole e 1 (figura 11C) fue en las variedades Loaime (21), Kalamon (17)/ Koroneiki (44), Chetoui (41).

Las variedades correspondientes a Ole e 1 de 18 kDa (figura 11D) fueron Izmir sofralik (16), Lechín de Granada (19)/ Gordal de Sevilla (9). El contenido total de Ole e 1 (figura 11E) se presenta en los más altos niveles en Kalamon (17) y Loaime (21) y en sus menores niveles en Koroneiki (44) y Chetoui (41).

En el caso del alérgeno Ole e 2 (figura 12), se observan los niveles más altos / más bajos para la isoforma 15,6 kDa (figura 12A), en las variedades Loaime (21), Verdial de Huévar (29)/ Farga (43), Koroneiki (44). La isoforma de 15.1 kDa de Ole e 2 (figura 12B) presenta sus máximos niveles en los híbridos 39-52 (11) e Híbrido 40-52 (13), siendo los menores niveles de alérgeno correspondientes a las variedades Cornicabra (5) y Mesky (47). Para la isoforma 14 kDa de Ole e 2 (figura 12C) encontramos Loaime (21), Lechín de Sevilla (20)/ Cornicabra (5), Gordal de Sevilla (9). Cuantificando la cantidad total de Ole e 2 (figura 12D), obtenemos Loaime (21)/ Cornicabra (5), Gordal de Sevilla (9).

El alérgeno Ole e 5 (figura 13A) se presenta en sus niveles más altos en las variedades Leccino (18) y Lechín de Sevilla (20), y en sus cotas inferiores en Acebuche (1) y Chetoui (41).

La distribución de Ole e 9 (figura 13B) corresponde a Picudo (26), Ouvo di Piccione (25)/ Cornicabra (5), Dolce Agogia (42).

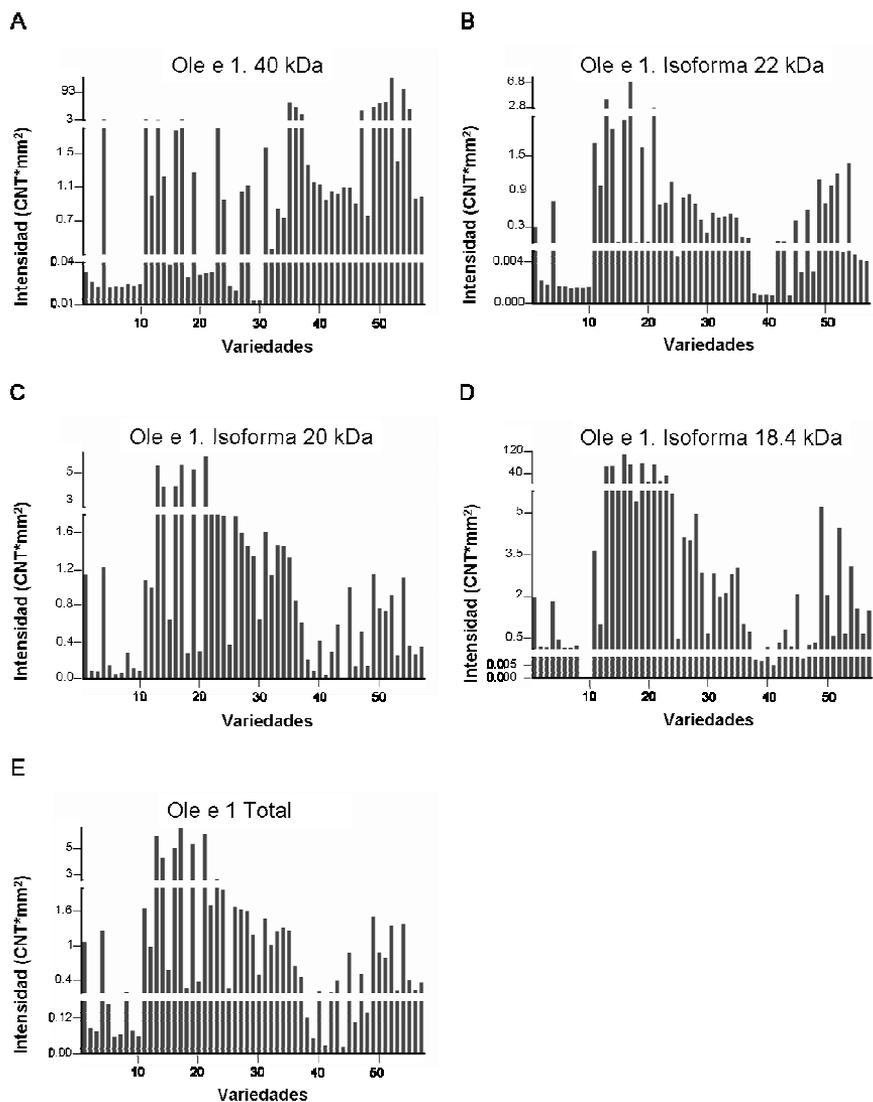


Figura 11. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección de Ole e 1. **A)** Banda de 40 kDa, **B)** Isoforma de 22 kDa, **C)** Isoforma de 20 kDa, **D)** Isoforma de 18,4 kDa, **E)** Suma de las cuantificaciones de todas las bandas obtenidas de Ole e 1.

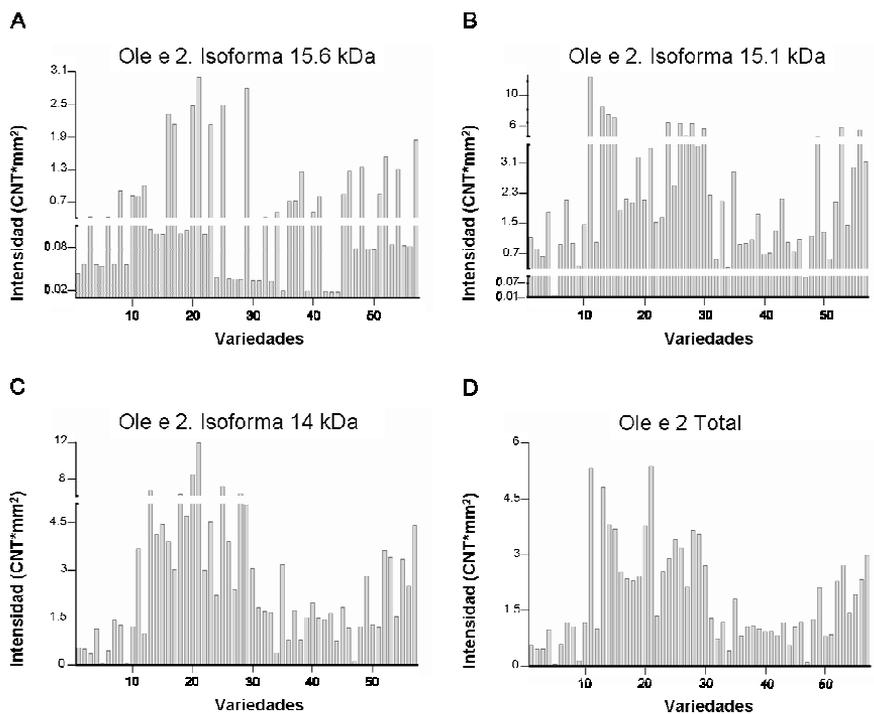


Figura 12. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección Ole e 2. **A)** Isoforma de 15,6 kDa, **B)** Isoforma de 15,1 kDa, **C)** Isoforma de 14 kDa, **D)** Suma de las cuantificaciones de todas las bandas obtenidas de Ole e 2.

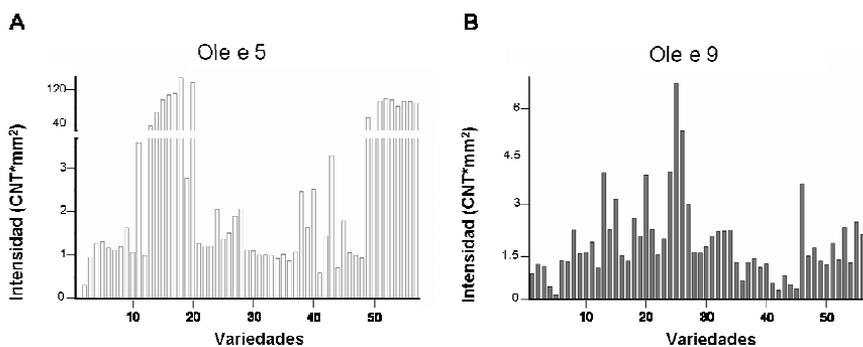


Figura 13. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección de **A)** Ole e 5, y **B)** Ole e 9.



Para una lectura más comprensiva, se han distribuido los datos de las diferentes intensidades de los alérgenos totales en terciles (tabla 11).

Las variedades que presentan una baja expresión de un alérgeno se encuentran en el tercil uno, la expresión intermedia en el tercil dos, y las variedades con una alta expresión del alérgeno se distribuyen en el tercer tercil.

Tabla 11. Distribución en terciles de datos correspondientes a las intensidades relativas de los alérgenos. En el caso de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2, se ha considerado la suma de las intensidades de todas las isoformas para cada alérgeno.

Nº asignado a variedad	Ole e 1 total	Ole e 2 total	Ole e 5	Ole e 9
Tercil 1	2,3,5,6,7,8,9, 10,25,38,39, 40,41,42,44, 46,48,53,56.	1,2,3,4,5,6,8, 9,12,32,34, 36,37,38,39, 40,41,42,44, 45,47,50,51.	1,2,3,7,10, 12,30,31,32, 33,34,35,36, 37,41,44,46, 47,48	1,2,3,4,5,7, 12,35,36,37, 39,40,41,42, 43,44,45,50, 54
Tercil 2	1,4,12,15,18, 20,29,30,32, 33,36,37,43, 45,47,50,51, 55,57.	7,10,18,22, 27,31,33,35, 46,43,46,48, 49,52,54,55.	4,5,6,8,9,21, 22,23,24,25, 26,27,28,29, 38,39,40,42, 45.	9,10,11,16, 17,19,22,23, 28,29,30,31, 38,47,48,49, 51,52.
Tercil 3	11,13,14,16, 17,19,21,22, 23,24,26,27, 28,31,34,35, 49,52,54.	4,11,13,14, 16,15,16,17, 19,20,21,23, 24,25,26,28, 29,30,53,56, 57.	11,13,14,15, 16,17,18,19, 20,43,49,0,51, 52,53,54,55, 56,57.	8,13,14,15,18, 20,21,24,25, 26,27,32,33, 34,46,53,55, 56,57.

4.2.1 Correlación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9

Las asociaciones entre las intensidades de expresión relativa de los diferentes alérgenos se realizaron mediante el análisis de correlación de Spearman (tabla 12). Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos estadísticamente. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Los resultados muestran que las proteínas del alérgeno Ole e 1 correlacionan entre ellas de forma significativa. Además, las tres isoformas de Ole e 1 de 22 kDa, 20 kDa y 18,4 kDa respectivamente, correlacionan con dos isoformas de Ole e 2, de 15,1 kDa y 14 kDa. Las proteínas de Ole e 1 de 40 kDa, 22 kDa y 18,4 kDa se asocian con Ole e 5. Las isoformas de Ole e 1 de 20 kDa y 18,4 kDa se encuentran



asociadas a Ole e 9. Además, considerando la suma total de las bandas obtenidas para el alérgeno Ole e 1, se puede comprobar la correlación con todas las isoformas obtenidas para Ole e 1, Ole e 2 y su correlación con Ole e 5 y Ole e 9.

Tabla 12. Análisis de correlación bivariada entre alérgenos (n=57).

**La correlación es significativa al nivel de 0,01 (2 colas). *La correlación es significativa al nivel de 0,05 (2 colas). R: Coeficiente de correlación de Spearman. P.: Significación. ns: valores no significativos.

		Ole e 1. 40 kDa	Ole e 1. 22 kDa	Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Suma Ole e 1	Ole e 2. 15,6 kDa	Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e 2. 14 kDa	Suma Ole e 2	Ole e 5	Ole e 9
Ole e 1. 22 kDa	R	,456**										
	P	,0004										
Ole e 1. 20 kDa	R	,320*	,889**									
	P	,0153	,0000									
Ole e 1. 18,4 kDa	R	,273*	,827**	,863**								
	P	,0401	,0000	,0000								
Suma Ole e 1	R	,378**	,941**	,978**	,904**							
	P	,0037	,0000	,0000	,0000							
Ole e 2. 15,6 kDa	R											
	P	ns	ns	ns	ns	ns						
Ole e 2. 15,1 kDa	R		,429**	,454**	,581**	,498**						
	P	ns	,0009	,0004	,0000	,0001	ns					
Ole e 2. 14 kDa	R		,435**	,514**	,707**	,542**		,775**				
	P	ns	,0007	,0000	,0000	,0000	ns	,0000				
Suma Ole e 2	R		,462**	,493**	,661**	,542**	,270*	,891**	,914**			
	P	ns	,0003	,0001	,0000	,0000	,0423	,0000	,0000			
Ole e 5	R	,330*	,320*		,454**	,294*		,485**	,574**	,550**		
	P	,0123	,0152	ns	,0004	,0264	ns	,0001	,0000	,0000		
Ole e 9	R			,273*	,367**	,296*		,536**	,572**	,652**	,332*	
	P	ns	ns	,0398	,0049	,0255	ns	,0000	,0000	,0000	,0115	

Por otra parte, las isoformas de Ole e 2 de 15,1 kDa y 14 kDa se correlacionan a su vez entre ellas, y con los alérgenos Ole e 5 y Ole e 9. Curiosamente, la proteína Ole e 2 de 15,6 kDa, no correlaciona con ninguno de los alérgenos estudiados.

Ole e 5, como se ha comentado, está asociado a determinadas isoformas de Ole e 1 y Ole e 2, y se asocia además con Ole e 9.



4.2.2 Asociación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 con la capacidad germinativa del polen de olivo.

El objetivo de este estudio fue realizar una aproximación de la posible relación entre la capacidad germinativa y la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen maduro de 18 variedades.

En el olivo, se han realizado distintos trabajos para estudiar la germinabilidad del polen, encontrándose valores fluctuantes, dependiendo del momento de recogida del polen, variedad y medio de germinación utilizado, aunque puede suponerse que la comparación de la germinación “*in vitro*” entre cultivares en idénticas condiciones ambientales en un mismo ensayo puede servir para establecer categorías que agrupen a cultivares atendiendo a la calidad de su polen. Los datos de la germinación “*in vitro*” de 16 variedades se tomaron de un extenso estudio previo de Fernández-Escobar (Fernández-Escobar 1981). El polen de variedades de dicho estudio, al igual que en la presente investigación, procede del banco de germoplasma de Córdoba. En la investigación mencionada, los autores consideraron polen germinado aquél cuyo diámetro del grano de polen era inferior a la longitud del tubo polínico, realizando 12 réplicas independientes de medida, y contabilizando hasta 200 granos por medida.

Para llevar a cabo el presente estudio, se agruparon los datos de germinación “*in vitro*” en dos categorías, considerándose baja aquella capacidad germinativa por debajo del 5% de granos de polen germinados, y alta la que se encontraba por encima, coincidiendo las variedades incluidas en estas categorías con los datos de baja y alta germinabilidad aportados por Barranco y colaboradores (Barranco D. 2005) para las mismas variedades.

De esta forma, se distribuyen las variedades con baja capacidad germinativa “*in vitro*” (Bella de España, Cornicabra, Gordal de Sevilla, y Dolce agogia) y las de alta capacidad germinativa “*in vitro*” (Frantoio, Gallega, Picual, Hojiblanca, Leccino, Manzanilla de Sevilla, Picudo, Caninese, Coratina, Cornezuelo, Chetoui, y Picholine).

Las comparaciones de expresión de alérgenos entre los dos grupos se llevaron a cabo mediante el uso del test U de Mann-Whitney y los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Las comparaciones entre los dos grupos de baja y alta capacidad germinativa (tabla 13) muestran, en general, un mayor nivel de los alérgenos estudiados en el grupo de alta capacidad germinativa. Sin



embargo, únicamente se establecen asociaciones significativas entre los grupos de baja *vs* alta capacidad germinativa en Ole e 1 de 18,4 kDa ($0,23 \pm 0,19$ *vs* $0,49 \pm 0,80$; $p < 0,05$), en la suma de las isoformas de Ole e 1 ($0,13 \pm 0,06$ *vs* $0,77 \pm 0,78$; $p < 0,05$), en las isoformas de Ole e 2 de 15,1 kDa ($0,57 \pm 0,54$ *vs* $2,61 \pm 2,16$; $p < 0,05$) y 14 kDa ($0,47 \pm 0,66$ *vs* $2,78 \pm 1,73$; $p < 0,05$), y en su suma ($0,36 \pm 0,35$ *vs* $1,85 \pm 0,99$; $p < 0,01$). Los resultados se muestran gráficamente para el alérgeno Ole e 1 (figura 14), Ole e 2 (figura 16), Ole e 5 y Ole e 9 (figura 15).

Tabla 13. Comparación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en variedades con baja (n=4) y alta (n=12) capacidad de germinación *in vitro*.

Ole e 1

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	40 kDa	22 kDa	20 kDa	18,4 kDa	Suma Ole e 1
Baja capacidad germinativa	$0,28 \pm 0,21$	$0,01 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,09$	$0,23 \pm 0,19^*$	$0,13 \pm 0,06^*$
Alta capacidad germinativa	$11,02 \pm 20,52$	$0,27 \pm 0,38$	$0,81 \pm 0,77$	$4,92 \pm 9,80^*$	$0,77 \pm 0,78^*$

* Diferencia significativa entre grupos ($P < 0,05$)

Ole e 2

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	15,6 kDa	15,1 kDa	14 kDa	Suma Ole e 2
Baja capacidad germinativa	$0,13 \pm 0,18$	$0,57 \pm 0,54^*$	$0,47 \pm 0,66^*$	$0,36 \pm 0,35^{**}$
Alta capacidad germinativa	$0,55 \pm 0,63$	$2,61 \pm 2,16^*$	$2,78 \pm 1,73^*$	$1,85 \pm 0,99^{**}$

* Diferencia significativa entre grupos ($P < 0,05$)

** Diferencia significativa entre grupos ($P < 0,01$)

Ole e 5 y Ole e 9

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	Ole e 5	Ole e 9
Baja capacidad germinativa	$1,33 \pm 0,8$	$0,72 \pm 0,62$
Alta capacidad germinativa	$29,38 \pm 52,74$	$1,91 \pm 1,34$

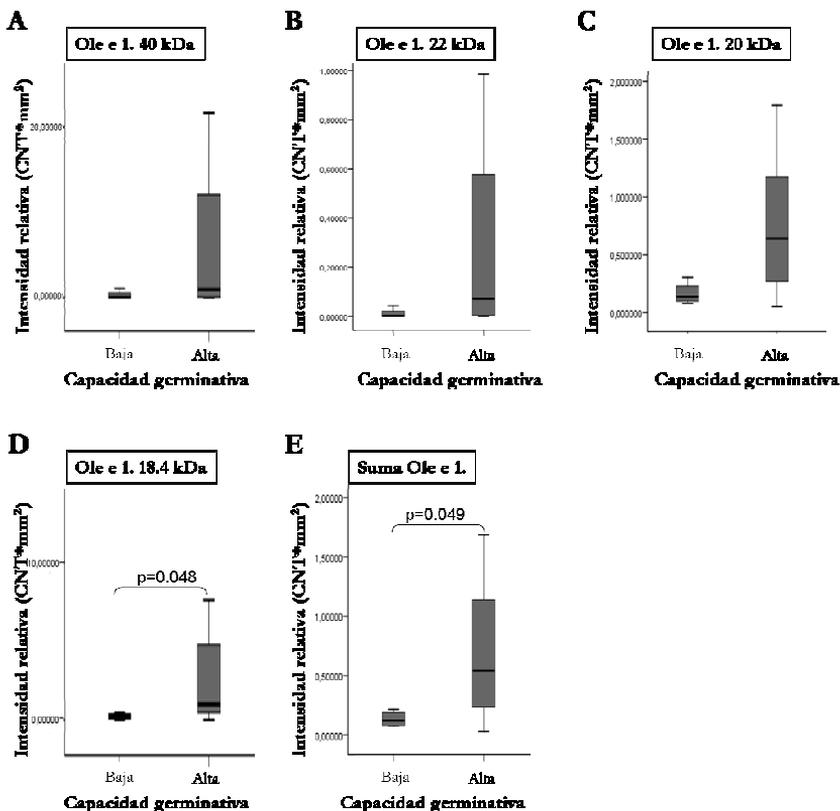


Figura 14. Comparación de los niveles de Ole e 1 en los grupos de variedades con baja y alta capacidad germinativa. **A)** Dímero de 40 kDa, **B)** Isoforma de 22 kDa, **C)** Isoforma de 20 kDa, **D)** Isoforma de 18,4 kDa y **E)** Suma de Ole e 1. Se indican diferencias significativas entre grupos, dadas por el test U de Mann-Withney ($P < 0,05$).

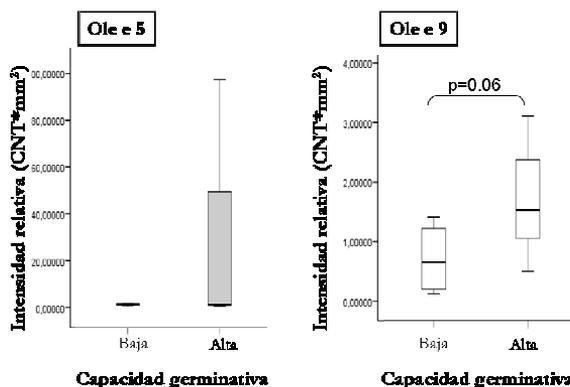


Figura 15. Comparación de los niveles de Ole e 5 y Ole e 9 en los grupos de variedades con baja y alta capacidad germinativa. Panel izquierdo Ole e 5. Panel



derecho: Ole e 9. Las diferencias significativas entre grupos vienen dadas por el test U de Mann-Withney ($P < 0,05$).

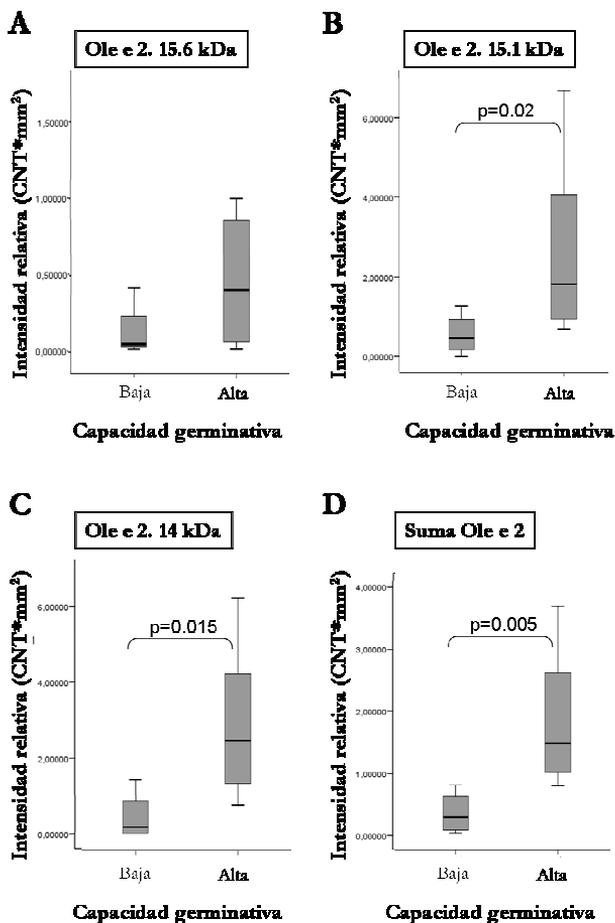


Figura 16. Comparación entre los niveles de isoformas de Ole e 2 en los grupos de variedades con baja ($n=4$) y alta capacidad germinativa ($n=12$). **A)** Isoforma de 15,6 kDa, **B)** Isoforma de 15,1 kDa, **C)** Isoforma de 14 kDa. **D)** Suma de isoformas de Ole e 2. Se indican diferencias significativas entre grupos según el test U de Mann-Withney ($P < 0,05$).

4.2.3 Asociación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 con el índice de compatibilidad del polen de olivo.

El objetivo de este estudio fue determinar la posible influencia de los sistemas de compatibilidad entre cultivares en los niveles de alérgenos presentes en su polen.



La autoincompatibilidad polen-pistilo es un mecanismo por el cual una planta hermafrodita fértil es incapaz de producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt 1997). El olivo se ha considerado tradicionalmente una planta autocompatible. Recientemente, las pruebas de paternidad con marcadores moleculares han mostrado evidencias de sistemas de incompatibilidad en determinadas variedades de olivo. Sin embargo, en la literatura aparecen datos contradictorios de múltiples cultivares, relacionados con el comportamiento autocompatible e incompatible del olivo en el mismo cultivar. Ochenta y cinco variedades han sido descritas como autocompatibles, e incompatibles a la vez (entrada de Julio 2011 de la base de datos de la F.A.O. <http://www.oleadb.it/olivodb.html>). Este hecho se ha atribuido a factores ambientales, a errores de identificación varietal, así como a la metodología no uniforme empleada entre los estudios.

Por ello, se han tomado datos de un previo ensayo para la medida de la respuesta incompatible (Cuevas 2005). Dicho estudio fue realizado con un diseño experimental homogéneo durante 3 años consecutivos en el banco de germoplasma de olivo de Córdoba, lugar de dónde proceden las muestras de polen estudiadas. Para ello, este autor realiza pruebas de campo consistentes en autopolinización (AP) y polinización cruzada (PC) o libre (PL), realizando finalmente un recuento del nº de frutos cuajados en cada caso. El índice de compatibilidad corresponde al nº de frutos en AP dividido por el nº de frutos en PC ó PL. De esta forma, se clasificaron los cultivares en base al índice de compatibilidad medido (IC). Las variedades autocompatibles clasificadas por su mayor índice de compatibilidad ($IC > 0,8$) fueron las variedades Arbequina, Cornezuelo de Jaén, Gordal sevillana, y Manzanilla de Jaén. Las variedades parcialmente autoincompatibles ($0,5 < IC < 0,8$) fueron Blanqueta, Cornicabra, Hojiblanca, Pajarero, Picual, Picudo y Verdial de Huévar, y entre las autoincompatibles ($IC < 0,5$) se encontraron Changlot real, Manzanilla de Sevilla, Nevadillo negro de Jaén, Sevillena.

En la investigación presente, estudiamos la relación de los alérgenos y el índice de compatibilidad. El análisis de correlación bivariada de Spearman de los alérgenos en estudio y del índice de autocompatibilidad (tabla 14) revela una asociación entre los índices de autocompatibilidad y los niveles del alérgeno Ole e 1 en sus isoformas de 20 kDa y 18,4 kDa, y con la suma total de las bandas proteicas detectadas de Ole e 1. El aumento de estos alérgenos mantiene una relación inversa con el aumento del índice de autocompatibilidad. Así, variedades autocompatibles mantienen bajos niveles de los alérgenos



Ole e 1 de 20 kDa y 18,4 kDa, y de la suma total de Ole e 1 y variedades autoincompatibles proceden de forma que los niveles de estos alérgenos se ven aumentados.

Tabla 14. Análisis de correlación bivariada entre el índice de autocompatibilidad y diversos alérgenos (n=15). * La correlación es significativa al nivel de 0,05 (2 colas). R: Coeficiente de correlación de Spearman. P: Significación. ns: valores no significativos.

Alérgenos		Ole e 1. 40 kDa	Ole e 1. 22 kDa	Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Suma Ole e 1	Ole e 2. 15,6 kDa	Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e 2. 14 kDa	Suma Ole e 2	Ole e 5	Ole e 9
IC	R	-,31	-,31	-,61*	-,53	-,61*	,02	-,31	-,46	-,19	-,51	,04
	P	ns	ns	,015*	,04*	,015*	ns	ns	ns (0,08)	ns	ns	ns

La diferencia del nivel de alérgenos entre los tres grupos de variedades autocompatibles, parcialmente autoincompatibles y autoincompatibles se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis (tabla 15). La comparación entre grupos resultó en una diferencia de expresión de isoformas de los alérgenos Ole e 1 entre los tres grupos divididos según su índice de compatibilidad, con una asociación significativa de los grupos respecto a los niveles de las isoformas de Ole e 1 de 20 kDa (P=0,022) y 18,4 kDa (P=0,036), así como la suma de Ole e 1 total (P=0,022). Los demás alérgenos no presentaron diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, se observa una mayor expresión de los alérgenos, aunque no significativa, en los grupos de variedades autoincompatibles y parcialmente autoincompatibles respecto de las variedades autocompatibles, exceptuando el caso del alérgeno Ole e 9.

Para comprobar la implicación de cada grupo en las diferencias observadas, se realizó un análisis por parejas, contrastando variedades autoincompatibles *vs* parcialmente autoincompatibles, autoincompatibles *vs* autocompatibles y compatibles *vs* parcialmente autoincompatibles. El análisis por el test de Mann-Whitney (figura 17) confirma los resultados previos. Se observaron diferencias significativas entre grupos de las isoformas Ole e 1 de 20 kDa (figura 17B) y 18,4 kDa (figura 17C), así como la suma de Ole e 1 (figura 17D). Adicionalmente, se observaron diferencias en el alérgeno Ole e 1 de 22 kDa (figura 17A), presentando una mayor expresión del alérgeno entre el grupo de variedades parcialmente autoincompatibles respecto a las autocompatibles. Así mismo, se observaron diferencias



significativas con un aumento en la expresión de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa en el grupo de variedades autoincompatibles respecto de las autocompatibles (figura 17E).

Tabla 15. Comparación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y el índice de compatibilidad (n=15). Test de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como media \pm desviación típica. * La asociación es significativa al nivel de 0,05 (2 colas).

Ole e 1

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	40 kDa	22 kDa	20 kDa	18,4 kDa	Suma Ole e 1
Autoincompatibles	15,55 \pm 28,01	0,57 \pm 0,38	1,35 \pm 0,97*	10,35 \pm 16,64*	1,37 \pm 1,05*
Parcialmente Autoincompatibles	20,89 \pm 53,06	0,60 \pm 0,46	1,00 \pm 0,52*	3,18 \pm 2,45*	1,03 \pm 0,51*
Autocompatibles	5,65 \pm 10,67	0,02 \pm 0,05	0,23 \pm 0,25*	0,23 \pm 0,34*	0,18 \pm 0,19*

* Diferencia significativa entre grupos (P<0,05)

Ole e 2

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	15,6 kDa	15,1 kDa	14 kDa	Suma Ole e 2
Autoincompatibles	0,69 \pm 0,98	1,90 \pm 1,47	2,54 \pm 1,40	1,59 \pm 0,86
Parcialmente Autoincompatibles	0,79 \pm 1,06	3,02 \pm 2,52	2,75 \pm 1,97	2,10 \pm 1,44
Autocompatibles	0,52 \pm 0,58	0,81 \pm 0,31	0,86 \pm 0,73	0,70 \pm 0,49

Ole e 5 y Ole e 9

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	Ole e 5	Ole e 9
Autoincompatibles	8,18 \pm 12,63	1,77 \pm 0,89
Parcialmente Autoincompatibles	29,18 \pm 47,71	1,81 \pm 1,83
Autocompatibles	1,01 \pm 0,54	1,83 \pm 1,21

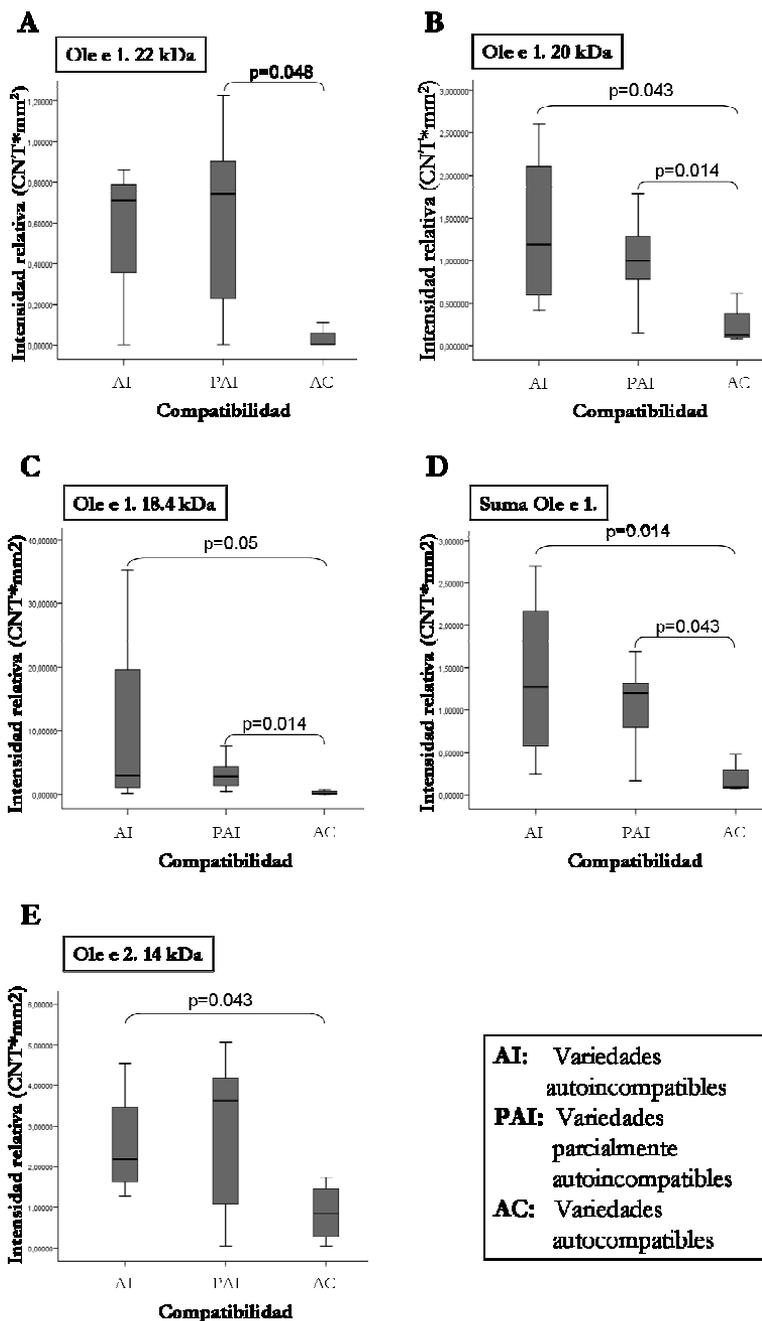


Figura 17: Comparación entre los niveles de isoformas de Ole e 1 (A-C) y la suma de Ole e 1 (D), y de la isoforma Ole e 2 de 14 kDa (E) en los tres grupos: variedades autoincompatibles (n=4), parcialmente autocompatibles (n=7), y autocompatibles (n=4). Se muestran los valores significativos obtenidos según el test U de Mann-Whitney (P<0,05).



4.2.4 Asociación entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 del polen de olivo con su época de floración.

El objetivo de este estudio fue determinar la posible influencia de las épocas de floración de cultivares en los niveles de alérgenos presentes en su polen.

La producción anual del olivo depende en gran medida de su floración. La época de floración entre las variedades es muy variable y tiene una gran repercusión en el momento de seleccionar variedades en las que se promueva la polinización cruzada.

Un estudio realizado en el banco mundial de germoplasma del olivo de Córdoba durante 12 años, muestra en detalle los días de plena floración de un amplio número de cultivares (Barranco D 2005).

Para el presente estudio, las variedades fueron agrupadas en 13 grupos, según su fecha media de plena floración en el mes de Mayo, correspondiendo el grupo 0 al de floración más temprana, y el grupo 13 al de floración más tardía (tabla 16). Se consideró floración temprana en las variedades cuyo día medio de plena floración se encontraba en el primer tercil de datos, floración intermedia a las variedades incluídas en el segundo tercil, y floración tardía a las variedades incluídas en el tercil tercero.

El análisis de correlación bivariada de Spearman se ha centrado en el día medio de la plena floración para cada variedad y su relación con los niveles de alérgenos detectados en los cultivares, también procedentes del banco de germoplasma de Córdoba (tabla 17).

La influencia del día medio de plena floración de las variedades de olivo en los niveles de las isoformas de Ole e 1 y en la suma de todas las bandas de Ole e 1 en el polen de olivo se hace evidente por una correlación positiva y una significación de $p < 0,05$. El resto de los alérgenos no presentaron correlación.

La determinación de la asociación del nivel de alérgenos en los tres grupos de floración temprana ($n=9$), intermedia ($n=14$) y tardía ($n=11$) se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (tabla 18).



Tabla 16. Fecha media de plena floración de variedades, y agrupación según éstas.

Grupo	Floración	Día medio de plena floración	Variedades
0	Temprana	3,5	Morrut.
1	Temprana	4,5	Manzanilla de Jaén, Chetoui, Picholine, Ouvo di piccione.
2	Temprana	5	Farga, Frantoio, Mesky, Cornezzuelo de Jaén.
3	Intermedia	6,5	Rosciola, Gordal de Sevilla, Pajarero.
4	Intermedia	7	Manzanilla de Sevilla, Picudo.
5	Intermedia	7,5	Villalonga, Arbequina, Domat, Gallega, Lechín de Sevilla, Macho de Jaén.
6	Intermedia	8	Picholine marrocaïne.
7	Intermedia	8,5	Morisca.
8	Intermedia	9	Picual.
9	Tardía	9,5	Blanqueta, Hojiblanca, Leccino, Verdial de Vélez, Kalamón.
10	Tardía	10,5	Izmir sofralik, Caninese, Nevadillo de Jaén.
11	Tardía	11	Ayoruni.
12	Tardía	12	Verdial de Huévar.
13	Tardía	12,5	Dolce agogia.

Tabla 17. Análisis de correlación bivariada de Spearman entre el día medio de floración de cultivares durante el mes de mayo y el nivel de diversos alérgenos (n=35). *P<0,05; **P<0,005.

Alérgenos	Ole e 1. 40 kDa	Ole e 1. 22 kDa	Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Suma Ole e 1	Ole e 2. 15,6 kDa	Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e 2. 14 kDa	Suma Ole e 2	Ole e 5	Ole e 9
	Floración	R ,025	,480**	,516**	,534**	,423*	,019	,218	,116	-,031	,055
	P ns	,004	,003	,002	,014	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tras el análisis con el test de Kruskal-Wallis (tabla 18), se observa una diferencia significativa entre grupos en la isoforma del alérgeno Ole e 1 de 22 kDa (P=0,024), de 20 kDa (P=0,015), de 18,4 kDa (P=0,006) y en la suma total de las formas del alérgeno Ole e 1 (P=0,03).

Todas las variedades del grupo de floración temprana presentan menor contenido alérgénico en todos los alérgenos estudiados, respecto al grupo de floración tardía, tal como se puede comprobar en



los datos. El análisis por el test de Mann-Whitney define una diferencia significativa únicamente entre las variedades tempranas y tardías en los alérgenos Ole e1 de 22 kDa, 20 kDa, 18,4 kDa, y en la suma total de Ole e 1 (figura 18).

Tabla 18. Análisis por el test Kruskal-Wallis exacto a 2 colas para la comprobación de diferencias de contenido de alérgenos en los grupos según la época de floración de variedades. * Diferencia significativa entre grupos al nivel de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Ole e 1

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	40 kDa	22 kDa	20 kDa	18,4 kDa	Suma Ole e 1
Floración temprana	4,91±9,37	0,03±0,05*	0,29±0,29*	0,33±0,39**	0,21±0,21*
Floración intermedia	27,7±47,5	0,47±0,55*	0,65±0,53*	1,76±1,80**	0,71±0,61*
Floración tardía	11,78±23,4	1,16±2,19*	1,60 ±1,68*	20,13±39,68**	1,74±2,07*

Ole e 2

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	15,6 kDa	15,1 kDa	14 kDa	Suma Ole e 2
Floración temprana	0,57±0,53	1,41±0,67	1,49±0,21	1,10±0,10
Floración intermedia	0,63±0,58	1,56±1,07	1,62±1,13	1,21±0,65
Floración tardía	0,74±1,09	2,64±1,87	3,01±1,81	1,99±1,12

Ole e 5 y Ole e 9

Intensidad relativa (CNT*mm ²)	Ole e 5	Ole e 9
Floración temprana	1,43±1,06	1,45±1,25
Floración intermedia	28,72±41,98	1,41±0,57
Floración tardía	45,5±58,17	1,5±0,86

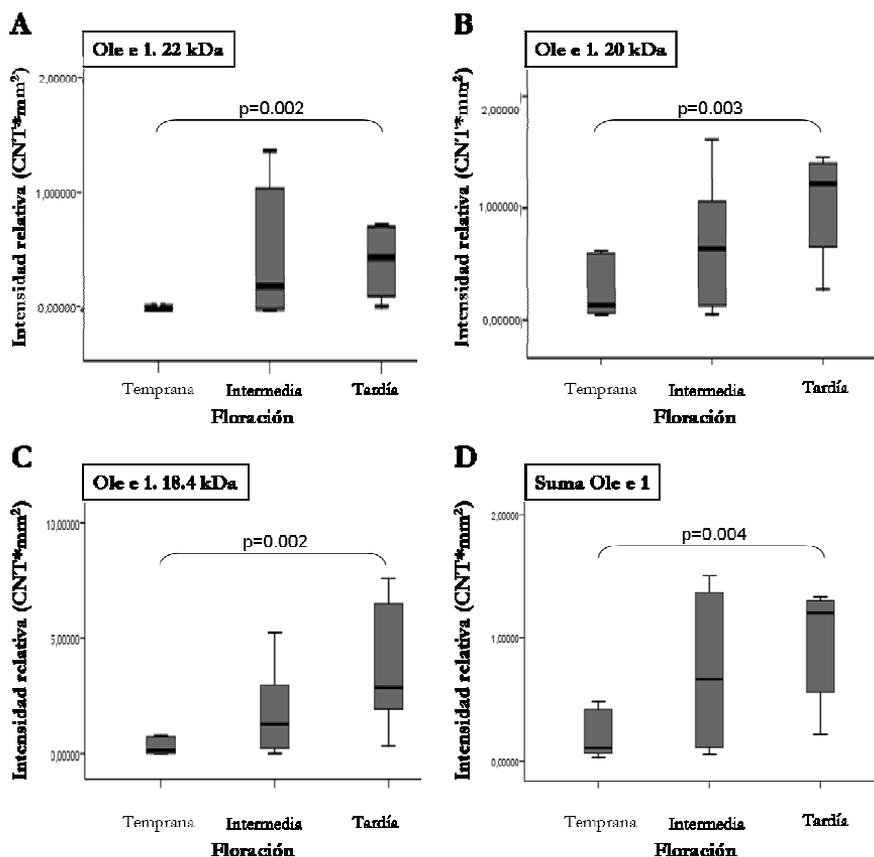


Figura 18: Comparación entre los niveles de isoformas de Ole e 1 de **A)** 22 kDa, **B)** 20 kDa, **C)** 18,4 kDa, y **D)** la suma de Ole e 1 en los tres grupos: variedades de floración temprana (n=9), floración intermedia (n=14), y floración tardía (n=11). Se muestran los valores significativos ($P < 0,05$) en test de Mann-Whitney.



4.3 Expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en siete cultivares durante varios años e implicación de factores ambientales.

Las concentraciones de alérgenos están implicadas en la alergenicidad del polen, y son un factor determinante de los efectos en la salud de los pacientes alérgicos. Estudios en polen de *Abedul* muestran que existe un aumento del contenido alergénico y de la alergenicidad de su alérgeno mayoritario de polen (Bet v1) a mayores temperaturas (Ahlholm *et al.* 1998; Buters *et al.* 2008). Los estudios realizados con seis variedades de olivo a lo largo de cinco años consecutivos (Fernandez-Caldas *et al.* 2007), muestran que la potencia alergénica total del polen (cuantificación de IgE en sueros de pacientes atópicos) correlaciona con las precipitaciones ocurridas en los meses de invierno, previos a la floración del olivo.

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en polen de siete variedades, estudiadas a lo largo de diversos años y la relación existente con variables meteorológicas (temperatura, precipitaciones, número de días de lluvia y humedad relativa) previas a la estación polínica.

Se recolectó polen de olivo de siete diferentes variedades (Arbequina, Blanqueta, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Picual, Verdial de Huévar y Verdial de Vélez). La recolección se realizó durante la estación primaveral de los años 2000 al 2007 en el banco de germoplasma de olivo de Alameda del Obispo (Córdoba). El contenido de los extractos proteícos se estandarizó a iguales concentraciones de proteína total, y se evaluó el perfil antigénico de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9, siguiendo el procedimiento SDS-PAGE e inmunotransferencia multiplex descrito anteriormente. Los datos meteorológicos fueron obtenidos de la red española de observaciones temporales de ecosistemas (REDOTE).

4.3.1 Expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en siete cultivares durante varios años.

La figura 19A muestra el gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida con tinción de plata. Los diversos paneles corresponden a las variedades estudiadas entre los años 2000 y 2007. Las bandas visualizadas se encuentran en el rango de 75 kDa a 15 kDa. Se pueden observar las variaciones en las diferentes variedades en el contenido de Ole e 1 de

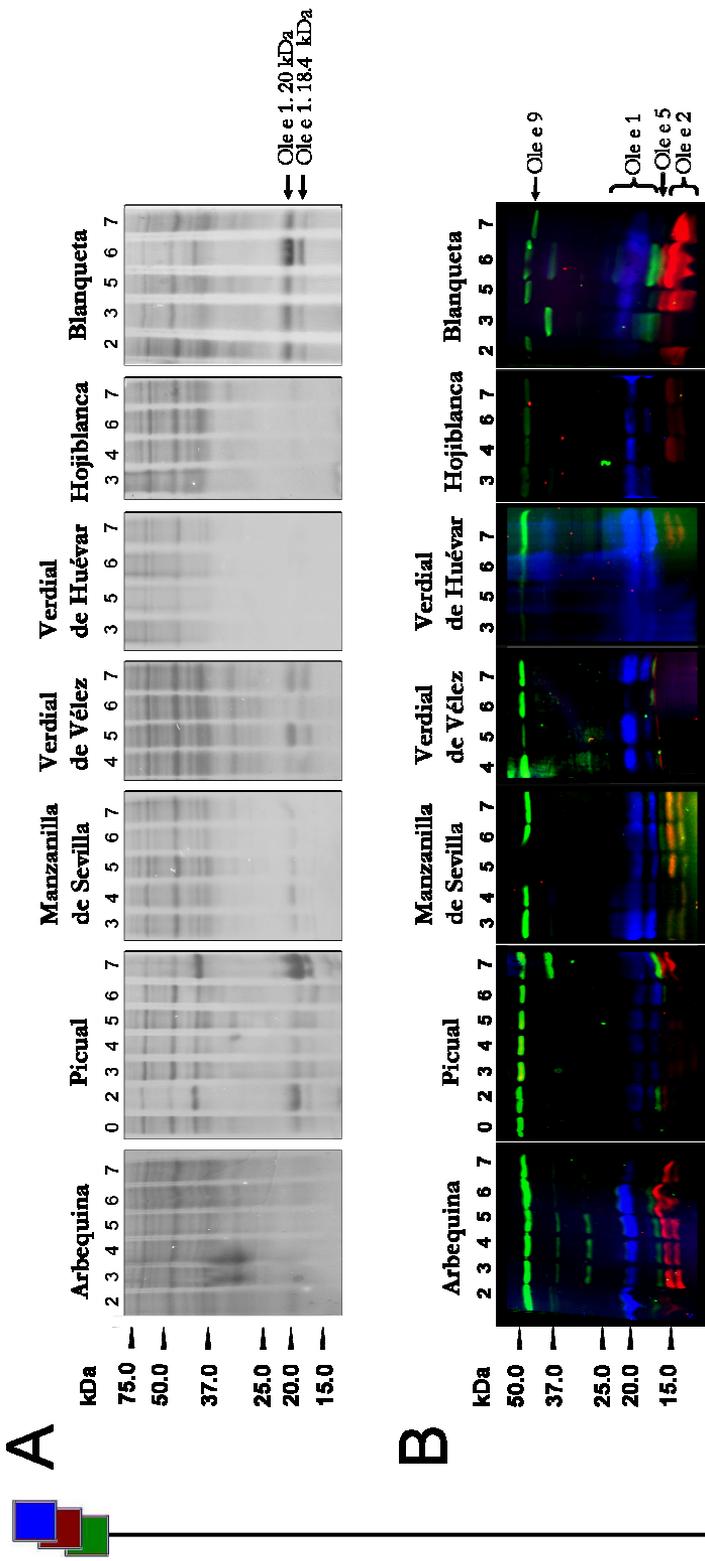


Figura 19. A) Tinción con plata de extractos totales proteicos de siete cultivares diferentes a lo largo de diversos años. **B)** Detección multiplex de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 correspondiente a los mismos extractos descritos en el panel A. Se cargaron 30 microgramos de proteína total por calle. Los números de las calles (0-7) corresponden a los años en los que se recolectó el polen (2000-2007). Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la imagen.



20 kDa y 18,4 kDa año a año, exceptuando a Arbequina, Verdial de Huévar y Hojiblanca, en las que no se pueden diferenciar claramente las bandas correspondientes a Ole e 1. El resto de los alérgenos no se diferencian bien en la tinción con plata.

El perfil antigénico se evaluó mediante inmunotransferencia multiplex (figura 19B). Las variedades Arbequina y Hojiblanca muestran dos isoformas de Ole e 1, de 20 kDa y 18,4 kDa, en contraste con el resto de variedades, en las que están presentes en mayor o menor medida las tres isoformas de Ole e 1 de 22 kDa, 20 kDa y 18,4 kDa. La existencia de diferencias en la expresión de este alérgeno dependiendo del año de recolección del polen se puede observar fácilmente.

Ole e 2 es visualizado en todas las variedades por dos bandas de tamaño 15,1 kDa y 14 kDa, exceptuando a la variedad Verdial de Vélez, en la que se visualiza únicamente la banda de 15,1 kDa. La existencia de diferencias en la expresión de Ole e 2 dependiendo del año de recolección del polen queda reflejada en las inmunotransferencias. Ole e 5 se puede observar en las variedades estudiadas. Las variedades Hojiblanca y Verdial de Huévar presentan una señal muy débil para este alérgeno. Las diferencias inter-anales en la expresión del alérgeno Ole e 5 quedan patentes de forma muy clara en las variedades Picual y Blanqueta.

Ole e 9 se puede observar en todas las variedades estudiadas, y también se muestran diferencias en el contenido de Ole e 9 dependiendo del año de recolección. Las variedades Blanqueta y Manzanilla de Sevilla evidencian estas diferencias de forma más destacada.

4.3.2 Implicación de factores ambientales en la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.

Los análisis realizados de parámetros climatológicos y expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 se llevaron a cabo individualmente para cada variedad mediante correlación de Spearman.

El análisis de correlación de Spearman entre los niveles del alérgeno Ole e 1 y diversas variables meteorológicas se muestra en la tabla 19. Se determinó una correlación significativa positiva en la variedad Blanqueta entre la expresión de isoformas de Ole e 1 y la sumatoria de ellas con la temperatura media anual acumulada (sumatoria de las temperaturas medias mensuales de los meses previos a la floración (julio-junio)). Los niveles totales del alérgeno Ole e 1 correlacionan positivamente con las temperaturas medias de meses de invierno

Resultados



(variedad Verdial de Huévar) o primavera (variedades Blanqueta, Hojiblanca).

Tabla 19. Análisis de correlación bivariada de Spearman a 2 colas de la expresión de las isoformas del alérgeno Ole e 1 y la sumatoria de éstos (CNT*mm²) con diversos parámetros climáticos. R: Coeficiente de correlación de Spearman. * Correlación significativa al nivel de P<0,05; ** P<0,01.

			Ole e 1. 22 kDa	Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Suma Ole e 1
Arbequina	Tm anual acumulada (°C)	R	----		,65	
		P			,156	
Blanqueta	Tm anual acumulada (°C)	R	,9*	1**		,9*
		P	,037	<0,001		,037
	Tm abril (°C)	R		,9*		
		P		,037		
	Tm mayo (°C)	R		,9*		
		P		,037		
Tmínima mayo (°C)	R	,9*	1**		0,9*	
	P	,037	<0,001		,037	
Hojiblanca	Tm Marzo (°C)	R	----		1**	1**
		P			<0,001	<0,001
	Tmínima marzo (°C)	R	----		1**	1**
		P			<0,001	<0,001
	Precipitación acumulada invierno (enero-marzo) (mm)	R	----	1**		
		P		<0,001		
Precipitaciones febrero (mm)	R	----	1**			
	P		<0,001			
Picual	Tmedia abril (°C)	R			,643	
		P			,119	
	Tmínima abril (°C)	R	----		,829*	
		P			,021	
	Tmáxima abril (°C)	R	----		,757*	
		P			,049	
Verdial Vélez	Nº días de lluvia agosto	R	1**		1**	1**
		P	<0,001		<0,001	<0,001
Verdial de Huévar	Tmedia febrero (°C)	R		1**	1**	1**
		P		<0,001	<0,001	<0,001
	Precipitación acumulada (enero-mayo) (mm)	R		1**	1**	1**
		P		<0,001	<0,001	<0,001
	Nº días de lluvia febrero	R	,949	,949	,949	,949
		P	,05	,05	,05	,05
	Nº días de lluvia abril	R				
		P		<0,001		
	HRm acumulada (enero-mayo) (%)	R		1**	1**	1**
		P		<0,001	<0,001	<0,001
	HRm enero (%)	R		1**	1**	1**
		P		<0,001	<0,001	<0,001
	HRm febrero (%)	R	1**			
		P	<0,001			
HRm abril (%)	R		1**	1**	1**	
	P		<0,001	<0,001	<0,001	
HRm mayo (%)	R		1**	1**	1**	
	P		<0,001	<0,001	<0,001	



(Continuación de tabla 19)

		Ole e 1. 22 kDa	Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Suma Ole e 1	
Manzanilla de Sevilla	Tm marzo (°C)	R		,8		
		P		,104		
	Tm mayo (°C)	R		,7		
		P		,108		
	Tmínima marzo (°C)	R		,9*		
		P		,037		
	Tmáxima mayo (°C)	R		,9*		
		P		,037		
	Precipitación anual acumulada (mm)	R	,9*	1**		0,9*
		P	,037	,001		,037
	Precipitaciones julio (mm)	R		,894		,894
		P		,04		,04
	Precipitaciones septiembre (mm)	R	1**			
		P	<0,001			
	Precipitaciones noviembre (mm)	R	,9*	,9*		,9*
		P	,03	,037		,037
	Precipitaciones abril (mm)	R		,9*		,9*
		P		,037		,037
	Nº días de lluvia enero	R		,9*		,9*
		P		,037		,037
Nº días de lluvia abril	R		,9*		,9*	
	P		,037		,037	
HRm anual acumulada (%)	R	1**				
	P	<0,001				
HRm diciembre (%)	R	,9*				
	P	,037				
HRm febrero (%)	R		,9*		,9*	
	P		,037		,037	

Además, se observaron correlaciones significativas positivas entre la expresión de Ole e 1 con las temperaturas en meses de primavera mínimas (variedades Blanqueta, Hojiblanca, Picual y Manzanilla de Sevilla) y máximas (variedades Picual y Manzanilla de Sevilla).

La expresión total de Ole e 1 correlaciona positivamente con la sumatoria de las precipitaciones mensuales ocurridas en meses de invierno y primavera (variedades Hojiblanca y Verdial de Huévar), así como con la sumatoria anual de la precipitación de los meses anteriores a la floración (variedad Manzanilla de Sevilla). Se manifiestan correlaciones positivas entre el nivel total del alérgeno Ole e 1 y las precipitaciones, el número de días de lluvia y la media de la humedad relativa mensual de meses anteriores a la floración.

La expresión de las bandas observadas de Ole e 2 (tabla 20) y/o la suma de éstas, correlaciona positivamente con las temperaturas medias de determinados meses de invierno (variedades Hojiblanca y Verdial de Huévar) o primavera (variedad Arbequina). Se mostraron correlaciones significativas positivas entre la expresión de Ole e 2 con

Resultados



la temperatura máxima y/o mínima de meses de primavera (variedades Arbequina y Hojiblanca).

Tabla 20. Análisis de correlación bivariada de Spearman a 2 colas de la expresión de las bandas observadas del alérgeno Ole e 2 y la sumatoria de éstas (CNT*mm²) con diversos parámetros climáticos. R: Coeficiente de correlación de Spearman.

* Correlación significativa al nivel de P<0,05; ** P<0,01.

			Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e2. 14 kDa	Suma Ole e 2	
Arbequina	Tm junio (°C)	R	,886*		,886*	
		P	,019		,019	
	Tmáxima junio (°C)	R	,886*		,886*	
		P	,019		,019	
	Precipitación invierno acumulada (enero-marzo) (mm)	R		,943**		
		P		,005		
Precipitaciones febrero (mm)	R		,943**			
	P		,005			
Hojiblanca	Tm febrero (°C)	R	1**			
		P	<0,001			
	Tmínima abril (°C)	R			,829*	
		P			,021	
	Tmáxima abril (°C)	R			,757*	
		P			,049	
	HRm acumulada (enero-mayo) (%)	R	1**			
		P	<0,001			
	HRm enero (%)	R	1**			
		P	<0,001			
	HRm mayo (%)	R	1**			
		P	<0,001			
Verdial Vélez	HRm diciembre (%)	R			1**	
		P			<0,001	
Verdial de Huévar	Tmedia enero (°C)	R		1**		
		P		<0,001		
	Precipitaciones junio (mm)	R		,775*		
		P		,041		
	Nº días de lluvia acumulados (enero-mayo)	R		1**		
		P		<0,001		
	Nº días de lluvia febrero	R	,949	,949	,949	
		P	,05	,05	,05	
	Nº días de lluvia abril	R	1**		1**	
		P	<0,001		<0,001	
	HRm acumulada (enero-mayo) (%)	R		1**		
		P		<0,001		
	HRm febrero (%)	R	1**		1**	
		P	<0,001		<0,001	
HRm abril (%)	R	1**				
	P	<0,001				
HRm mayo (%)	R	1**				
	P	<0,001				
Manzanilla de Sevilla	Precipitaciones junio (mm)	R	,949*	,949*	,949*	
		P	,014	,014	,014	
	Nº días de lluvia junio	R	,872	,872	,872	
		P	,05	,05	,05	



La expresión de una de las isoformas de Ole e 2 correlaciona positivamente con la sumatoria de las precipitaciones mensuales ocurridas en meses de invierno en la variedad Arbequina, así como las precipitaciones ocurridas en determinados meses de invierno o primavera (variedades Arbequina, Verdial de Huévar y Manzanilla de Sevilla). La isoforma de Ole e 2 de mayor peso molecular (15,1 kDa) correlaciona también con la sumatoria de la media de la humedad relativa mensual de los meses de invierno y primavera (variedades Hojiblanca y Verdial de Huévar). Así mismo, existe correlación entre los niveles totales de Ole e 2 y la sumatoria del número de días de lluvia en los meses de invierno y primavera (variedad Verdial de Huévar).

En el caso de Ole e 5 (tabla 21) se ha podido determinar una correlación positiva significativa para la temperatura mínima en el mes de mayo y las precipitaciones ocurridas en el mes de febrero en la variedad Blanqueta. En la variedad Verdial de Vélez, Ole e 5 correlaciona positivamente con el nº de días de lluvia y la humedad relativa de los meses de febrero y abril.

Tabla 21. Análisis de correlación bivariada de Spearman a 2 colas de la expresión de Ole e 5 (CNT*mm²) con diversos parámetros climáticos. R: Coeficiente de correlación de Spearman. * Correlación significativa al nivel de P<0,05; ** P<0,01.

		Ole e 5	
Blanqueta	Tmínima mayo (°C)	R	,9*
		P	,0187
	Precipitaciones febrero (mm)	R	,9 *
		P	,0037
Verdial Vélez	Nº días de lluvia febrero	R	1**
		P	<0,001
	Nº días de lluvia abril	R	1**
		P	<0,001
	HRm febrero (%)	R	1**
		P	<0,001
	HRm abril (%)	R	1**
		P	<0,001

Por otra parte, la expresión de Ole e 9 correlaciona significativamente (tabla 22) con la temperatura media de los meses de enero (variedades Arbequina, y Verdial de Huévar) y marzo (Hojiblanca). De la misma forma, el número de días de lluvia de marzo correlaciona con la expresión de Ole e 9 en las variedades Arbequina y Verdial de Vélez.



La humedad relativa media muestra relevancia significativa durante los meses de invierno correspondientes a diciembre (variedad Picual) y enero (variedad Verdial de Huévar). Adicionalmente, en esta última variedad, Verdial de Huévar, la humedad relativa media muestra correlación positiva en los meses de primavera abril y mayo.

Tabla 22. Análisis de correlación bivariada de Spearman a 2 colas de la expresión de Ole e 9 (CNT*mm²) con diversos parámetros climáticos. R: Coeficiente de correlación de Spearman. * Correlación significativa al nivel de P<0,05; ** P<0,01.

		Ole e 9	
Arbequina	Tm enero (°C)	R	,829*
		P	,042
	Nº días lluvia marzo	R	,088*
		P	,02
Hojiblanca	Tm marzo (°C)	R	1**
		P	<0,001
	Tmínima marzo (°C)	R	1**
		P	<0,001
Picual	HRm diciembre (%)	R	,857*
		P	,014
Verdial de Vélez	Nº días de lluvia marzo	R	,949
		P	,05
Verdial de Huévar	Tm enero (°C)	R	1**
		P	<0,001
	Nº días de lluvia febrero	R	,949
		P	,05
	HRm enero (%)	R	1**
		P	<0,001
	HRm abril (%)	R	1**
		P	<0,001
HRm mayo (%)	R	1**	
	P	<0,001	

Seguidamente, se muestra un ejemplo de la distribución de datos de variables meteorológicas que correlacionan significativamente con las intensidades de alérgenos. Los gráficos representan las intensidades de los alérgenos respecto a variables meteorológicas referentes a temperaturas (figura 20) y a variables tales como precipitación, humedad relativa y número de días de lluvia (figura 21). Se ha añadido una línea de referencia en los gráficos para mostrar la correlación positiva entre las variables.

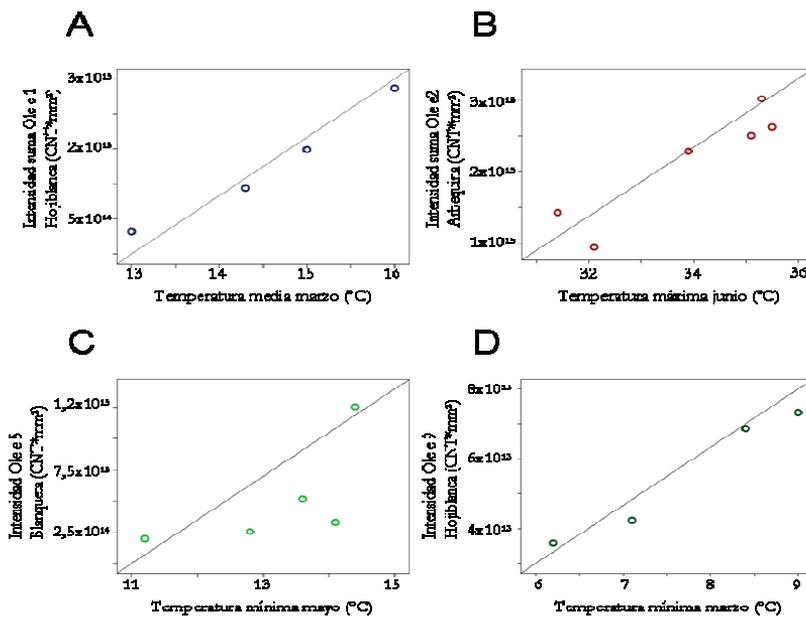


Figura 20. Gráficos de diferentes variedades mostrando la distribución de datos de las temperaturas respecto a la expresión del alérgeno A) Ole e 1, B) Ole e 2, C) Ole e 5 y D) Ole e 7.

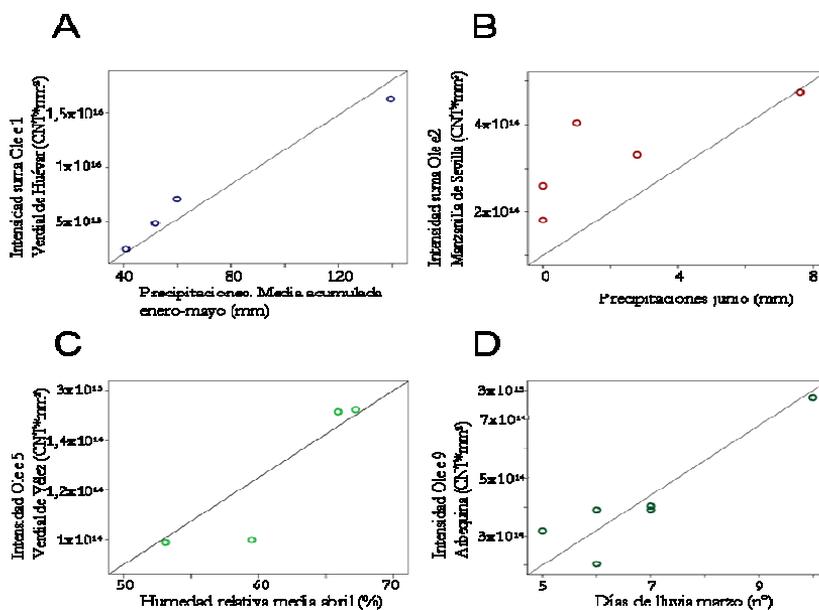


Figura 21. Gráficos de diferentes variedades mostrando la distribución de datos de las precipitaciones, humedad relativa y número de días de lluvia respecto a la expresión del alérgeno A) Ole e 1, B) Ole e 2, C) Ole e 5 y D) Ole e 9.



4.4 Caracterización de la expresión y la reactividad diferencial de las proteínas Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el polen de *Olea europaea* (cv. Picual) durante diversas etapas de su germinación *in vitro*.

Con el fin de analizar la expresión de las diferentes isoformas de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 a lo largo de la germinación *in vitro* del grano de polen del olivo (cv. Picual), se llevaron a cabo análisis de SDS-PAGE e inmunttransferencias a distintos tiempos de germinación. Para ello fue necesario proceder a la germinación *in vitro* del polen de olivo y al aislamiento del polen germinado del no germinado, así como del medio de cultivo. La iniciación de la germinación de los granos de polen de olivo se hace evidente tras una hora de cultivo, previa hidratación. Los granos de polen pasan de una forma prolada a adoptar una forma esferoidal, y se detecta la emergencia del tubo polínico por uno de sus tres poros. Después de 4 horas, se hace efectiva la separación de polen germinado y no germinado por filtración. El crecimiento del tubo polínico se observa incluso hasta 13 horas después de su cultivo *in vitro*, momento en que comienzan a degenerar los granos de polen.

El apartado A de la figura 22 ilustra, mediante tinción con plata, la evolución en SDS-PAGE de los perfiles polipeptídicos de extractos proteicos de polen de polen maduro y polen germinado *in vitro* (panel 1), polen no germinado (panel 2) y medio de cultivo (panel 3), todos ellos hasta las 13 horas de cultivo.

El apartado B de la figura 22 representa inmunttransferencias de los mismos geles correspondientes al apartado A, tras ensayar con anticuerpos anti-Ole e 1, anti-Ole e 2, anti-CuZn SOD y anti-Ole e 9.

4.4.1 Análisis de la expresión de Ole e 1 durante la germinación *in vitro* de polen de olivo

En la tinción con plata de los 3 paneles (Panel 1A, 2A y 3A) se puede observar el perfil proteico de los diversos extractos de polen. Se pueden apreciar bandas de distintas intensidades, entre las que destacan dos formas de la proteína alergénica mayoritaria del polen del olivo (Ole e 1), de 18,4 kDa y 20 kDa. Se observa una clara disminución de la intensidad de estas bandas a las 13 horas de cultivo, tanto en el panel 1A (polen en diversas etapas de germinación), como



la práctica desaparición en el panel 2A (polen no germinado) y panel 3A (medio de cultivo).

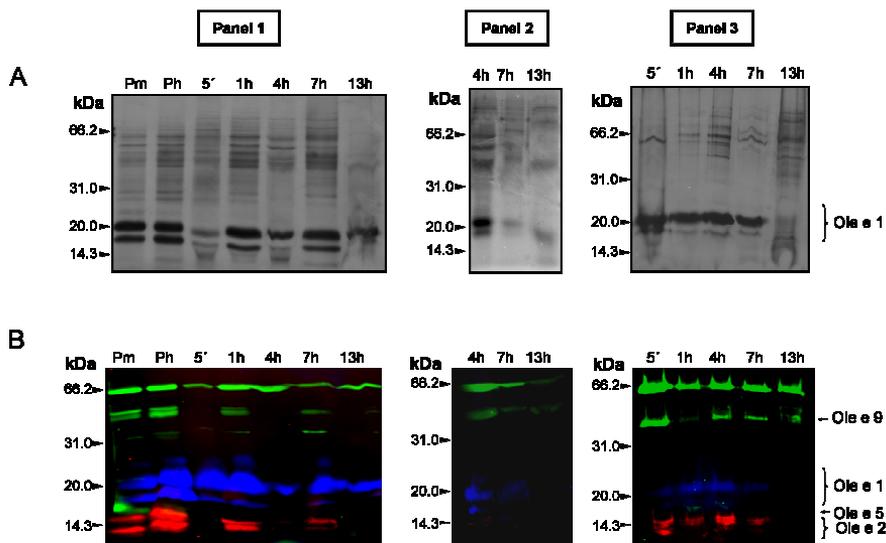


Figura 22. Germinación *in vitro* de polen de olivo durante las fases de polen maduro (Pm), polen hidratado (Ph), y desde 5 minutos (5') hasta varias horas de germinación (1h, 4h, 7h, 13h). Panel 1: Polen germinado; Panel 2: Polen no germinado; Panel 3: medio de cultivo. **A)** Tinción con plata de geles SDS-PAGE de extractos proteicos crudos, **B)** Inmunotransferencias de geles equivalentes SDS-PAGE ensayados con anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 (azul), anticuerpo policlonal de conejo anti-Ole e 2 (rojo), anticuerpos policlonales de conejo anti-CuZn-SOD y anti-Ole e 9 (verde).

Las bandas son identificables en las correspondientes inmunotransferencias, y se pueden distinguir hasta 3 bandas reactivas de Ole e 1 en los paneles 1B y 2B, cuyas masas moleculares son: 18,4 kDa (forma de Ole e 1 no glicosilada), 20 kDa (forma monoglicosilada) y 22 kDa (forma diglicosilada). El inmunoblot correspondiente a las muestras del medio de cultivo (panel 3B), presentó las formas de la proteína Ole e 1 no glicosiladas, de 18,4 kDa, y las monoglicosiladas de 20 kDa, no ocurriendo así con la forma diglicosilada de 22 kDa. Se confirman los resultados obtenidos de Ole e 1 a las 13 h de cultivo en la tinción con plata, en cuanto a la disminución (panel 1B) o desaparición (panel 2B y 3B) de este alérgeno en la fase de 13 h de germinación.



El análisis densitométrico de la expresión de cada forma de Ole e 1 se muestra en la figura 23. Los niveles de expresión, durante la germinación *in vitro* (figura 23A), varían dependiendo de la forma de Ole e 1 que se trate. La forma monoglicosilada de 20 kDa es la más abundante, apreciándose un aumento paulatino en su expresión en la fase de polen hidratado y 1 h de cultivo, hasta una caída de ésta a las 4 h de cultivo, donde se produce una notable disminución, recuperándose a las 7 h y volviendo a caer su expresión al final del cultivo (13 h). Las formas no glicosiladas (18,4 kDa) y diglicosiladas (22 kDa) presentan ciclos de aumento y disminución en su expresión, similares a las observadas para la isoforma de Ole e 1 de 20 kDa, encontrándose en su punto más álgido durante la hidratación del polen y su punto más bajo a las 4 h de cultivo, mostrándose disminuídas a los 5 minutos de cultivo, así como al final de éste (13 h).

La expresión de todas las formas de Ole e 1 en los granos de polen no germinados (figura 23B) disminuye secuencialmente, desapareciendo al final del periodo de cultivo.

En el caso de los medios de cultivo (figura 23C) se observa la presencia de las formas no glicosiladas (18,4 kDa) y de forma más abundante, las isoformas monoglicosiladas (20 kDa), apareciendo a los 5 minutos de cultivo, incrementando gradualmente su presencia hasta las 4 h, y posteriormente disminuyendo hasta su desaparición al final del cultivo.

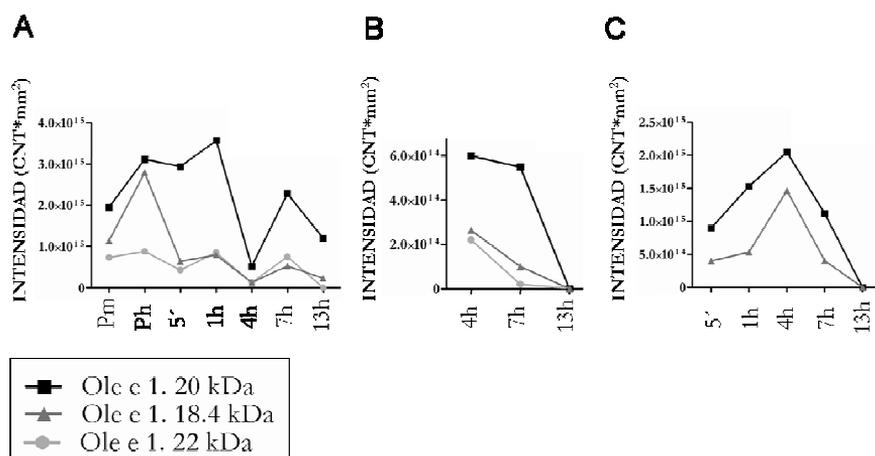


Figura 23. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 1 de 22 kDa, 20 kDa y 18,4 kDa. **A)** polen germinado **B)** polen no germinado y **C)** medio de cultivo.



4.4.2 Análisis de la expresión de Ole e 2 durante la germinación *in vitro* de polen de olivo.

En el gel teñido con plata (figura 22A) son indistinguibles las bandas para el tamaño esperado de las profilinas del olivo. Estas bandas sí son identificables en las correspondientes inmunotransferencias (figura 22B). En los tres paneles de la figura 22B (panel 1, panel 2 y panel 3) se pueden diferenciar hasta 2 bandas correspondientes a 2 isoformas de profilina, con pesos moleculares calculados de 15,1 kDa y 14 kDa. El análisis densitométrico de los niveles de las 2 isoformas de profilinas durante la germinación del polen de olivo (figura 24A) reveló un comportamiento similar para ambas. De forma alternada, se produjeron aumentos y disminuciones en los niveles de profilinas, mostrando incrementos en la etapas de hidratación y durante el cultivo a 1 hora y a las 7 h. La disminución se produjo a los 5 minutos, las 4 h y finalmente, a las 13 h se observa un descenso en los niveles de las 2 isoformas.

La expresión de Ole e 2 de 14 kDa en los granos de polen no germinados (figura 24B) disminuye secuencialmente, desapareciendo al final del periodo de cultivo. Sin embargo, la isoforma de 15,1 kDa desaparece a las 7 h de cultivo.

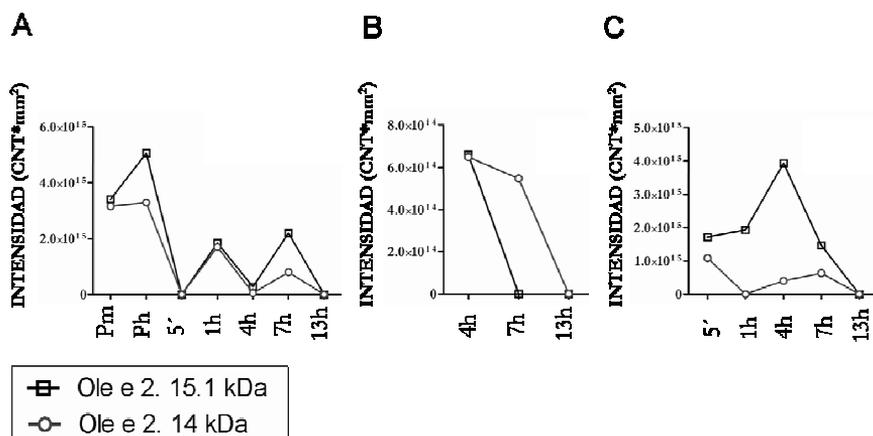


Figura 24. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 2 de 15,1 kDa y 14 kDa. **A)** polen germinado **B)** polen no germinado y **C)** medio de cultivo.

En el caso de los medios de cultivo (figura 24C) se observa la presencia de las 2 isoformas, excepto al final del cultivo, a las 13h, donde no se aprecia ninguna banda. A los 5 minutos de cultivo, se observa la gran difusión que experimenta la mayor isoforma de Ole e 2



(15,1 kDa), aumentando y siendo superada ampliamente en la etapa de 4 h, disminuyendo paulatinamente su presencia hasta su desaparición al final del cultivo. La isoforma menor de Ole e 2 (14 kDa) se detecta a los 5 minutos, y su difusión se ve disminuida drásticamente a la hora del cultivo, observándose una recuperación de la difusión durante las 4 y 7 h del cultivo, para volver a caer a las 13 h del cultivo.

4.4.3 Análisis de la expresión de Ole e 5 y otras SODs durante la germinación *in vitro* de polen de olivo.

El patrón de bandas correspondientes a Ole e 5 en el gel teñido con plata (figura 22A) no se distingue fácilmente.

Las bandas de diversas superóxido dismutasas (SODs), ensayadas con el anticuerpo policlonal de conejo contra CuZn-SOD cloroplastídicas, son identificables en las correspondientes inmunotransferencias (figura 22B). En particular, la CuZn-SOD de olivo Ole e 5, de peso molecular 16,4 kDa, se puede observar en la etapa de polen maduro e hidratado (figura 22B, panel 1), así como en el medio de cultivo (figura 22B, panel 3). Ole e 5 no es detectable en el polen no germinado (figura 22B, panel 2).

El análisis densitométrico de los niveles de CuZn-SOD de 16,4 kDa (Ole e 5) durante la germinación del polen de olivo (figura 25A), reveló un elevado nivel en polen maduro e hidratado, cayendo su expresión a los 5 minutos del cultivo, aumentando a la hora del cultivo y volviendo a caer a las 4h del cultivo, manteniéndose indetectable hasta el final de éste.

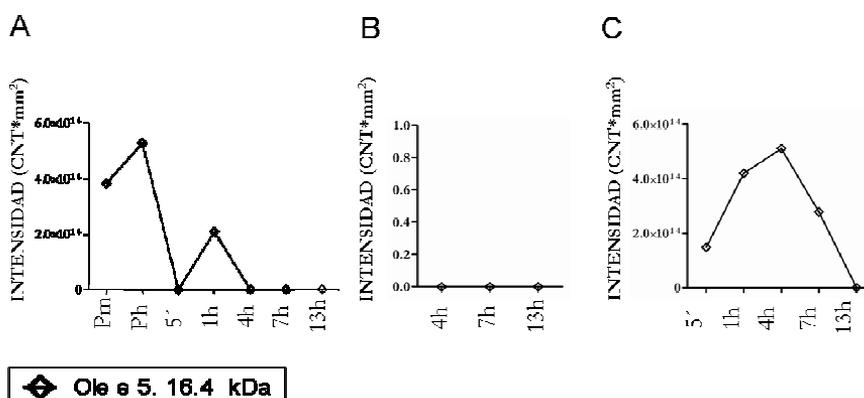


Figura 25. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 5. **A)** polen germinado **B)** polen no germinado y **C)** medio de cultivo.



En el polen no germinado (figura 25B), la expresión de Ole e 5 no se muestra representada. En el medio de cultivo (figura 25 C) se observa a Ole e 5 desde el inicio del cultivo, aumentando gradualmente hasta las 4 h, momento en que comienza a descender su presencia hasta su desaparición a las 13 h del cultivo.

4.4.4 Análisis de la expresión de Ole e 9 durante la germinación *in vitro* de polen de olivo.

En el caso de Ole e 9 se observan en la tinción con plata (figura 22A), múltiples bandas en la zona correspondiente al tamaño esperado, con lo que resulta difícil discernir Ole e 9 del resto de las bandas.

El análisis de las inmunotransferencias correspondientes a las etapas de polen en germinación (figura 22B, panel 1), polen no germinado (figura 22B, panel 2), y medio de cultivo (figura 22B, panel 3), confirma la presencia de Ole e 9 de 46 kDa. En la figura 22B, panel 1, aparece Ole e 9 en forma de dos bandas en los estadios de polen maduro, polen hidratado y 1h de germinación. Cuando Ole e 9 no se desnatura por completo, aparece esta doble banda. Una de ellas corresponde a Ole e 9 desnaturizada, y la otra banda de Ole e 9, a la que no está completamente desnaturizada.

El análisis densitométrico de polen en diversas etapas de germinación (figura 26A) revela un mayor nivel de estas proteínas al inicio del cultivo, en las etapas de polen maduro e hidratado. Después se presenta un comportamiento cíclico en su presencia, de forma que los altos niveles de Ole e 9 se muestran a 1 h y 7 h, alternando con su desaparición en las etapas de 5 minutos, 4 h y 13 h de cultivo.

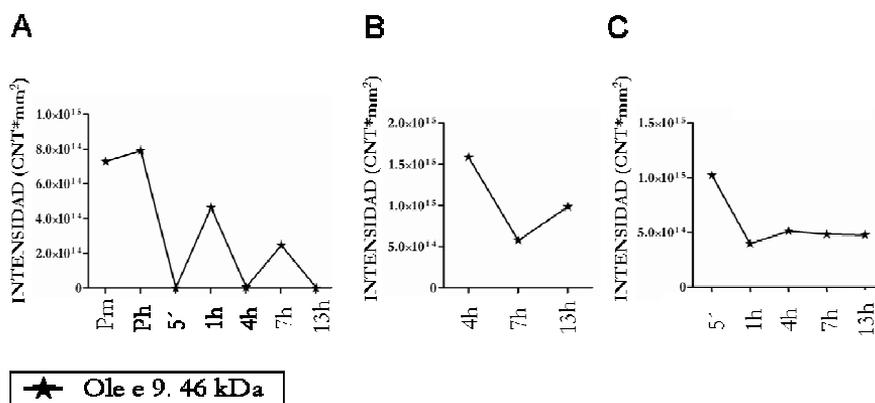


Figura 26. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 9. A) polen germinado B) polen no germinado y C) medio de cultivo.



El análisis de polen no germinado (figura 26B), refleja los mayores niveles de Ole e 9 a las 4 h del cultivo, disminuyendo posteriormente. En el caso del medio de cultivo (figura 26C), Ole e 9 tiene su máxima difusión a los 5 minutos del cultivo, bajando a la hora, y manteniéndose ese nivel hasta la finalización del cultivo a las 13 h.

Adicionalmente, se ha realizado un análisis de correlación entre los alérgenos estudiados en la germinación *in vitro* (tabla 23), y los presentes en el medio de cultivo (tabla 24). Existe un marcado patrón de correlación durante la germinación *in vitro* entre la expresión de Ole e 1 de 22 kDa y la expresión de Ole e 1 de 20 kDa, las dos isoformas de Ole e 2, de 15,1 kDa y 14 kDa, así como con Ole e 9. Además, la expresión de Ole e 1 de 18,4 kDa correlaciona significativamente con los dos alérgenos presentes de Ole e 2, con Ole e 5 y Ole e 9.

La expresión de Ole e 2 de 15,1 kDa y 14 kDa correlaciona con todos los alérgenos estudiados, exceptuando a la isoforma de Ole e 1 de 20 kDa.

La expresión de Ole e 5 durante la germinación correlaciona de forma significativa con todos los alérgenos estudiados, exceptuando a las isoformas de 22 kDa y 20 kDa de Ole e 1.

La expresión de Ole e 9 correlaciona de forma significativa con todos los alérgenos, exceptuando la isoforma de 20 kDa de Ole e 1.

Tabla 23. Análisis de correlación bivariada entre alérgenos durante su germinación *in vitro* (n=7). *La correlación es significativa al nivel de 0,05 (2 colas). **La correlación es significativa al nivel de 0,01 (2 colas). R: Coeficiente de correlación de Pearson. P: Significación. ns: valores no significativos.

		Ole e 1. 20 kDa	Ole e 1. 18,4 kDa	Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e 2. 14 kDa	Ole e 5	Ole e 9
Ole e 1. 22 kDa	R	,794*	,663	,802*	,770*	,677	,803*
	P	,033	ns	,030	,043	ns	,030
Ole e 1. 20 kDa	R		,552	,451	,450	,448	,467
	P		ns	ns	ns	ns	ns
Ole e 1. 18,4 kDa	R			,888**	,827*	,904**	,766*
	P			,008	,022	,005	,045
Ole e 2. 15,1 kDa	R				,944**	,914**	,926**
	P				,001	,004	,003
Ole e 2. 14 kDa	R					,968**	,993**
	P					,000	,000
Ole e 5	R						,935**
	P						,002



El análisis por correlación bivariada de la difusión de los alérgenos en el medio de cultivo (tabla 24) establece un patrón similar de difusión entre los alérgenos Ole e 1 de 20 kDa y los alérgenos Ole e 1 de 18,4 kDa, Ole e 2 de 15,1 kDa y Ole e 5.

La isoforma de Ole e 1 de 18,4 kDa correlaciona de forma significativa con la isoforma de Ole e 1 de 20 kDa y con la isoforma de Ole e 2 de 15,1 kDa.

La isoforma de Ole e 2 de 15,1 kDa, coincide en su patrón tanto con las isoformas de Ole e 1 de 20 kDa y 18,4 kDa, como con Ole e 5.

Tabla 24. Análisis de correlación bivariada entre alérgenos en el medio de cultivo durante su germinación *in vitro* (n=6). *La correlación es significativa al nivel de 0,05 (2 colas). **La correlación es significativa al nivel de 0,01 (2 colas). R: Coeficiente de correlación de Pearson. P: Significación. ns: valores no significativos.

		Ole e 1. 18,4 kDa	Ole e 2. 15,1 kDa	Ole e 2. 14 kDa	Ole e 5	Ole e 9
Ole e 1. 20 kDa	R	,898*	,946*	,099	,980**	-,156
	P	,039	,015	ns	,003	ns
Ole e 1. 18,4 kDa	R		,980**	,093	,858	-,099
	P		,003	ns	ns	ns
Ole e 2. 15,1 kDa	R			,209	,888*	,009
	P			ns	,044	ns
Ole e 2. 14 kDa	R				-,086	,855
	P				ns	ns



4.5 Aplicaciones clínicas prácticas.

Determinación de la antigenicidad y alergenidad de distintos extractos comerciales procedentes de distintos cultivares. Agrupación del germoplasma analizado de acuerdo a los niveles de alérgenos en cada una de las variedades.

La variabilidad cuantitativa y cualitativa de los alérgenos está escasamente representada en los extractos comerciales de polen de olivo, usados para la diagnosis y el tratamiento de la alergia. Además, los procedimientos para preparar los extractos se basan en la medida de la potencia biológica del extracto (medida de IgE total), pero no explican la contribución de cada alérgeno.

Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar la antigenicidad y alergenidad de distintos extractos comerciales utilizados para diagnosis e inmunoterapia, procedentes de distintos cultivares. Se ha seguido el método multiplex, permitiendo la cuantificación de los alérgenos estudiados en cada extracto y comprobar la reactividad presentada a determinados alérgenos por los sueros de un conjunto de pacientes. Adicionalmente, se procedió a la agrupación del germoplasma analizado en el capítulo 4.2, de acuerdo a los niveles de alérgenos en cada una de las variedades, con el fin de simplificar los test de vacunas estandarizados y diagnosticar de forma personalizada a los pacientes alérgicos a polen de olivo.

4.5.1 Detección multiplex y cuantificación de alérgenos procedentes de extractos comerciales de seis cultivares, usados para diagnosis e inmunoterapia.

Los seis extractos comerciales estudiados muestran una notable variabilidad en el contenido alérgico (figura 27). Las variedades Picual y Cornicabra y Lechín muestran niveles elevados de las isoformas de Ole e 1 de 18,4 kDa y 20 kDa, mientras que los niveles de los demás cultivares fueron menores, especialmente, en el caso del extracto genérico *Olea europaea*, en los que los niveles de Ole e 1 fueron prácticamente indetectables. Además, la isoforma de 22 kDa de este alérgeno se detectó como una banda débil en las variedades Picual y Cornicabra y en el extracto genérico.

Ole e 2 también mostró diferencias entre cultivares, tanto en número como en cantidad de isoformas alérgicas. Las variedades se podrían agrupar en dos categorías según su contenido en Ole e 2. Las variedades de alto contenido corresponderían a Arbequina, Verdial y



Lechín y las de bajo contenido serían Picual, Cornicabra y el extracto genérico de *Olea europaea*.

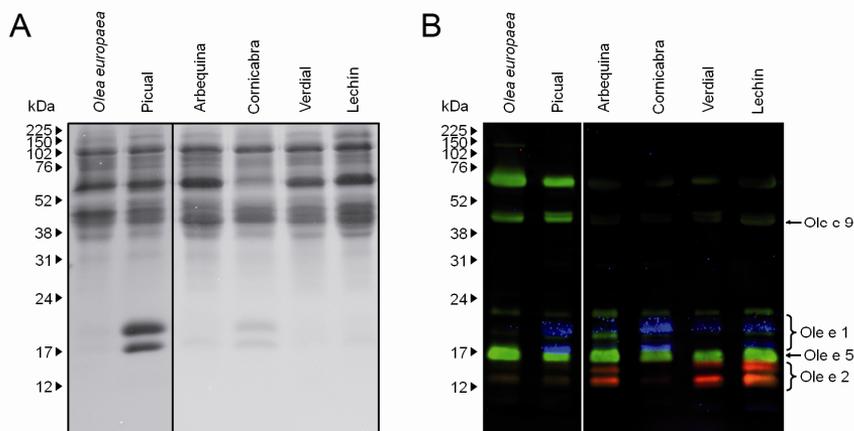


Figura 27. A) Tinción con plata de extractos comerciales totales de polen de olivo de cinco diferentes cultivares de olivo y un extracto total genérico de olivo, de origen varietal desconocido. **B)** Detección multiplex fluorescente de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 sobre la misma inmunotransferencia. Se cargaron treinta microgramos de proteína total por calle. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de cada imagen.

Además, se observan diferencias cualitativas. Se detectaron tres isoformas de Ole e 2 con peso molecular estimado de 14,0, 15,1 y 15,6 kDa en Lechín y Picual. La isoforma de 15,6 kDa estuvo ausente en Arbequina, Picual, Cornicabra y en el extracto genérico. Por otra parte, la isoforma de 15,1 kDa no se detectó en Cornicabra y Verdial. Ole e 9 se detectó en todos los cultivares analizados y se encontraron diferencias cuantitativas. La mayor intensidad de señal fluorescente se observó en Picual y en el extracto genérico, mientras que en el resto de las variedades Ole e 9 se encuentra escasamente representada. Finalmente, Ole e 5 se detectó en todos los cultivares en cantidades similares.

La intensidad de fluorescencia de cada banda detectada en la inmunotransferencia multiplex (figura 27B) se midió para cuantificar los niveles relativos de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en los seis extractos de polen analizados. La cuantificación de cada isoforma proteica y la suma de ellas se muestran en la figura 28 para los cuatro alérgenos estudiados.

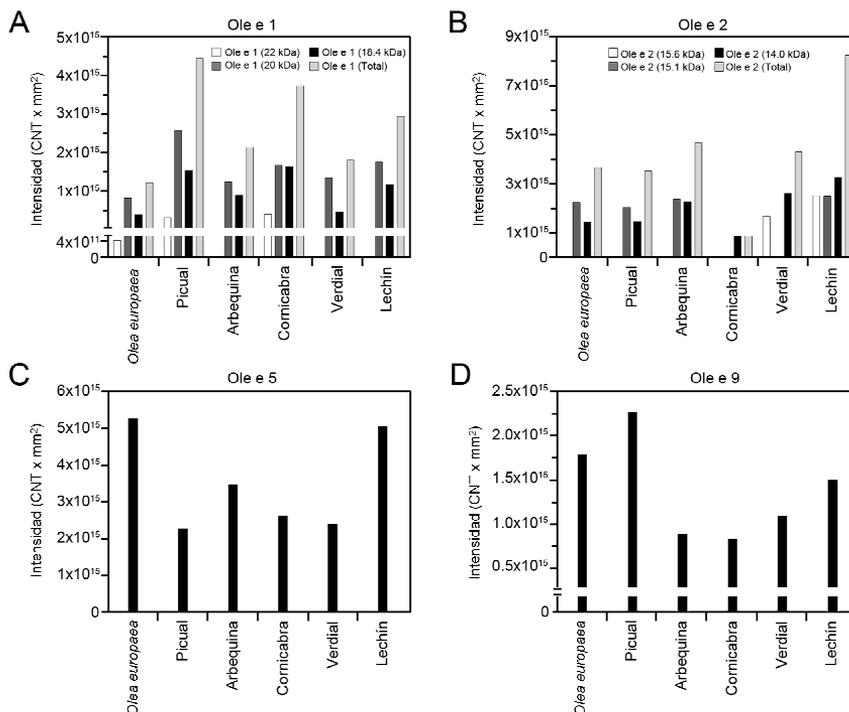


Figura 28. Análisis cuantitativo de los alérgenos Ole e 1 (A), Ole e 2 (B), Ole e 5 (C) y Ole e 9 (D) detectados en la inmunotransferencia de la figura 27B. La intensidad de la señal fluorescente se midió por densitometría y se expresa en cuentas (CNT) por unidad de superficie (mm²).

4.5.2 Reactividad a IgE procedente de un conjunto de sueros de pacientes hipersensibles a polen de olivo frente a proteínas de polen de olivo.

La alergenidad de proteínas del polen de olivo en los seis cultivares se ensayó estudiando mediante inmunotransferencias su capacidad de enlace a IgE. Para ello, la misma membrana utilizada anteriormente se probó con un conjunto de sueros de ocho pacientes hipersensibles al polen de olivo y la reacción se detectó por quimioluminiscencia. El patrón de IgE enlazada a proteínas de cada cultivar se mostró en la figura 29A. La incubación con sueros reveló hasta siete bandas reactivas con pesos moleculares desde 10,3 a 74,2 kDa. Los resultados muestran diferencias entre cultivares, en número e intensidad de las proteínas enlazadas a IgE. El extracto comercial genérico no mostró ninguna inmunoreactividad a los sueros. En la variedad Picual, se



observaron dos bandas intensas de 18,4 y 20 kDa. Estas mismas bandas fueron observadas con menor intensidad en la variedad Cornicabra. El espectro de las proteínas alergénicas en los extractos de Arbequina y Lechín incluyen una proteína de 10,3 kDa, mostrando la mayor reactividad al conjunto de sueros y a otras cuatro bandas, bastante menos intensas, de alto peso molecular. Finalmente, Verdial mostró bandas inmunoreactivas coincidentes con las observadas para Arbequenina y Lechín, pero todas exhibían una señal muy débil.

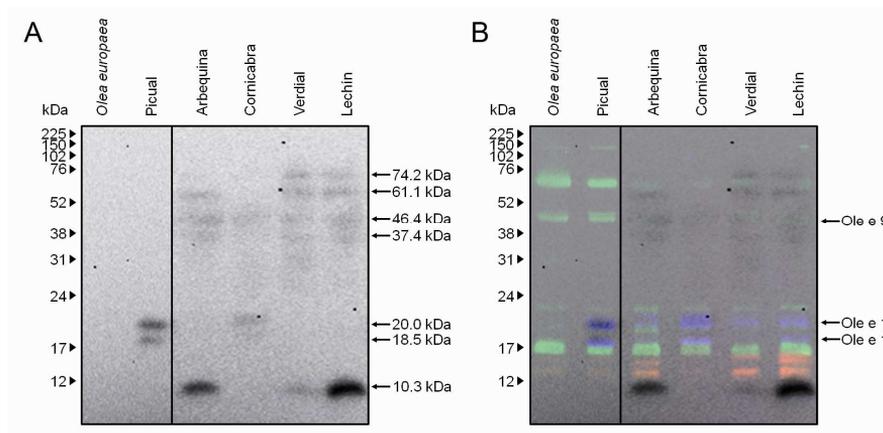


Figura 29. A) Análisis de la capacidad de enlace de IgE a proteínas totales de polen de olivo procedentes de extractos comerciales de cinco variedades y un extracto genérico de olivo (*Olea europaea*) por inmunotransferencia. La membrana utilizada para la detección multiplex se reprobó con un conjunto de sueros de pacientes alérgicos a polen de olivo. Las siete bandas reactivas con pesos moleculares de 10,3 a 74,2 kDa se visualizaron en la membrana tras su detección por quimioluminiscencia. **B)** Superposición de bandas reactivas a IgE y bandas detectadas en el experimento multiplex. Tres de las siete proteínas reactivas a IgE se identificaron como dos isoformas de Ole e 1 y el alérgeno Ole e 9. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de cada imagen.

La identidad de algunas de las proteínas enlazantes a IgE se confirmó fácilmente solapando las imágenes multiplex y quimioluminiscente obtenidas de la misma inmunotransferencia (Figura 29B). Las bandas de 18,4 y 20 kDa inequívocamente corresponden a las isoformas no glicosiladas y mono-glicosiladas de Ole e 1, mientras que la banda de 46 kDa se identificó como Ole e 9. Las restantes cinco bandas no solaparon con ninguna de las bandas mostradas en el experimento multiplex. Se podría especular que la banda de 10,3 kDa correspondería a Ole e 7 o Ole e 10, ya que ambos alérgenos tienen masas moleculares similares (Barral *et al.* 2005; Tejera *et al.* 1999).



Adicionalmente, las proteínas de 37,4 kDa deben corresponder al alérgeno Ole e 11, caracterizado recientemente (Salamanca *et al.* 2010). Se visualizaron dos bandas adicionales de alto peso molecular, pero no se encontró correspondencia a ningún alérgeno de olivo descrito hasta la fecha.

4.5.3 Agrupación de las variedades estudiadas en el capítulo 4.2 según su contenido en los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.

Con el fin de simplificar los extractos de polen de olivo de variedades a utilizar en diagnóstico e inmunoterapia específica se ha propuesto una agrupación del germoplasma de variedades de olivo estudiado en el capítulo 4.2. A partir de las intensidades obtenidas de cada alérgeno en dichas variedades (capítulo 4.2, figura 11,12 y 13) se generó una tabla de agrupación de éstas (tabla 25) según su contenido alérgénico relativo total de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.

Tabla 25. Agrupación de variedades dependiendo de la sumatoria de las intensidades relativas de las bandas de un alérgeno. Los alérgenos tienen asignado el nº 1 cuando presentan un bajo contenido del alérgeno y se indica con el nº 2 un contenido intermedio-alto total del alérgeno.

Ole e 1	Ole e 2	Ole e 5	Ole e 9	Grupo	Variedades
1	1	1	1	1	Arbequina, Bella de España, Chetoui, Koroneiki.
1	1	2	1	2	Changlot real, Cornicabra, Dolce agogia, híbrido.
1	1	2	2	3	Domat, Gallega, Gordal de Sevilla, híbrido 2-67.
1	2	1	1	4	Frantoio
1	2	1	2	5	Manzanilla de Jaén, Morisca, Híbrido 39-51.
1	2	2	2	6	Ouvo di Piccione, Picholine, Verdial de Alcaudete.
2	1	1	1	7	Acebuche, Coratina, Cornezuelo, Picual.
2	1	1	2	8	Aceitera, Mesky.
2	1	2	1	9	Blanqueta, Macho de Jaén, Nevadillo.
2	1	2	2	10	Olivo Macho.
2	2	1	1	11	Caninese.
2	2	1	2	12	Aybalik, Ayoruni, Verdial de Vélez, Villalonga.
2	2	2	1	13	Farga, Picholine marrocaíne.
2	2	2	2	14	Híbrido 40-52, Híbrido 41-54, Hojiblanca, Izmir sofralik, Kalamon, Leccino, Lechin de Granada, Lechin de Sevilla, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Morrut, Negrillo de Estepa, Pajarero, Picudo, Rosciola, Sevillena, Sourani, Verdial de Badajoz, Verdial de Huévar



Se calcularon los terciles de la distribución de datos de la sumatoria de intensidades relativas para cada alérgeno (mostrado en capítulo 4.2, tabla 11). Para simplificar la agrupación de cultivares, se dió el valor 1 a la intensidad relativa del alérgeno que se encuentra en el primer tercil de datos, correspondiente a una baja expresión del alérgeno. El valor 2 se otorga a las intensidades relativas de los alérgenos incluidos en el tercil 2 y 3 de la distribución, correspondiendo en este caso a valores de expresión medios o altos de los alérgenos estudiados.

Las variedades que integran el grupo 1 representan a aquéllas con menor contenido alergénico conjunto de los alérgenos estudiados (variedades Arbequina, Bella de España, Chetoui y Koroneiki). Las correspondientes al grupo 14 son aquéllas con el mayor contenido conjunto de los alérgenos estudiados. En particular, destacan en este grupo las variedades Morrut y Picudo. El resto de grupos representa las combinaciones posibles en número y nivel de alérgenos.



4.6 Aplicación del sistema multiplex a la localización simultánea de alérgenos a nivel celular, mediante microscopía confocal sobre el grano de polen de olivo de la variedad Picual durante su germinación y adaptación del método para microscopía electrónica.

El estudio de los alérgenos del polen de olivo es una de las claves para comprender los procesos alérgicos en pacientes hipersensibles a éstos y buscar una alternativa terapéutica. Por otra parte, muchas de las proteínas alergénicas son consideradas esenciales en la fisiología del polen y por tanto, en la fisiología de la reproducción sexual del olivo. La localización celular y la organización de estas proteínas pueden ofrecer pistas sobre su papel biológico. La metodología habitual para el estudio de la distribución celular de las proteínas alergénicas y de otros antígenos, se basa en la inmunolocalización indirecta con anticuerpos primarios procedentes de una especie animal y una segunda ronda con anticuerpos secundarios contra dicha especie, conjugados con fluorocromos en microscopía de fluorescencia (MF) o partículas de oro en microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, se pueden revelar simultáneamente múltiples antígenos tras el uso de anticuerpos primarios procedentes de diferentes especies y sus correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos de características espectrales diferenciadas (MF) o con partículas de oro de diferente tamaño (TEM). Sin embargo, los estudios de inmunolocalización indirecta múltiple a menudo necesitan ensayarse con anticuerpos primarios procedentes de la misma especie. En este caso, se debe prevenir la interferencia entre diferentes rondas de anticuerpos secundarios contra la misma especie.

El objetivo del presente capítulo fue la aproximación al papel biológico de diversas proteínas alergénicas en el polen, adaptando el método multiplex para la múltiple localización de estos antígenos a microscopía confocal y electrónica. El método adaptado está basado en la aplicación de fragmentos Fab (Morales *et al.* 2010), usados como agentes bloqueantes y como anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos y su base se ha descrito en el capítulo 4.1 .

Seguidamente, se presentan resultados de inmunolocalización indirecta simple y resultados finales de inmunolocalización múltiple por adaptación del método multiplex, usando anticuerpos primarios procedentes de la misma especie sobre granos de polen de la variedad de olivo Picual.



4.6.1 Inmunolocalización simple sobre polen de olivo del alérgeno Ole e 1 durante la germinación del polen mediante CLSM.

El estudio en detalle de la expresión de Ole e 1 en el grano de polen se realizó mediante inmunolocalización durante diversas etapas de la germinación *in vitro* del polen, a microscopía láser confocal de fluorescencia (CLSM), siguiendo un procesamiento de muestra de alta permeabilización para facilitar el acceso de los anticuerpos (figura 30).

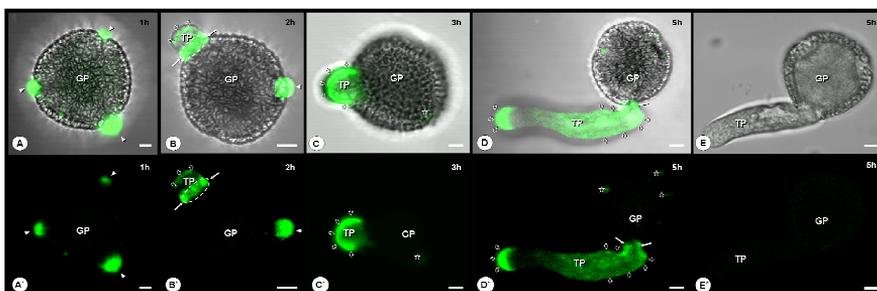


Figura 30. Localización de Ole e 1 en el grano de polen germinado *in vitro* por inmunofluorescencia a CLSM, tras procedimientos de alta permeabilización, que incluyen digestión de pared celular. La señal de Ole e 1 se muestra a diferentes tiempos durante el cultivo. La señal se localiza en **A-A'** las aperturas (puntas de flecha) a 1 h de la incubación **B-B'** las aperturas (puntas de flecha), en la zona apertural rodeando al tubo polínico (flechas largas), y en el extremo apical del tubo polínico (flechas huecas) a 2 h de la incubación, y **C-D** y **C'-D'** en la región apical y proximal del tubo polínico (flechas huecas), en la región apertural (flechas largas) y en la pared del grano de polen (estrellas) a 3 h y 5 h de incubación. **D, D'** Controles negativos que no muestran señal.

(A–D) CLSM, proyección de 30 secciones ópticas y luz transmitida. E) CLSM de una única sección y luz transmitida. (A'-D') CLSM, proyección de 30 secciones ópticas. GP: grano de polen, TP: tubo polínico. Barras: 5 μ m.

La figura 30 A y A' muestra que la expresión de Ole e 1 ocurre en las tres regiones aperturales del polen de olivo, en el inicio de la incubación. Tras 2 h de incubación, se observa la emergencia del tubo polínico, en el que la señal fluorescente se localizaba intensamente en la región apertural rodeando al tubo polínico (flechas largas, figura 30 B y B'), observándose un leve marcado en la región apical del tubo polínico, indicado con flechas huecas en las mismas figuras. Pasadas 3h del cultivo, la señal de Ole e 1 se muestra intensamente en la región apical del tubo polínico y más débilmente en la región proximal (figura 30 C y C'). Esta localización de Ole e 1 apical y proximal en el tubo polínico se mantiene durante la elongación del tubo (figura 30 D y



D'). Además se muestra marcado en la pared del grano de polen, indicado con estrellas (figura C-D, C'-D'). No se encontró marcado en el control negativo preparado por omisión del anticuerpo primario en el procedimiento de inmunolocalización (figura 30E).

4.6.2 Inmunolocalización sobre polen de olivo de la variedad Picual del alérgeno Ole e 2 (profilina) y su ligando, actina, durante la germinación *in vitro* del polen.

El proceso de elongación del tubo polínico es muy rápido y es dependiente de la presencia de un citoesqueleto dinámico de actina. Ole e 2 es una profilina del polen de olivo. Las profilinas son proteínas enlazantes a actina, que puede tener un efecto positivo o negativo en la polimerización de actina, promoviendo el ensamblaje de filamentos de actina (por liberación de monómeros de actina unida) o inhibiéndolo (por secuestro de monómeros de actina).

El objetivo de este trabajo fue describir la distribución intracelular de profilina y actina en el grano de polen maduro de olivo a través de las primeras etapas de la germinación del polen.

Inmunolocalización simple de Ole e 2 en granos de polen germinando in vitro mediante CLSM.

Para determinar la localización de profilina se realizó una inicial localización con procedimientos convencionales de fijación celular, seguido por una permeabilización suave de la membrana e inmunomarcado usando un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Cy3 (figura 31). Se observa un marcado de Ole e 2 en forma de estructura anular, localizado alrededor de la región apertural correspondiente a la apertura por la cuál emerge el tubo polínico, sin observarse marcado en las restantes dos aperturas (figura 31A y A'). Además, el marcado se muestra en la pared del grano de polen y en el medio de germinación. Los granos de polen no hidratados o en los que no ha emergido el tubo polínico no muestran señal en su superficie, y tampoco muestran el marcado en forma de estructura anular. El interior del grano de polen y del tubo polínico no mostraron fluorescencia. Los controles negativos no mostraron marcado fluorescente (figura 31B y B').

La penetración de los reactivos se mejoró mediante un protocolo de procesamiento de muestra con pasos adicionales de fijación, digestión celular con enzimas y permeabilización con una solución de DMSO y



el detergente NP-40. Mediante el uso de este protocolo, el marcado fluorescente de profilina se observó en las tres regiones aperturales del grano de polen en las primeras etapas de la germinación *in vitro* del polen (1h), (figura 32A y A').

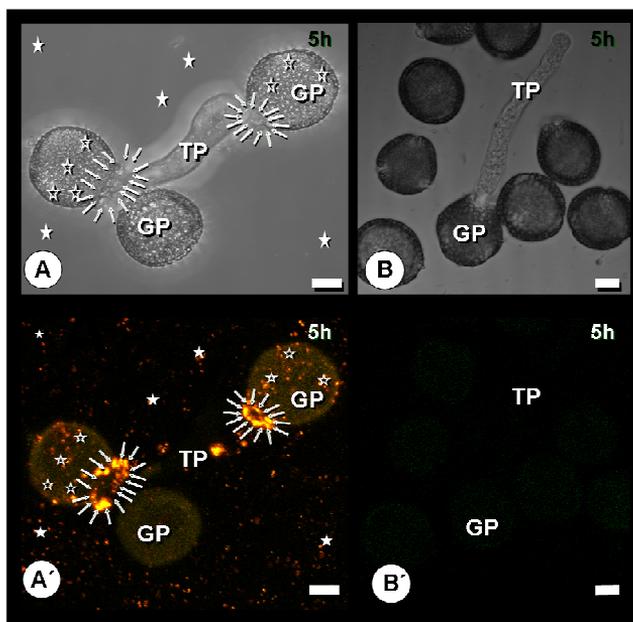


Figura 31. Inmunolocalización a CLSM del alérgeno Ole e 2 (profilina) en polen de olivo cultivado *in vitro* con procesamiento convencional de muestras. **A-A')** La señal fluorescente de profilina se observa alrededor de la región apertural por la que emerge el tubo polínico, formando una estructura anular (flechas). La fluorescencia se observa también en la exina del polen (estrellas huecas) y en el medio de cultivo (estrellas llenas) de los granos de polen en germinación. La fluorescencia no se observó en tubos polínicos. **B-B')** Los controles negativos no muestran fluorescencia significativa.

(A-B) CLSM, proyección de 30 secciones ópticas y luz transmitida. (A'-B') CLSM, proyección de 30 secciones ópticas. GP: grano de polen, TP: tubo polínico. Barras: 10 µm.

El marcado no es igual de intenso en las tres aperturas, una de ellas muestra un mayor marcado que las dos restantes. Esto fue particularmente evidente cuando las proyecciones ópticas seriadas del grano de polen completo se analizaron por secciones individuales (figura 32A-B, A'-B'). Tras 5 h de cultivo *in vitro* del polen (figura 32C y C') se observa una emergencia suficiente del tubo polínico del grano de polen como para comprobar el marcado diferencial por regiones. El tubo polínico se muestra marcado en su región apical y en el



citoplasma cercano a la apertura. El marcado dentro del grano de polen no se observó en ninguna de las etapas estudiadas. Tras el uso de este protocolo extendido, se hizo significativa la disminución de señales presentes en la exina del polen y en el medio de cultivo, respecto del protocolo convencional. Así mismo, se redujo el marcado en estructura anular alrededor de la apertura de emergencia del tubo polínico. La intensidad de marcado en estas estructuras externas fue dependiente de la intensidad y duración de los pasos de lavado incluidos en el protocolo. Los controles negativos no mostraron fluorescencia (figura 32D y D')

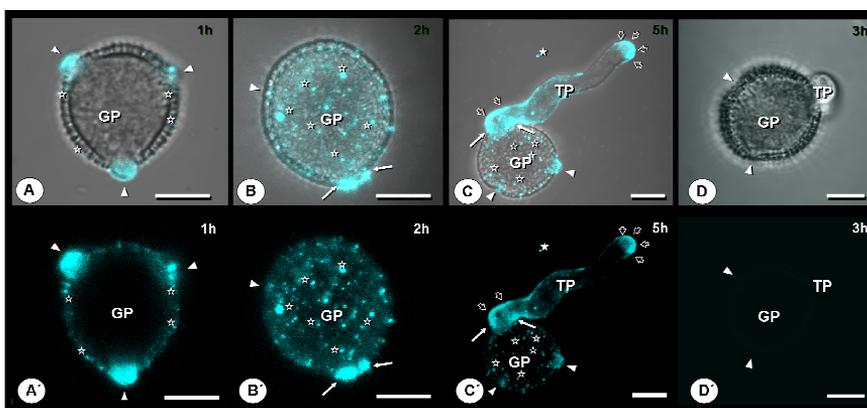


Figura 32. Inmunolocalización de profilina en preparaciones de polen de olivo cultivado *in vitro* tras el uso de un protocolo extendido que incluye digestión de pared celular y alta permeabilización de membrana. (A–C y A'–C') El marcado de profilina se observa a diferentes tiempos tras el cultivo (1 h, 2 h y 5 h) en las aperturas (puntas de flecha) y en la exina del polen (estrellas huecas). El tubo polínico muestra una intensa fluorescencia en la zona de emergencia (flechas estrechas, figura B-C, B'-C') y en las áreas apical y basal (flechas gruesas, figura C y C'). El medio de cultivo presenta marcado fluorescente (estrellas llenas, figura C y C'). Los controles negativos no presentan fluorescencia significativa (figura D y D').

(A) CLSM y luz transmitida de una sección individual (B–D) CLSM, proyección de 30 secciones ópticas y luz transmitida. (A') CLSM de una sección individual. (B'–D') CLSM, proyección de 30 secciones ópticas. Ap: Apertura, GP: grano de polen, TP: tubo polínico. Barras: 10 μ m.

Inmunolocalización simple de actina en granos de polen germinando in vitro mediante CLSM.

La actina fue inmunolocalizada siguiendo el protocolo extendido de fijación, digestión enzimática y permeabilización. Durante las primeras etapas del cultivo *in vitro*, correspondientes a la hidratación del polen y la emergencia inicial del tubo polínico (1–3 h), la actina se localizó en



las tres regiones aperturales del grano de polen. No se observó marcado en la exina del polen o en el interior del grano de polen (Figura 33A-B, A'-B'). Tras la emergencia del tubo polínico (figura 33C y C') se observaron acumulaciones importantes de actina en el citoplasma del tubo polínico, particularmente en la región apical y en el área inmediatamente próxima a la apertura. Algunas acumulaciones estuvieron presentes en las proximidades del núcleo generativo. Los microfilamentos de actina no se pudieron discernir en el tubo polínico. No se observó fluorescencia en los controles negativos (figura 33D y D').

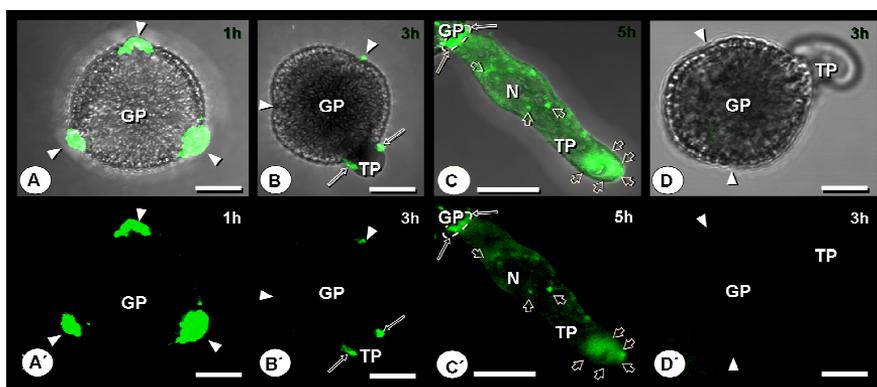


Figura33. Inmunolocalización a CLSM de actina en preparaciones de polen de olivo cultivado *in vitro* después de un tratamiento extendido de fijación, digestión celular y permeabilización de membrana. (A–C y A'–C') La actina se localiza a diferentes tiempos tras el cultivo (1 h, 3 h y 5 h) en las aperturas (puntas de flecha en figuras A–B y A'–B'). En la figura C y C' se observa que el tubo polínico muestra marcado en las áreas apical y basal (flechas gruesas y flechas estrechas, respectivamente. Algunos puntos de fluorescencia se hicieron visibles en el citoplasma, sin embargo, no se visualizaron filamentos individualizados. El núcleo generativo no muestra fluorescencia. Los controles negativos no mostraron fluorescencia (figura D y D'). (A–D) CLSM (secciones ópticas, excepto (C), la cuál es una proyección de 30 secciones ópticas, solapadas con luz transmitida. (A'–C') CLSM (secciones ópticas excepto (C), la cuál es una proyección de 30 secciones ópticas. N: núcleo, GP: grano de polen, TP: tubo polínico. Barras: 10 μ m.

4.6.3 Inmunolocalización multiplex usando anticuerpos contra Ole e 1 (anti-ratón), Ole e 2 y Ole e 9 (anti-conejo, ambos procedentes de la misma especie).

Este estudio muestra la inmunolocalización múltiple usando fragmentos Fab para marcado y bloqueo de anticuerpos primarios. La aplicación de los fragmentos Fab ha permitido realizar ensayos en los



que se utilizan anticuerpos primarios policlonales procedentes de las mismas especies (anti-Ole e 2 y anti-Ole e 9 de conejo) mediante CLSM (Figura 34), junto con el uso de un anticuerpo primario contra una especie diferente (anti-Ole e 1 de ratón). Las condiciones de trabajo, incluyendo la concentración de fragmentos Fabs, las concentraciones de los restantes anticuerpos utilizados y los tiempos de incubación han sido cuidadosamente adaptados para cada anticuerpo de interés, verificándose la no existencia de interferencias entre anticuerpos.

La figura 34 muestra la localización mediante CLSM de los diferentes alérgenos en preparaciones de polen de olivo germinado *in vitro* durante 4 h. El alérgeno Ole e 1 (Figura 34A, mostrado en verde) está presente de forma abundante en la región apical del tubo polínico (flechas gruesas), y como punteado fluorescente en el citoplasma del tubo polínico (flechas estrechas). El alérgeno es abundante también en la exina del polen (puntas de flecha) y en la zona próxima a la apertura de emergencia del tubo polínico (estrellas). La localización de Ole e 2 (profilina) en el mismo grano de polen se muestra en la figura 34B mostrado en amarillo. En este caso, el alérgeno co-localiza con Ole e 1 en la región apical del tubo polínico (flechas gruesas) y en diversos puntos de la zona apertural de emergencia del tubo polínico (estrellas). Además, se observa marcado en el citoplasma del polen en diversos puntos (flechas estrechas), co-localizando algunos de éstos con el marcado de Ole e 1. También aparece un marcado leve en la exina del polen (puntas de flecha). El marcado de Ole e 9 en el mismo grano de polen (figura 34C, mostrado en azul) es muy escaso y prácticamente limitado a la región apical del tubo polínico (flechas gruesas), a la zona de emergencia del tubo polínico (estrellas) y a la exina del grano de polen (puntas de flecha). Las regiones aperturales aparecen marcadas en las tres imágenes, con diferente intensidad y localización de los alérgenos. La figura 34D muestra la superposición de las tres imágenes obtenidas, observándose el marcado de los tres alérgenos en la zona apical del tubo polínico (flechas gruesas) y en la región de emergencia del tubo polínico (estrellas). La figura 34E muestra la misma imagen superpuesta con luz transmitida. Los experimentos de localización individual de los tres alérgenos mostraron una localización similar (mostrados en apartados anteriores para Ole e 1 y Ole e 2). Los controles negativos preparados por omisión de los anticuerpos primarios no mostraron fluorescencia bajo las mismas condiciones de captura de imagen (no se muestran estos resultados).

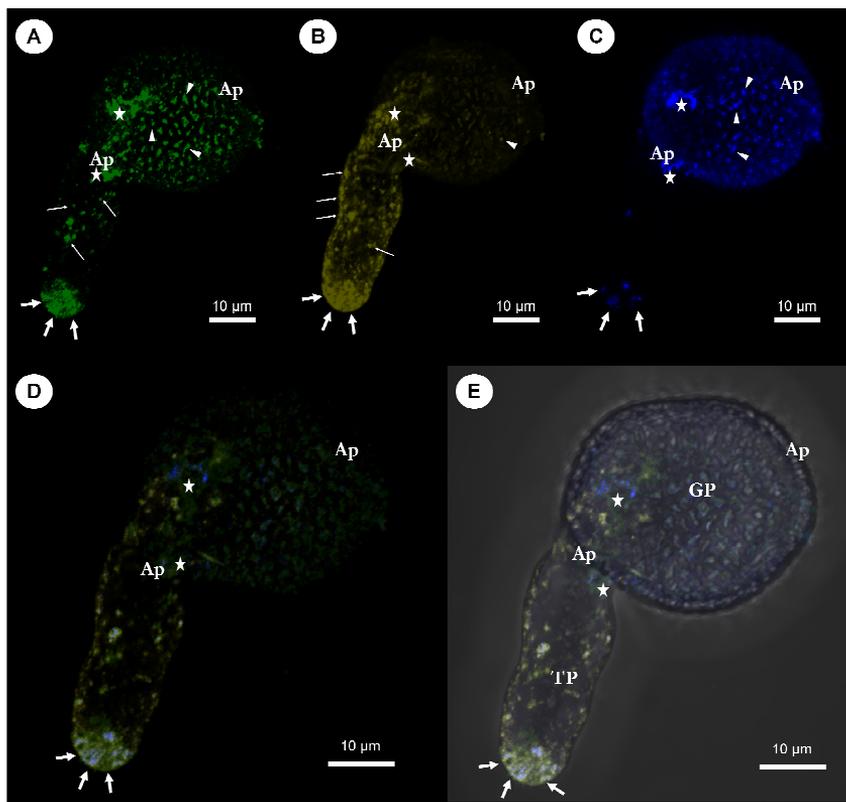


Figura 34. Localización simultánea de tres diferentes alérgenos mediante CLSM en preparaciones *in vitro* de granos de polen de olivo germinado durante 4 h. **A)** Localización del alérgeno Ole e 1 usando un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488; mostrado en verde. **B)** Localización del alérgeno Ole e 2 usando un fragmento Fab conjugado con Cy3; mostrado en amarillo. **D)** Localización del alérgeno Ole e 9 con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 633; mostrado en azul. **D)** Imagen de la superposición de las imágenes correspondientes a los tres alérgenos. **E)** Imagen de la superposición de los tres alérgenos y luz transmitida en el mismo grano de polen. Las imágenes son el resultado de la proyección de 30 secciones ópticas. Ap: apertura, GP: grano de polen, TP: tubo polínico. Flechas estrechas: marcado presente en el citoplasma del tubo polínico. Flechas gruesas: marcado presente en la región apical del tubo polínico. Puntas de flecha: marcado observado en la exina del polen. Estrellas: marcado del tubo polínico en la región cercana a la apertura.



4.6.4 Inmunolocalización simple de profilinas y actina a TEM en granos de polen.

Se realizaron inmunolocalizaciones de profilina en granos de polen maduro y germinado *in vitro*. Además se localizó actina en granos de polen maduro. Las secciones de polen mostraban una ultraestructura bien preservada.

Inmunolocalización simple de profilinas a TEM en granos de polen maduro.

Las partículas de oro de 15 nm en el grano de polen maduro se mostraron distribuídas uniformemente a lo largo del citoplasma de la célula vegetativa (figura 35A).

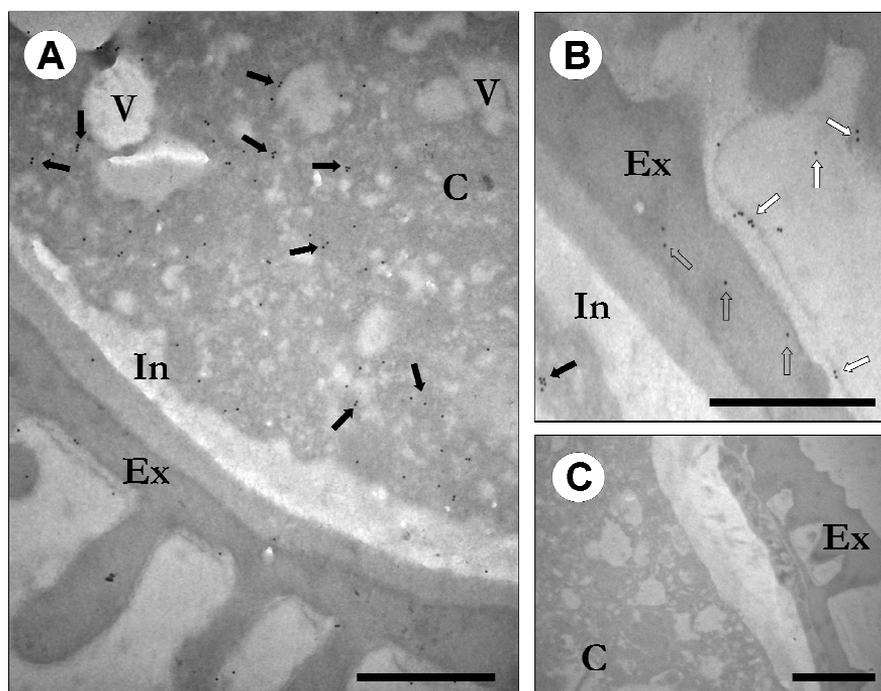


Figura 35. Inmunolocalización de profilinas mediante TEM sobre secciones ultrafinas de granos de polen maduro. **A)** Citoplasma de la célula vegetativa mostrando partículas de oro (flechas negras llenas). **B)** Detalle de la pared del grano de polen mostrando partículas de oro en la exina (flechas huecas) y en el material adherido a la exina (flechas blancas llenas). **C)** Sección correspondiente al control negativo en el que se omitió el anticuerpo anti-profilina. C: citoplasma, Ex: exina, In: intina, V: vesícula. Barras: 1 μ m.



Las membranas y los compartimentos delimitados por éstas (orgánulos, vesículas y vacuolas) no se mostraron marcados. La profilina se localizó ampliamente en la exina del polen, particularmente, en la ectexina y en el material adherido externamente a la pared del grano de polen. La intina se mostró prácticamente libre de partículas de oro (figura 35B). Los controles negativos no mostraron marcado de partículas de oro (figura 35C).

Inmunolocalización simple de profilinas a TEM en granos de polen germinados.

La figura 36 muestra la inmunolocalización de profilina durante las primeras etapas de la germinación.

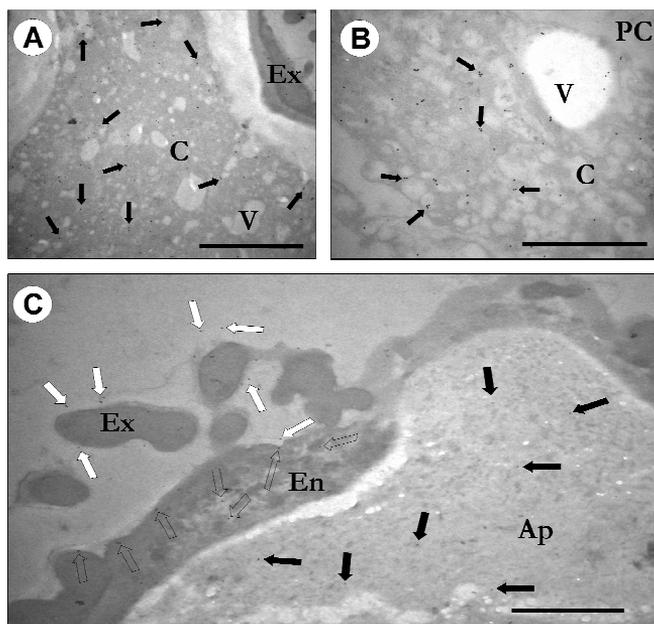


Figura 36. Inmunolocalización a TEM de profilina sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo en germinación. **A)** Citoplasma de la célula vegetativa y citoplasma de la región proximal del tubo polínico. El marcado con oro se extiende a lo largo del citoplasma del tubo polínico. **B)** Detalle del citoplasma del tubo polínico. Las partículas de oro se localizan uniformemente en el citoplasma y están prácticamente ausentes en vacuolas y vesículas. **C)** Región apertural mostrando un intenso marcado con oro en el citoplasma (flechas negras llenas). El marcado incluye una numerosa cantidad de partículas de oro en la endexina de la región apertural (flechas huecas). El material adherido a la ectexina también muestra un intenso marcado con partículas de oro (flechas blancas llenas).

Ap: apertura, PC: pared celular, C: citoplasma, En: endexina, Ex: exina, V: vesícula. Barras: 1 μ m.



Los tubos polínicos mostraron una localización abundante y homogénea de partículas de oro de 15 nm en su citoplasma, como continuación del citoplasma de la célula vegetativa (figura 36A). El marcado en vesículas u organelas del tubo polínico fue insignificante. La pared del tubo polínico no mostró apenas partículas de oro (figura 36B).

Las partículas de oro se observaron acumuladas en la región apertural correspondiente a la zona de emergencia del tubo polínico. En esta región que delimita la zona de apertura se mostró una numerosa cantidad de partículas de oro en la exina, tanto en la ectexina como en la endexina (figura 36C).

Inmunolocalización simple de actina a TEM en granos de polen maduro.

Las partículas de oro en el grano de polen maduro se mostraron distribuidas a lo largo del citoplasma de la célula vegetativa (figura 37A).

Las orgánulos, vesículas y vacuolas no se mostraron marcados. La actina se mostró ausente en la intina y la exina del polen. Los controles negativos no mostraron marcado de partículas de oro (figura 37B).

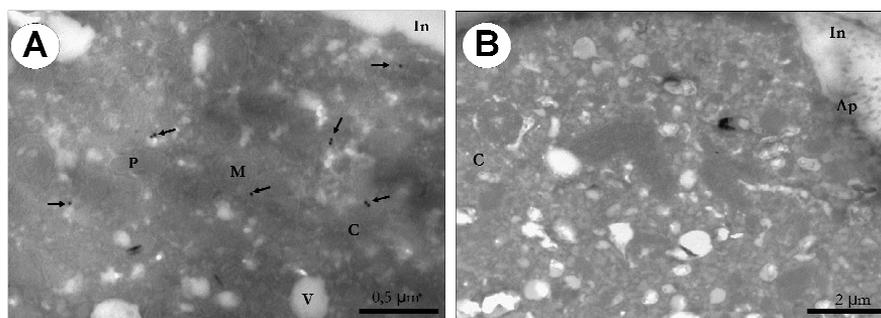


Figura 37. Inmunolocalización a TEM de actina sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo maduro. **A)** La imagen muestra el citoplasma de la célula vegetativa marcado con oro de 20 nm (flechas). El marcado está ausente en orgánulos, vacuolas y vesículas. **B)** Sección correspondiente al control negativo en el que se omitió el anticuerpo anti-actina. C: citoplasma, V: vacuola, M: mitocondria, P: plastidio, In: intina, Ap: apertura.

4.6.5 Inmunolocalización simple de Ole e 9 a TEM en granos de polen maduro.

En el grano de polen maduro, Ole e 9 se localizó en el citoplasma de la célula vegetativa (figura 38A). El mismo resultado, con una



concentración mayor de Ole e 9, se observó en la proximidad de la apertura del grano de polen (figura 38B). En esta misma zona, el marcado se extendió a vacuolas y a la intina de la región apertural (figura 38B). No se observaron partículas de oro en los controles negativos preparados omitiendo el anticuerpo primario (figura 38C).

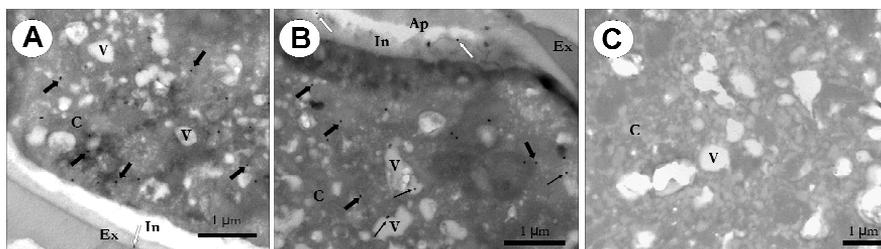


Figura 38. Inmunolocalización a TEM de Ole e 9 sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo maduro. **A)** Las partículas de oro (30 nm) se encontraron distribuidas por el citoplasma de la célula vegetativa (flechas negras). La exina mostró un escaso marcado (flecha blanca). **B)** Imagen mostrando una de las regiones aperturales del grano de polen. Se muestra el marcado en el citoplasma (flechas negras anchas), en vacuolas (flechas negras estrechas) y en la pared de la región apertural (flechas blancas). **C)** Los controles negativos omitiendo el anticuerpo primario no presentaron marcado. C: citoplasma, V: vacuola, Ap: apertura, Ex: exina, In: intina.

4.6.6 Inmunolocalización múltiple a TEM usando anticuerpos contra actina (anti-ratón), Ole e 2 y Ole e 9 (anti-conejo, ambos procedentes de la misma especie) en granos de polen maduro.

La localización simultánea de actina y de los alérgenos Ole e 2 y Ole e 9 a TEM se muestran en la figura 39. Las imágenes a bajo aumento (Figuras 39A y B) indican que todas las partículas de oro se encuentran esparcidas en el citoplasma de la célula vegetativa y en la exina del grano de polen. La mitocondria, el núcleo, y la intina del polen están libres de marcado. Las imágenes a alto aumento muestran una mejor discriminación del marcado (figura 39C). Las pequeñas partículas de oro (20 nm) indican la presencia de actina, con localización exclusivamente citoplasmática. La presencia de los alérgenos Ole e 2 y Ole e 9 visualizados por medio de partículas grandes y medianas (40 y 30 nm, respectivamente) es mucho más ubicua y se encuentran presentes a lo largo del citoplasma de la célula vegetativa (figura 39C), así como en diferentes estratos de la exina del polen (Figura 39B y C). Existe una marcado de Ole e 9 en algunas vacuolas (figura 39C). Esta localización se mostró similar a la presentada en experimentos independientes (en apartados anteriores). Los controles negativos preparados por omisión de los anticuerpos primarios no mostraron marcado (no se muestran estos resultados).

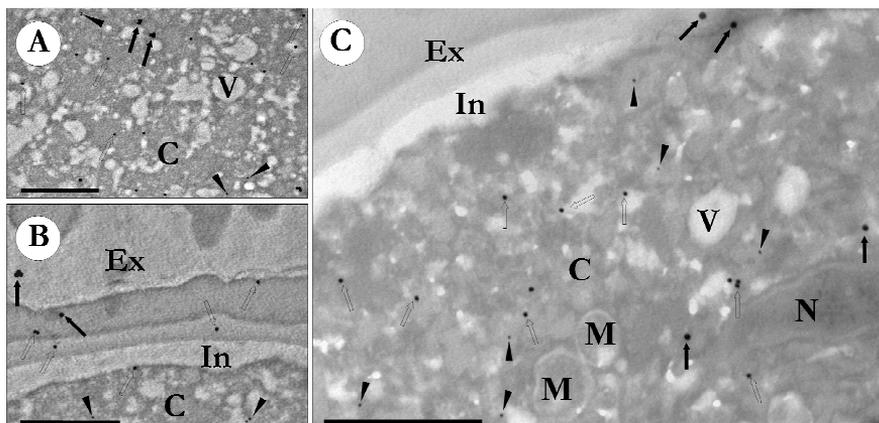
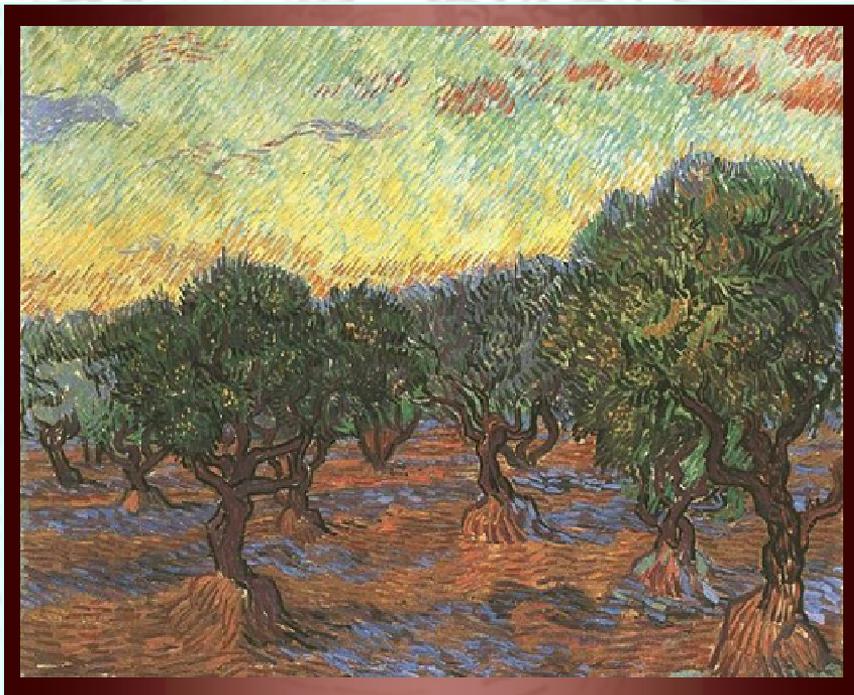


Figura 39. Inmunolocalización múltiple de actina y de los alérgenos Ole e 2 y Ole e 9 sobre secciones ultrafinas de granos de polen maduro. **A)** Vista a bajo aumento del citoplasma de la célula vegetativa. El marcado está restringido al citoplasma de la célula vegetativa. Algunas vesículas muestran marcado correspondiente a Ole e 9. **B)** Detalle a bajo aumento de la pared del polen de olivo. El marcado de partículas de oro correspondientes a Ole e 2 y Ole e 9 está presente en la exina. La intina no muestra marcado. **C)** Imagen de alto aumento del citoplasma de la célula vegetativa y la pared del polen. Los orgánulos y las vacuolas presentan una ausencia de marcado de Ole e 2 con partículas de oro. Sin embargo, se presenta marcado de Ole e 9 en vacuolas. Ole e 2 y Ole e 9 están ampliamente distribuidos a lo largo del citoplasma. La actina se observa también ampliamente distribuida en el citoplasma. C: Citoplasma, Ex: exina, In: intina, M: mitocondria, N: núcleo vegetativo, V: vacuola. Flechas negras llenas: Ole e 2 (profilina) (40nm); flechas huecas: Ole e 9 (30 nm); puntas de flecha: actina (20 nm). Barras: 1 μ m.

}

DISCUSIÓN



Van Gogh. *Olive Grove: Orange Sky*
Saint-Rémy: November, 1889
Göteborg Konstmuseum
Göteborg, Sweden, Europe



5.1 El método multiplex es una herramienta versátil en la detección de múltiples antígenos en polen de olivo, independientemente del origen de la especie de los anticuerpos.

El desarrollo del método multiplex para la detección simultánea de alérgenos, independientemente del origen de la especie de los anticuerpos, ha mostrado ser una herramienta simple, rápida y con grandes ventajas. Se ha aplicado a inmunotransferencias (IT), inmunolocalizaciones sobre material completo en microscopía confocal (CLSM) y se ha adaptado para las inmunolocalizaciones en secciones a microscopía electrónica de transmisión (TEM). La cuantificación de proteínas es precisa, al utilizar fluorocromos con un amplio rango dinámico (IT), los antígenos solapantes se discriminan fácilmente (IT y CLSM), la adquisición de imagen se lleva a cabo por escaneo secuencial (IT y CLSM) o fotografía (TEM) en un único paso, los anticuerpos primarios procedentes de las mismas especies se pueden ensayar simultáneamente con los obtenidos de diferentes especies y la cantidad de proteína o muestra necesaria para los ensayos es mínima. Además, este método podría ser aplicado al estudio de otros alérgenos en el polen de olivo y en otras especies de plantas alergénicas.

Un primer paso para demostrar la detección de múltiples proteínas, incluso cuando los anticuerpos primarios proceden de la misma especie, es el uso de la inmunolocalización directa con anticuerpos primarios directamente conjugados con fluorocromos o partículas de oro de diferentes tamaños (Tsurui *et al.* 2000). Sin embargo, los anticuerpos primarios requeridos no están habitualmente disponibles comercialmente como conjugados y la unión covalente entre los anticuerpos primarios y el conjugado correspondiente no es un protocolo rutinario en la mayoría de los laboratorios. Además, este método requiere grandes cantidades de anticuerpos purificados y no es práctico debido a su baja sensibilidad para la detección de niveles endógenos de proteínas (Mao and Walker 2002). Así mismo, para mantener abierta la posibilidad de alternar sistemas de detección, es a menudo necesario disponer de una colección de anticuerpos primarios conjugados con diferentes fluorocromos o partículas de oro de diversos tamaños. Estos factores determinan que la mayoría de los laboratorios elijan el método indirecto para los experimentos de inmunolocalización múltiple (Ferri *et al.* 1997; Staines *et al.* 1988). La inmunolocalización indirecta de antígenos hace que no sean necesarios los pasos de enlace covalente de anticuerpos primarios con



fluorocromos, enzimas o partículas de oro que consumen tiempo, son caros y podrían modificar químicamente la capacidad antigénica del anticuerpo primario (Kim *et al.* 2008; Makrides *et al.* 2005; Xing *et al.* 2007). Además, en la inmunolocalización indirecta se necesita un número limitado de anticuerpos secundarios que sean complementarios al pequeño número de especies animales utilizadas habitualmente para la producción de anticuerpos. En dichos ensayos indirectos, en los cuales el anticuerpo secundario conjugado reconoce a anticuerpos primarios no conjugados, los procedimientos son sencillos, siempre que los anticuerpos primarios procedan de diferentes especies, debido a que los anticuerpos secundarios son capaces de distinguir entre los primarios. Sin embargo, en algunos casos, los experimentos de inmunolocalización múltiple requieren la utilización de anticuerpos desarrollados en la misma especie.

Para solventar este problema, en este trabajo se desarrolló la detección múltiple de antígenos mediante el uso de fragmentos Fab, que son capaces de saturar completamente el anticuerpo primario utilizado, además de bloquear su reconocimiento por un anticuerpo secundario usado en la inmunodetección de un segundo antígeno (Negoescu *et al.* 1994).

La inmunolocalización indirecta con anticuerpos procedentes de la misma especie se ha aplicado en los experimentos de esta tesis para la detección de anticuerpos policlonales mediante ciclos de incubación con anticuerpos primarios y secundarios. El bloqueo completo de los sitios de enlace para los anticuerpos primarios procedentes de la misma especie que los utilizados en posteriores incubaciones ha sido el proceso crítico para una detección específica. Para ello, se han aplicado fragmentos Fab conjugados con fluorocromos (CLSM e IT) para el marcado y fragmentos no conjugados para el bloqueo de los sitios libres de los anticuerpos primarios. Los fragmentos Fab tienen un único sitio de unión a las regiones Fc o F(ab')₂ de una inmunoglobulina IgG. De esta forma, los fragmentos monovalentes Fab (con o sin conjugar) hacen imposible la captura del anticuerpo primario de las próximas rondas de incubación.

En contraposición, los métodos de inmunolocalización de fragmentos Fab tienen una serie de inconvenientes potenciales. En un limitado número de casos, los fragmentos Fab se podrían disociar de la inmunoglobulina (anticuerpo primario) y asociarse a otra, comprometiendo la especificidad (Kattah *et al.* 2006). En el caso de su



utilización para bloqueo, es posible que ocurra un bloqueo incompleto de inmunoglobulinas (anticuerpos primarios) con fragmentos Fab (Nielsen *et al.* 1987). Además, el uso de las concentraciones saturantes de los fragmentos en el bloqueo debe estar asegurado. Sin embargo, ninguno de estos efectos adversos han sido apreciados en nuestros ensayos.

Método multiplex en inmunotransferencias.

Los trabajos previos realizados en inmunotransferencias siguiendo métodos indirectos de inmunolocalización de múltiples antígenos, independientemente de la especie de procedencia de los anticuerpos, fueron desarrollados por Krajewski y colaboradores (Kaufmann *et al.* 1987). Este procedimiento, llamado “MAD inmunoblotting” detectaba secuencialmente múltiples antígenos en una única membrana de inmunotransferencia, evitando pasos de lavado y eliminación de anticuerpos o el uso de réplicas. El anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado con peroxidasa, seguido de una detección por quimioluminiscencia y exposición a un film fotográfico. Posteriormente, los complejos antígeno-anticuerpo sobre la membrana se ensayaban con un sustrato cromogénico (3,3'-diaminobenzidina, siglas DAB; o el sustrato SG (nombre comercial de Vector labs, Inc.) lo que hacía que los complejos que participaban en las reacciones basadas en la peroxidasa fuesen incapaces de reaccionar en siguientes exposiciones a sustratos de peroxidasa en los secuenciales ensayos de la misma membrana. Una variación de este método, llamada esta vez “Rainbow Western” se ha desarrollado recientemente por los mismos autores (Krajewski 2009), usando cuatro diferentes sustratos de enzimas (por ejemplo sustratos para peroxidasa) que producen precipitados de colores marrón, negro, rojo y verde. Sin embargo, ambos métodos tienen una serie de limitaciones. Los sustratos de enzimas (ej. DAB) precipitan, pudiendo bloquear epítomos no solapantes de la misma proteína o la detección de otros antígenos en la membrana. Además, los tratamientos repetitivos con H₂O₂ dañan algunos epítomos de proteínas. La detección simultánea con este método es únicamente posible cuando las proteínas antigénicas presentan pesos moleculares muy diferentes y no se superponen en la membrana. Finalmente, la cuantificación entre extractos proteicos es demasiado cambiante debido a la baja reproducibilidad de las reacciones enzimáticas.

Las novedades metodológicas en el ensayo multiplex en membranas para inmunotransferencia se resumieron en dos conceptos:



Primero, el uso de fragmentos Fab como anticuerpos secundarios para el bloqueo de anticuerpos primarios procedentes de la misma especie. En un estudio pionero, Martín y colaboradores (Martín *et al.* 2003) utilizaron fragmentos Fab conjugados con enzimas para el bloqueo y detección de antígenos simultáneamente. Para ello, ensayaron los fragmentos conjugados con enzimas en exceso. Sin embargo, el uso de fragmentos Fab conjugados en exceso producía manchas desdibujadas, particularmente cuando el antígeno se hallaba presente en cantidades altas. Este efecto hace complicada la distinción de antígenos cercanos unos de otros en la misma membrana. Con la presente metodología descrita para multiplex se resuelven estos problemas, ya que la detección y el bloqueo se llevaron a cabo de forma separada, usando fragmentos Fab conjugados y no conjugados con fluorocromos, respectivamente. Por otra parte, se observó que los tiempos largos de incubación y/o un exceso de fragmentos Fab no conjugados disminuían la señal fluorescente previa de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos contra la misma especie ya enlazados a su correspondiente primario, a causa de que ambos compiten por el mismo anticuerpo primario. Para evitar este efecto, es esencial optimizar la concentración y los tiempos de incubación de los fragmentos Fab no conjugados usados para el bloqueo.

Segundo, los alérgenos se detectan simultáneamente usando anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos, comercialmente disponibles y con una alta diversidad de rangos de excitación y emisión. Las interferencias entre diversos ensayos fluorescentes se minimiza por el uso de diferentes fluorocromos conjugados con anticuerpos secundarios, excitándose con diferentes líneas de láser y emitiendo a diferentes longitudes de onda, captadas por diversos filtros de emisión, permitiendo la separación de las longitudes de onda de emisión. Además, los fluorocromos presentan un amplio rango dinámico y las imágenes se capturan con un densitómetro de alta sensibilidad. Debido a ello, las señales pueden ser separadas espectralmente, usando láseres de emisión y filtros apropiados de emisión, y se pueden obtener cuantificaciones precisas por análisis volumétrico de las intensidades de emisión a partir de una única imagen digital.

El estudio sobre membranas para inmunotransferencias se centró en cuatro proteínas alérgicas, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9. Sin embargo, se puede extender el análisis a un alto número de alérgenos u



otras proteínas, independientemente del origen de la especie del anticuerpo, usando una combinación de fluorocromos compatible con plataformas de detección equipadas con un mayor número de filtros de emisión y excitación. Además, esta metodología multiplex para inmunotransferencias podría desarrollarse en experimentos de electroforesis 2-D, aumentándose la resolución y la detección de isoformas de alérgenos.

Método multiplex en microscopía láser confocal.

Uno de los métodos utilizados para solventar el problema de las interferencias en la detección de múltiples antígenos, cuando los anticuerpos contra éstos proceden de la misma especie, es la selección de anticuerpos primarios monoclonales de diferentes clases o subclases de inmunoglobulinas y dirigir a los anticuerpos secundarios contra el correspondiente isotipo. Este procedimiento ha sido desarrollado para microscopía de fluorescencia convencional (Buchwalow *et al.* 2005). Sin embargo los diferentes isotipos de anticuerpos primarios monoclonales no están de forma general disponibles comercialmente. Además, el uso de los anticuerpos policlonales en los laboratorios está más extendido que los monoclonales y normalmente los anticuerpos policlonales contienen una diversidad de clases y subclases de anticuerpos. En estos casos, el uso de anticuerpos secundarios específicos contra cada clase o subclase de primarios policlonales no debe ser efectivo.

El primer trabajo en microscopía de fluorescencia donde se utilizaron dos anticuerpos procedentes de la misma especie (monoclonales diferentes de ratón) y fragmentos Fab, éstos se utilizaron en exceso conjugados con fluorocromos para bloquear y marcar simultáneamente (Wessel and McClay 1986). Este artículo fue la base para que diversos autores desarrollaran detecciones ensayando anticuerpos primarios procedentes de la misma especie y fragmentos Fab, utilizados en exceso, conjugados con fluorocromos o enzimas fostatasa alcalina y peroxidasa (Negoescu *et al.* 1994) y desarrollados mediante fluorescencia, quimioluminiscencia o colorimetría. Una aproximación a la utilización de fragmentos sin conjugar para el bloqueo de anticuerpos primarios monoclonales (ratón) se realizó de forma que tras la primera ronda de anticuerpos primarios y secundarios, se usaron inmunoglobulinas inespecíficas de ratón (bloqueo de los sitios libres del anticuerpo secundario marcado con fluorocromo) y después fragmentos Fab sin conjugar (bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas y del anticuerpo primario) (Lewis Carl



et al. 1993). Otra técnica reciente y muy ingeniosa ha sido usada por diversos autores. Consiste en usar complejos preformados de anticuerpos primarios con fragmentos Fab o F(ab')₂ como complejo reactivo para el reconocimiento del antígeno (Brown *et al.* 2004; Owen *et al.* 2010). Para bloquear los fragmentos libres Fab que no se han unido a los anticuerpos primarios se incubó la solución con un exceso de inmunoglobulinas inespecíficas procedentes de suero preinmune de la misma especie que los anticuerpos primarios.

En la presente investigación, se estableció la relación espacial entre alérgenos de polen de olivo Ole e 1, Ole e 2 y Ole e 9 mediante CLSM utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (anti-Ole e 1) y dos anticuerpos policlonales de conejo (anti-Ole e 2 y anti-Ole e 9). El método utilizado consiste en ensayar, de forma separada, fragmentos Fab conjugados con fluorocromos que debido a su monovalencia, evitan la captación de anticuerpos primarios de la misma especie utilizados en las siguientes rondas de incubación y por otra parte, ensayar un exceso de fragmentos Fab no conjugados para el bloqueo de los anticuerpos primarios procedentes de la misma especie de anteriores rondas de incubación. Además, el ensayo con fragmentos Fab conjugados se realiza sin un exceso de éstos, de forma que no se satura la señal fluorescente y permitiría, si es necesario, una cuantificación relativa del marcado, normalizando la señal a una proteína usada como estándar interno marcada dentro de la misma muestra.

El presente estudio demuestra la posibilidad de usar dos anticuerpos de suero policlonal de conejo y un monoclonal de ratón, obteniendo una localización específica fluorescente en los tres diferentes alérgenos en la misma muestra. La técnica es rápida, se podría aplicar para procedimientos analíticos, ya que se podrían cuantificar las señales y ofrece una alternativa para los estudios de inmunolocalización usando anticuerpos primarios procedentes de las mismas especies.

Adaptación del método multiplex para microscopía electrónica de transmisión.

La aplicación del método descrito anteriormente se ha realizado para la detección simultánea de los alérgenos Ole e 2 y Ole e 9, así como para la detección del ligando de Ole e 2, la actina. Se ensayaron para ello dos diferentes anticuerpos (anti-Ole e 2 y anti-Ole e 9) procedentes de la misma especie animal (conejo) y un anticuerpo monoclonal (anti-actina) de una especie diferente (ratón), detectándose



simultáneamente mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal de diferente tamaño. Debido a la no disponibilidad a nivel comercial de anticuerpos secundarios Fab conjugados con oro coloidal, utilizamos en este caso inmunoglobulinas IgG completas conjugadas con oro. La detección se realizó mediante una adaptación de un método realizado por otros autores para microscopía de fluorescencia (Lewis Carl *et al.* 1993). Para evitar interferencias entre anticuerpos, tras la primera ronda de anticuerpos primarios y secundarios, se aplicó en exceso suero preinmune de conejo, cuyas Ig inespecíficas se unirán a los sitios libres del anticuerpo secundario, bloqueándolos. Posteriormente se aplican fragmentos Fab no conjugados en exceso contra la especie de la que procede el primario, de forma que se bloquean tanto los anticuerpos primarios como la IgG inespecífica. Seguidamente, se ensaya la siguiente ronda de anticuerpos primarios procedentes de la misma especie.

Hasta el momento, diversos autores han utilizado inmunolocalización indirecta múltiple a microscopía electrónica mediante el uso de anticuerpos primarios de diferentes especies y anticuerpos secundarios conjugados con diferentes tamaños de oro coloidal. También se han llevado a cabo localizaciones con diversos protocolos químicos para la detección de anticuerpos primarios procedentes de la misma especie. Entre otros, se han desarrollado protocolos en los que se utilizaron excesos de anticuerpos secundarios y posterior bloqueo de éstos por desnaturalización de sus sitios libres a través de tratamientos con formaldehído (Jensen and Norrild 2005; Wang and Larsson 1985) o por tratamientos de reducción de plata que se localiza en la superficie de las partículas de oro conjugadas con los anticuerpos secundarios, bloqueándolos (Bienz and Egger 1998). En estos últimos procedimientos, únicamente se bloquean los anticuerpos secundarios. Los primarios pueden ser susceptibles de unirse a secundarios de próximas rondas de incubación, con lo que existe la posibilidad de interferencias entre anticuerpos.

El protocolo utilizado en la presente investigación para la localización de la distribución de proteínas a nivel subcelular es el primero, a nuestro conocimiento, que usa fragmentos Fab para el bloqueo de los anticuerpos primarios, mostrando especificidad en las localizaciones.



5.2 Diversidad cuantitativa y cualitativa de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en los cultivares de olivo e implicaciones en la biología reproductiva del olivar.

El método seguido para el estudio de los perfiles de expresión de los alérgenos en el polen de olivo se ha llevado a cabo a nivel proteómico, ya que es más adecuado para aproximarse al estudio de la expresión proteica y la función de los alérgenos en el polen de olivo que los estudios a nivel transcripcional de la expresión de proteínas. Recientemente, se han desarrollado potentes herramientas para estudiar a nivel transcripcional la expresión de proteínas (microarrays y chips Affymetrix). Sin embargo, diversos estudios destacan la falta de una correlación directa entre datos transcripcionales y perfil proteico de células o tejidos eucariotas (Greenbaum *et al.* 2003). Esto se debe a que de forma prevalente se da la codificación de un gen para diversas isoformas proteicas que pueden presentar modificaciones post-transcripcionales y post-transduccionales, también puede variar la tasa de síntesis de proteína para llevar a cabo diferentes adaptaciones y funciones fisiológicas, sobre todo cuando se considera la necesidad de la diversificación en el genoma haploide del grano de polen.

Los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el polen de variedades de olivo presentan una gran diversidad cuantitativa y cualitativa.

La diversidad de isoformas de proteínas alergénicas y de sus niveles de expresión en el polen de olivo en diferentes cultivares sugieren que éstas deben jugar un papel específico en la biología de la reproducción sexual del olivo. El conocimiento de las funciones de estas proteínas es de interés por su repercusión agronómica. Sin embargo, la información acerca de las diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición alergénica del polen de olivo entre cultivares y sus implicaciones en la biología reproductiva del olivar es muy limitada.

En el presente estudio se obtuvieron los perfiles antigénicos de 57 variedades para cuatro de los once alérgenos caracterizados hasta la fecha en el polen de olivo. Además se evaluó la relación entre la composición alergénica de variedades de olivo con diversos parámetros, como capacidad germinativa del polen, compatibilidad y fenología de la floración. Estas relaciones no han sido estudiadas previamente por otros autores.

Los datos obtenidos confirmaron la presencia de tres isoformas de Ole e 1 en el estadio de polen maduro, tres isoformas de Ole e 2, una



banda correspondiente a Ole e 5 y otra correspondiente a Ole e 9. Los niveles de estos alérgenos fueron variables entre diferentes variedades de olivo y su presencia se detectó en la mayor parte de éstas. Así, la presencia de estos alérgenos se verifica en el estadio en el que se han realizado los ensayos, correspondiente al estadio de polen maduro, en el que el polen es liberado de la antera. Este dato, junto con el hecho de que se presente polimorfismo proteico, es decir, que existan múltiples isoformas de las proteínas Ole e 1 y Ole e 2 y se presenten variaciones en el nivel de expresión de todos los alérgenos, sugiere una implicación de dichos alérgenos y sus isoformas en el desempeño de un papel importante y específico en el crecimiento del tubo polínico y la fertilización.

Los niveles de expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen maduro de diferentes cultivares correlacionan entre sí.

La correlación de los niveles de expresión proteica entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 a lo largo de las variedades estudiadas sugiere que la síntesis proteica de estos alérgenos presentes en el polen maduro ha seguido un mismo patrón (exceptuando a la isoforma de Ole e 2 de 15,6 kDa), probablemente debido a que todas ellas se coordinan y son necesarias para desempeñar funciones celulares cruciales durante el proceso de germinación y elongación del tubo polínico, tales como remodelado del citoesqueleto, biosíntesis de pared celular y transducción de señales. La isoforma de Ole e 2 de 15,6 kDa debe presentar un función muy específica, puesto que no sigue el patrón de expresión de los demás alérgenos o isoformas alérgicas estudiadas.

La expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en polen de variedades de olivo con alta capacidad germinativa es de media mayor que las correspondientes a baja capacidad germinativa. Sin embargo, únicamente son significativas las diferencias para el contenido total en los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2 y para ciertas isoformas de éstos.

Los bajos niveles de germinación del polen de ciertas variedades de olivo impiden que los procesos de polinización y cuajado del fruto, de los que depende la cosecha final, se lleven a cabo. Además, la capacidad germinativa del polen de una determinada variedad es una de las características necesarias para utilizarla como polinizadora de otras.



Los niveles de diversos alérgenos podrían estar implicados en la germinabilidad del polen. Estudios previos del alérgeno Ole e 1 (Alche *et al.* 1999; Alche *et al.* 2004), Ole e 2 (Morales *et al.* 2008) y de proteínas con actividad 1,3-beta-glucanasa, actividad llevada a cabo por el alérgeno Ole e 9 (Roggen and Stanley 1969), sugieren que estas proteínas podrían estar implicadas en funciones relacionadas con el comienzo de la germinación. En base a estas hipótesis, se intentó averiguar la existencia de relación entre la capacidad germinativa y la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen maduro de 16 variedades.

La función biológica de Ole e 1 no se ha establecido previamente de una forma clara, aunque se apunta a su implicación en la maduración del polen y su germinación (Alche *et al.* 1999; Alche *et al.* 2004). En la presente investigación, parece existir una implicación de Ole e 1 en la capacidad germinativa del polen por el aumento significativo de la isoforma de Ole e 1 de 18,4 kDa y la suma de las isoformas de Ole e 1 en el grupo de variedades con mayor capacidad germinativa. Las demás isoformas y la banda multimérica de 40 kDa de Ole e 1 presentan mayores niveles de expresión en el grupo de mayor capacidad germinativa, aunque las diferencias no son significativas respecto al grupo de menor capacidad germinativa.

Las diferentes funciones que se han atribuido a las profilinas responden a la organización del citoesqueleto de actina (Morales *et al.* 2008; Ostrander *et al.* 1995; Singh *et al.* 1996) y transducción de señales (Goldschmidt-Clermont *et al.* 1990; Kovar *et al.* 2000), regulando el crecimiento apical del tubo polínico. La asociación de las isoformas de la profilina Ole e 2 y la suma de éstas (totalidad del alérgeno Ole e 2) a mayores niveles de expresión en el grupo de variedades con alta capacidad germinativa se muestra significativa, exceptuando a la isoforma de 15,6 kDa de Ole e 2, que si bien sus niveles son mayores en el grupo de alta capacidad germinativa, las diferencias no son significativas respecto al grupo de baja capacidad germinativa. Por tanto, el alérgeno Ole e 2 podría estar implicado en la capacidad de germinación del grano de polen.

Ole e 5 no parece estar implicado en la capacidad germinativa en nuestro estudio, sin embargo, los niveles del alérgeno en las variedades con mayor capacidad germinativa son mayores en su media respecto al



grupo de menor capacidad germinativa. La desviación típica tan amplia no permite establecer diferencias significativas.

El alérgeno Ole e 9, aún no presentando diferencias significativas en ambos grupos de capacidad germinativa, se aproxima bastante ($p=0,06$). El alérgeno Ole e 9 presenta actividad 1,3-glucanasa, y parece ser relevante en el comienzo de la germinación del polen, tal como fue propuesto para estas enzimas (Roggen and Stanley 1969), disolviendo la pared de calosa presente en el poro producido en la intina en el lugar donde comienza a crecer el tubo polínico. La hidrólisis debida a esta enzima en la pared del polen facilitaría la extensión y desarrollo del tubo polínico. Los resultados establecen únicamente un aumento no significativo en la presencia de esta proteína en las variedades con mayor capacidad germinativa.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que los resultados se realizaron a partir de 16 variedades agrupadas por su baja germinativa (4 variedades) y su alta capacidad germinativa (12 variedades). Por ello, se muestran como una aproximación a la relación que podría existir entre la capacidad germinativa del grano de polen y los niveles de los alérgenos presentes en dicho polen, siendo necesario ampliar el estudio con un mayor número de variedades para ambos grupos con objeto de verificar estos resultados.

En resumen, en las variedades estudiadas existe de media un mayor nivel de alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen de las variedades con alta capacidad germinativa. Las diferencias son significativas para los niveles totales en los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2. Así, uno de los parámetros a tener en cuenta para la productividad del olivar, y asegurar la germinación del grano de polen (siempre que estos resultados se reproduzcan en un mayor número de muestras), sería la elección de variedades con altos niveles en el grano de polen de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2. Estas variedades podrían utilizarse en los cultivos preferentemente aplicadas como variedades polinizadoras para evitar los efectos indeseados en pacientes sensibilizados a dichos alérgenos.

El contenido total de Ole e 1 y de sus isoformas de 20 kDa y de 18,4 kDa presenta una relación inversa con el índice de compatibilidad de variedades de olivo y junto con la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa muestran una menor expresión en polen de variedades autocompatibles respecto a variedades autoincompatibles.



La relación entre la compatibilidad polen-pistilo intra-cultivar y la expresión de alérgenos no había sido caracterizada hasta la fecha.

La correlación bivariada entre el índice de autocompatibilidad y la expresión de las isoformas de Ole e 1 de 20 kDa y 18,4 kDa, así como la suma de la expresión de todas las bandas presentes de Ole e 1, dió como resultado una relación inversa, es decir, a mayor índice de autocompatibilidad, menor expresión de los alérgenos mencionados.

La media de los alérgenos, tanto a nivel de isoformas, como en contenido total del alérgeno correspondiente, en las variedades autoincompatibles es mayor que la media de los mismos alérgenos en las variedades autocompatibles, exceptuando el caso del alérgeno Ole e 9. Sin embargo, únicamente se presentan diferencias significativas de las medias para isoformas de Ole e 1 y Ole e 2.

En el caso de Ole e 1, el test de Kruskal-Wallis, que indica poblaciones diferentes, mostró diferencias significativas en los valores de expresión de Ole e 1 de 18,4 kDa, 20 kDa y la suma de las intensidades de bandas de Ole e 1 entre las tres poblaciones correspondientes a las variedades autoincompatibles, parcialmente autoincompatibles y autocompatibles. El test de diferencias de medias (test U de Mann-Whitney) es significativo para la variante monoglicosilada de Ole e 1 (20 kDa) y la no glicosilada (18,4 kDa), así como la suma total de isoformas de Ole e 1 cuyas expresiones son menores en el grupo de variedades autocompatibles respecto a los grupos de variedades autoincompatibles y parcialmente autoincompatibles. La isoforma de 22 kDa de Ole e 1 muestra una mayor expresión significativa únicamente en las variedades parcialmente autoincompatibles respecto a las autocompatibles.

Estudios previos muestran la localización de Ole e 1 en la exina del polen, el tubo polínico y su liberación al medio de germinación (Alche *et al.* 2004), por lo que los autores sugieren que Ole e 1 podría estar involucrado en el fenómeno de reconocimiento polen-pistilo. De forma relevante, las isoformas de Ole e 1 liberadas al medio de germinación, según se ha mostrado en el capítulo 4.4 de la presente tesis, son las isoformas de 18,4 kDa y 20 kDa coincidiendo con las isoformas significativamente asociadas al índice de autocompatibilidad.

El alérgeno Ole e 2 muestra medias significativamente diferentes en la isoforma de 14 kDa para las variedades autocompatibles respecto de las autoincompatibles. La correlación bivariada entre el índice de autocompatibilidad y los niveles de esta isoforma en las variedades en



todos los grupos (variedades autoincompatibles, parcialmente autoincompatibles y autocompatibles) es inversa, aunque no llega a ser estadísticamente significativa ($p=0,08$). En el caso de estudios de localización de Ole e 2 (capítulo 4.6), éste se ha observado en la exina del polen, el tubo polínico y su liberación al medio de germinación (Morales *et al.* 2008), por lo que podría estar involucrado también en el fenómeno de reconocimiento polen-pistilo. Además, se ha mostrado la liberación masiva de la isoforma de 14 kDa de Ole e 2 al medio de germinación en los primeros minutos de hidratación del grano de polen (capítulo 4.4 de la presente tesis).

De ello se deduce que el índice de autocompatibilidad del olivo podría modular el contenido alergénico de Ole e 1 y de al menos, una de las isoformas de Ole e 2 en el grano de polen. Las variedades con un menor índice de autocompatibilidad presentarán un mayor nivel total del alérgeno Ole e 1 y de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa.

Los problemas de producción observados en el olivo, relacionados con los sistemas de incompatibilidad, podrían minimizarse al utilizar en las plantaciones variedades con un menor contenido en Ole e 1 y de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa. Es decir, variedades con menor contenido en su polen de Ole e 1 y de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa presentarán mayor índice de compatibilidad, aunque como se observó en el apartado anterior, podría ocurrir que como contrapartida, la capacidad germinativa de su polen sea menor.

En cualquier caso, de forma preliminar se podría establecer que el uso de variedades autocompatibles en las plantaciones extensivas conllevaría un menor contenido del alérgeno Ole e 1 y de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa en el polen de estas variedades y se podría complementar con la utilización de variedades polinizadoras de alta capacidad germinativa (de alto contenido de Ole e 1 y Ole e 2) que fuesen compatibles entre ellas, con lo que se aumentaría la producción del olivar y disminuiría el efecto nocivo principalmente para los pacientes sensibles al alérgeno mayoritario del polen de olivo y de Ole e 2.

En resumen, en las variedades estudiadas se observa una asociación de bajos niveles de Ole e 1 total y en concreto, de sus isoformas de 20 kDa y 18,4 kDa a cultivares autocompatibles (índice de compatibilidad mayor de 0,8), así como de la isoforma de Ole e 2 de 14 kDa. Por el contrario, los cultivares autoincompatibles presentan altos niveles de Ole e 1 y Ole e 2 en las mismas isoformas mencionadas.



Un mayor nivel de expresión en el polen de isoformas de Ole e 1 y de la totalidad de Ole e 1 en el polen de variedades se relaciona con una época de floración tardía en dichas variedades.

La asociación entre los niveles de alérgenos del polen de olivo de variedades y la fenología de la floración en las mismas variedades no ha sido estudiada hasta la fecha.

Todos los alérgenos, exceptuando Ole e 9, presentan una media menor de su nivel de expresión en el grupo de floración temprana, aumentando en el grupo de variedades de floración intermedia, y presentando los mayores niveles en los grupos de floración tardía. Sin embargo, la correlación entre nivel de alérgenos y época de floración es significativa de forma directa únicamente para las isoformas de Ole e 1 y para el contenido total de Ole e 1.

El test de Kruskal-Wallis determina la existencia de diferencias de poblaciones en las isoformas y el contenido total de Ole e 1. El test de Mann-Whitney de diferencia de medias entre los valores de intensidad de las isoformas y la suma de Ole e 1 es significativo en el grupo de variedades tempranas respecto al grupo de variedades tardías.

Por tanto, la época de floración está implicada en la alergenicidad del polen de las variedades de olivo, a través del alérgeno Ole e 1, alérgeno mayoritario del polen de olivo. La floración tardía parece aumentar el contenido en el alérgeno Ole e 1 del grano de polen de olivo, con lo que se podría propiciar que estas variedades presentasen un índice de compatibilidad menor, fomentándose la polinización cruzada.

En resumen, el estudio de los alérgenos del polen, en combinación con los criterios agronómicos convencionales de selección de variedades podría considerarse como una herramienta efectiva en los programas de cruzamientos, para la elección de variedades polinizadoras con altos niveles de germinabilidad, selección de variedades autocompatibles o autoincompatibles o de floración coetánea en un tiempo corto de experimentación, utilizando como modelo el análisis de la expresión de los alérgenos en el grano de polen de olivo, principalmente, Ole e 1 y Ole e 2.



5.3 Las temperaturas, precipitaciones y humedad relativa correlacionan con el contenido alergénico de Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el grano de polen de olivo de siete variedades a lo largo de diversos años.

En este estudio se ha evaluado la composición en los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 a lo largo de una serie de años, analizando la posible relación entre las variables climáticas de cada año y los cambios en la expresión de los alérgenos.

El contenido alergénico de los cultivares de olivo se debe a propiedades genéticas de la variedad (Hamman Khalifa 2008). Por otra parte, se ha apuntado una implicación de los factores climáticos de los meses anteriores a la estación polínica en la floración y el desarrollo del grano de polen de olivo (Galan *et al.* 2001; Orlandi *et al.* 2010) y la alergenicidad de éste (Fernandez-Caldas *et al.* 2007).

Los resultados presentados mostraron una variación de la expresión de los cuatro alérgenos en las siete variedades a lo largo de los años. Los análisis de correlación bivariada entre el contenido alergénico medido para diferentes años en el polen de cada variedad y los parámetros meteorológicos mostraron unos resultados muy heterogéneos entre variedades. Las variables meteorológicas tomadas en consideración fueron la temperatura, precipitaciones, número de días de lluvia o humedad relativa acaecidas en meses anteriores o durante la época de floración (mayo-junio).

Influencia de la temperatura en el contenido alergénico.

El contenido alergénico total de Ole e 1 presentó una alta correlación con las temperaturas medias y mínimas de los meses de marzo (Hojiblanca), con la temperatura media de febrero (Verdial de Huévar) y una correlación moderada con la temperatura media anual acumulada (meses de julio a junio anteriores a la floración) y con la temperatura mínima de mayo (Blanqueta). En las variedades Hojiblanca, Verdial de Huévar y Blanqueta parece mostrarse una mayor expresión de Ole e 1 en el grano de polen cuanto mayor es la temperatura de los meses previos a la floración, en particular, de febrero a mayo.

El contenido total del alérgeno Ole e 2 se correlaciona positivamente con la temperatura media y máxima de junio (Arbequina) y la temperatura mínima y máxima de abril (Hojiblanca). En ambas



variedades, las correlaciones se observan cercanas a los meses de floración.

Ole e 5 muestra correlación positiva únicamente con la temperatura mínima de mayo en la variedad Blanqueta.

Ole e 9 muestra una correlación positiva para la temperatura media del mes de enero (Arbequina y Verdial de Huévar) y de Marzo (Hojiblanca).

En resumen, no se observan correlaciones de la temperatura en un mes determinado o de la temperatura acumulada anual en todas las variedades de forma simultánea. Ello puede ser debido a las características intrínsecas y requerimientos de cada cultivar, o al bajo número de variedades y años estudiados, que podrían limitar el poder estadístico. Sin embargo, en todas las correlaciones positivas observadas entre el contenido en los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y las temperaturas, éstas corresponden a los meses pertenecientes al periodo invernal y primaveral (enero-junio) previo a la floración.

Estos resultados son acordes a los presentados para el alérgeno mayoritario Bet v 1 del polen de Abedul (Buters *et al.* 2008), en los que se observó un aumento de este alérgeno a mayores temperaturas, determinadas por regiones climáticas diferentes durante dos años consecutivos. Por otra parte, otro estudio sugiere una mayor respuesta alérgica a Bet v 1 procedente de extractos de polen de Abedul, cultivado en condiciones de temperaturas medias diarias altas, respecto a los cultivados con menores temperaturas (Ahlholm *et al.* 1998). Este último ensayo se realizó con sueros de pacientes sensibles a polen de Abedul en inmunotransferencia.

Las altas temperaturas parecen ejercer un efecto en el aumento de la expresión de estos alérgenos en determinadas variedades de olivo como se ha propuesto con anterioridad. El bajo número de variedades y años en los que se ha realizado el experimento pueden ser la causa de que los resultados no sean homogéneos para todas las variedades. También existe la posibilidad de que los factores genéticos intrínsecos de cada cultivar impidan que se pueda llegar a un consenso de los meses concretos en los que la temperatura afecta al contenido alérgico del grano de polen en todas las variedades.

Finalmente, una consecuencia del aumento de la temperatura sería el aumento del contenido alérgico y la alergenicidad del polen. Por ello, un aumento de la temperatura global producida por el efecto invernadero se podría traducir en los mismos efectos (Ahlholm *et al.*



1998; Cecchi *et al.* 2010). En la misma línea, otra posible consecuencia de que las áreas urbanas presenten a menudo temperaturas de entre 2 a 8 °C mayores que las áreas rurales (Oke 1987) podría ejercer un aumento de la alergenicidad del polen de olivo y la alergia a éste en la proximidad de áreas urbanas, en las que este árbol además, es cultivado habitualmente como ornamental.

Influencia de las precipitaciones y humedad relativa en el contenido alergénico.

El contenido alergénico de Ole e 1 correlaciona positivamente con la precipitación anual acumulada (Manzanilla de Sevilla), la precipitación y la humedad relativa acumulada de los meses de invierno y primavera (Verdial de Huévar), las precipitaciones del mes de noviembre y abril (Manzanilla de Sevilla), el número de días de lluvia de enero y abril (Manzanilla de Sevilla), la humedad relativa de los meses de enero, abril y mayo (Verdial de Huévar) y febrero (Manzanilla de Sevilla).

El contenido alergénico total de Ole e 2 correlaciona positivamente con la precipitación de junio (Manzanilla de Sevilla), el número de días de lluvia de abril (Verdial de Huévar) y la humedad relativa de los meses de diciembre y febrero (Verdial de Vélez y Verdial de Huévar).

El contenido alergénico de Ole e 5 correlaciona positivamente con las precipitaciones ocurridas en febrero (Blanqueta), el número de días de lluvia de abril, y con la humedad relativa de febrero, abril y mayo (Verdial de Vélez).

El contenido alergénico de Ole e 9 correlaciona positivamente con el número de días de lluvia de marzo (Arbequina), y la humedad relativa de diciembre (Picual), enero, abril y mayo (Verdial de Huévar).

Las correlaciones positivas del contenido alergénico en Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 con las precipitaciones, número de días de lluvia y humedad relativa presentan un patrón similar al obtenido para la temperatura. Estos parámetros climatológicos no correlacionan de forma simultánea en todas las variedades. Sin embargo, se muestran las correlaciones entre el contenido alergénico y estos parámetros durante el periodo invernal y primaveral (diciembre-junio) previo o durante la floración.

Un estudio similar fue realizado con seis variedades de olivo en cinco años consecutivos, en el que se analizó el contenido alergénico en el alérgeno mayoritario del olivo Ole e 1, no mostrando una correlación significativa con la media de la precipitación o la temperatura de los



meses de invierno previos a la floración (Fernandez-Caldas *et al.* 2007). Sin embargo, al medir la alergenicidad total encontraron una correlación positiva entre ésta y la media de las precipitaciones ocurridas en meses de invierno para todas las variedades analizadas. Este experimento se realizó por dichos autores utilizando membranas de inmunotransferencia con los distintos extractos de variedades, y ensayando los sueros de pacientes sensibles a polen de olivo en inmunotransferencia.

Nuestros resultados, en los que se ha analizado el contenido en cuatro alérgenos, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9, cubren en gran medida los once alérgenos conocidos hasta el momento. La concordancia entre los resultados del anterior estudio (correlación entre alergenicidad total y media de las precipitaciones en invierno) con el presente, consistente en una correlación entre el contenido alergénico en cuatro alérgenos y las precipitaciones, número de días de lluvia y humedad relativa de meses de invierno y primavera apoya los resultados obtenidos. En cualquier caso, en el presente estudio se tomaron datos acumulados y no de medias en los parámetros precipitación y número de días de lluvia mensuales, estacionales o anuales, a diferencia del estudio llevado a cabo por Fernández-Caldas y col. Así mismo, aunque se tomaron las medias de los datos de temperatura y humedad relativa mensuales, se tomaron en cambio datos acumulados para periodos estacionales y anuales. A ello puede ser debida la existencia de correlación para la estación de invierno y primavera de los datos meteorológicos con el contenido alergénico en los cuatro alérgenos estudiados en las variedades, aunque esta correlación no sea homogénea para todas ellas.

Desde el punto de vista alergológico, estos resultados sugieren que años con altas precipitaciones y temperaturas elevadas durante los meses de invierno y primavera pueden contribuir a que el contenido alergénico del grano de polen de olivo sea elevado. Las áreas con cultivos de olivo en regadío también podrían ser potencialmente más alergénicas para pacientes sensibilizados a olivo, así como las zonas urbanas en las que se cultiven olivos ornamentales, puesto que la mayor temperatura y los riegos contribuirían a ello.

Desde el punto de vista agronómico, es de particular importancia el aumento en el alérgeno Ole e 1 con temperaturas elevadas y precipitaciones abundantes. En capítulos anteriores se ha observado



que los mayores niveles de expresión de este alérgeno indican una mayor capacidad germinativa del grano de polen y un menor grado de auto-compatibilidad. Así, el aumento de temperaturas y precipitaciones, es decir, condiciones favorables para el cultivar, estimularían la polinización cruzada inter-varietal y la variabilidad genética.

Esta hipótesis se apoya con las descritas por otros autores en las que presentan variaciones inter-anales en el grado de compatibilidad del polen (Androulakis and Loupassaki 1990), así como altas temperaturas como factor de inhibición de la auto-polinización. De esta forma, se ha observado que el frío invernal en los cultivares propicia un aumento en su grado de auto-compatibilidad (Lavee *et al.* 2002).

Este efecto de las variables meteorológicas podría repercutir en una reducción de la producción del cultivar monovarietal, ya que podría comportarse como auto-incompatible en determinadas circunstancias climáticas, lo que obligaría a disponer de un donador de polen de otra variedad compatible con el cultivar para asegurar la producción.



5.4 Dinámica cíclica de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y liberación al medio de cultivo durante la germinación *in vitro* del grano de polen de olivo.

Este estudio se centra en los cambios dinámicos de las proteínas alergénicas Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 que ocurren durante la transición de polen maduro a las diversas fases de polen de olivo en germinación. Estas proteínas son necesarias para la germinación y el crecimiento del grano de polen, ya que están presentes desde el inicio de su liberación de la antera, tal como ocurre con las proteínas necesarias para la germinación de la mayoría de plantas estudiadas hasta la fecha, aunque se requieren nuevas síntesis para el crecimiento posterior del tubo polínico (Honys and Twell 2004; Mascarenhas 1993). Durante la germinación del tubo polínico, se observa una regulación específica en la expresión de las proteínas estudiadas. Éstas son selectivamente expresadas de nuevo en momentos puntuales del desarrollo del tubo polínico. Existe un aumento en la expresión de la mayoría de las proteínas estudiadas durante la transición de polen maduro a polen hidratado. Estos resultados son acordes a los presentados para estudios de expresión de genes a nivel transcripcional en polen de *Arabidopsis*, en los que se muestra un aumento en la expresión de genes en la transición de polen maduro a polen hidratado (Wang *et al.* 2008). Adicionalmente, también se distingue una expresión diferencial de estas proteínas en los diversos estadios de crecimiento. En algunos casos, la expresión muestra un patrón preferentemente cíclico. La aparición de estas proteínas recientemente expresadas indica que deben tener una función específica en este complejo proceso del desarrollo del tubo polínico. Por otra parte, la disminución observada en el nivel de algunas isoformas en ciertos estadios del polen germinado podría ser el resultado tanto de su metabolización, como de su liberación al medio, de forma que en este último caso podrían sustentar un papel en el metabolismo de la superficie del polen-estigma.

El hecho de que existan múltiples isoformas de las proteínas estudiadas en polen implica que desempeñan un papel importante y específico en el crecimiento del tubo polínico y la fertilización. La correlación de la expresión en un gran número de los alérgenos e isoformas durante la germinación indica que los mecanismos de síntesis proteica están coordinados dependiendo del estadio de germinación en el grano de polen de olivo. Los datos presentados en este estudio muestran, por primera vez, una visión de los cambios en



la expresión proteica de varias proteínas alergénicas de forma simultánea, durante la transición de polen maduro a diversos estadios de polen germinado de olivo.

Seguidamente, se analizarán y discutirán los resultados obtenidos para cada una de las proteínas objeto de este estudio:

Ole e 1

Ole e 1 muestra interesantes cambios durante la germinación debido a diferentes grados de distribución en sus tres isoformas. Se confirma la presencia de tres isoformas de Ole e 1 en el estadio de polen maduro, por lo que su síntesis y acumulación se produce antes de la antesis. Las tres isoformas de esta proteína, aunque presentan niveles cuantitativos muy diferentes, están presentes en todos los estadios analizados, existiendo una nueva síntesis de proteína en determinadas fases durante la germinación *in vitro* y posterior crecimiento del tubo polínico, caracterizado por ciclos de aumento-disminución de proteína.

El alto grado de polimorfismo que presenta Ole e 1 se atribuye a la presencia de microheterogeneidades en la secuencia nucleotídica, ratificadas en su secuencia aminoacídica (Villalba *et al.* 1993; Villalba *et al.* 1994), así como a presentar múltiples modificaciones postraduccionales, basadas en glicosilaciones (Castro *et al.* 2010a).

Los análisis cuantitativos de las inmunotransferencias durante diversos estadios de la germinación han permitido determinar la abundancia de las tres variantes de esta proteína alergénica de manera cuantitativa. Su variación a lo largo de la germinación del tubo polínico es paralela para las tres isoformas, siendo la presencia más abundante en todos los estadios la correspondiente a la isoforma mono-glicosilada de 20 kDa. Se aprecia un aumento de las tres isoformas en el estadio de polen hidratado, respecto del polen maduro, así como un descenso cuantitativo a los 5 minutos, y en las 4 y 13 h siguientes al inicio de la germinación. La cantidad de alérgeno desciende significativamente con el tiempo en aquellos granos que no germinan, probablemente como resultado de su degradación. En el medio de germinación se detectan dos de las variantes, correspondientes a las isoformas no glicosiladas, y las mono-glicosiladas, a partir de los 5 minutos de incubación, incrementándose progresivamente hasta las 4 horas de cultivo. A partir de este momento, los niveles del alérgeno disminuyen, siendo indetectables transcurridas 13 horas desde el inicio de la germinación.



Los descensos experimentados en los niveles de la isoforma diglicosilada en los ciclos de menor expresión en la germinación del grano de polen probablemente se deban a su metabolización, puesto que esta isoforma no difunde al exterior. En el caso de las proteínas no glicosiladas y monoglicosiladas, además de una evidente disminución debido a su liberación al medio de cultivo, se podría deber su disminución tanto a su metabolización, como a la ausencia de nuevas síntesis en ese estadio de germinación. Este hecho, puede ser contrastado al observar la homogeneidad en los niveles de difusión hasta las 7 horas de la isoforma no glicosilada, y en especial, de la isoforma mono-glicosilada, presentándose igualmente ciclos de mayor y menor expresión durante la germinación. La síntesis de nuevas formas glicosiladas de Ole e 1 (ej. a las 7 h de cultivo), indica que los mecanismos de glicosilación están presentes y activos en el citoplasma del tubo polínico.

La detección de Ole e 1 en el medio de cultivo durante la germinación *in vitro* responde a su carácter hidrofílico, permitiendo que difunda con cierta facilidad en medios acuosos (Carnes *et al.* 2002). Los altos niveles de Ole e 1 en el grano de polen, así como la rápida difusión y gran solubilidad de las formas no glicosilada y mono-glicosilada hacen que esta proteína reúna cualidades para ser un alérgeno mayoritario, sin olvidar las implicaciones en el reconocimiento polen-pistilo que podría tener la liberación de esta proteína en la superficie del pistilo. Estudios previos proponen a Ole e 1 como proteína con funciones similares a la de su homóloga en polen de tomate, la proteína LAT52 (Alche *et al.* 2004) que participa en transducción de señales, en la hidratación y la germinación del polen (Muschietti *et al.* 1994).

La acumulación de proteína encontrada desde la liberación del grano de polen en el estadio de polen maduro y su posterior nueva síntesis durante su hidratación y el transcurso del crecimiento del tubo polínico, así como su capacidad de difusión, confirman que Ole e 1 podría jugar un papel clave en la dinámica de la germinación, el crecimiento del tubo polínico y el reconocimiento polen-pistilo.

Ole e 2

El estudio realizado confirma la presencia de dos bandas en las inmunotransferencias de Ole e 2. La banda de 14 kDa y la de 15,1 kDa. Esta última banda corresponde al menos, a dos isoformas observadas en inmunotransferencias de gran tamaño, la isoforma de



15,1 kDa y la de 15,6 kDa. Debido al peso molecular tan próximo entre ambas, no se resuelven en inmunotransferencias de pequeño tamaño, tal como se presenta en los resultados. El polimorfismo alérgico de Ole e 2 se atribuye a la presencia de microheterogeneidades en su secuencia nucleotídica, así como a la existencia de modificaciones postraduccionales (Jiménez López 2008). La diversidad de isoformas de profilinas se manifiesta a su vez en diferentes afinidades por ATP, actina y PLP (Gibbon *et al.* 1997; Gibbon *et al.* 1998; Staiger *et al.* 1993). Las diversas funciones que se han atribuido a profilinas responden a señalización por calcio y fosfoinosítidos, resultando en cambios de la arquitectura de la actina (Ostrander *et al.* 1995; Singh *et al.* 1996) regulando su ensamblaje, formando filamentos subapicales en el tubo polínico y manteniendo su organización y polaridad. Otra función de las profilinas es la participación en la transducción de señales (Goldschmidt-Clermont *et al.* 1990) y la regulación de la actividad kinasa y fosfatasa de otras proteínas, teniendo un posible papel en vías de señalización que deben regular el crecimiento del tubo polínico (Kovar *et al.* 2000).

Por tanto, la co-expresión de varias isoformas de profilinas ampliaría las diferentes respuestas del citoesqueleto o multiplicaría las vías de señalización en respuesta a cambios ambientales, entre otras funciones.

La presencia de 2 bandas de Ole e 2 en el estadio de polen maduro verifica que su síntesis y acumulación se produce antes de la antesis.

La cantidad de alérgeno presenta los mayores niveles durante la hidratación del polen, seguido de un descenso significativo a los 5 minutos, a las 4 y 13 h siguientes al inicio de la germinación.

Las dos bandas cuantificadas de esta proteína, presentan niveles cuantitativos diferentes y su variación a lo largo de la germinación del tubo polínico es paralela, presentándose así mismo ciclos de aumento-disminución en estadios consecutivos, existiendo una síntesis nueva de proteína en determinadas fases durante la germinación *in vitro* y posterior crecimiento del tubo polínico. Por otra parte, la práctica desaparición de la difusión en el medio de cultivo de la isoforma de 14 kDa a partir de los 5 minutos del inicio del cultivo, sugiere que la disminución de expresión en algunos estadios de la germinación se debe a su metabolización en el interior del grano de polen, en contraste con la isoforma de 15,1 kDa, liberada al medio de una forma prácticamente homogénea, excepto al final del cultivo donde ya no es detectada, presentando también disminución de cantidad de proteína durante algunas fases de la germinación pudiendo deberse a su



metabolización o a la ausencia de nueva síntesis de la proteína en dichas fases.

Por otra parte, la cantidad de Ole e 2 desciende significativamente con el tiempo en aquellos granos que no germinan, probablemente como resultado de su degradación.

Esta dinámica cíclica de expresión durante la germinación del grano de polen sugiere que el crecimiento del tubo polínico debe depender de la nueva síntesis de profilinas. Además, la difusión de estas proteínas de forma diferencial sugiere que llevan a cabo funciones diferentes. El patrón de expresión de la isoforma de Ole e 2 de 15.1 kDa y su amplia difusión parece responder a funciones de señalización en el exterior del tubo polínico, en el metabolismo del reconocimiento polen-pistilo en vistas a la fertilización. La isoforma de 14 kDa, cuya difusión se produce únicamente al comienzo de la germinación, parece responder a un papel exclusivamente en el inicio del proceso de reconocimiento polen-pistilo, sin exclusión de otras funciones celulares.

Al igual que sucede con Ole e 1, los altos niveles de Ole e 2 en el grano de polen, así como su rápida difusión y gran solubilidad explicarían el papel de esta proteína como un potente alérgeno.

Ole e 5

Ole e 5 es una enzima CuZn superóxido dismutasa (CuZn-SOD). Las enzimas SODs se encargan de convertir las especies reactivas de oxígeno (ROS) en formas del oxígeno no tóxicas, catalizando la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, limitando así la producción de radicales hidroxilo. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. La presencia de distintas isoformas de SODs en los inmunoblots durante la germinación de polen de olivo se debe a la utilización de un anticuerpo comercial que fue desarrollado frente a la forma cloroplastídica de la CuZn-SOD de *Arabidopsis*. Este anticuerpo reconoce formas citosólicas del enzima a elevadas concentraciones, y parece presentar reactividad cruzada con otras SOD, diferentes a Ole e 5. Este hecho se apoya con una alta identidad presentada por Ole e 5 con SODs de otras especies, correspondiendo a un 80–90% de identidad (Butteroni *et al.* 2005).

Una de las bandas encontradas en polen maduro y en otros estadios de la germinación presenta un peso molecular de 16,4 kDa, similar al



descrito previamente para la enzima CuZn-SOD en su forma citosólica en el polen del olivo, de aproximadamente 16,5 kDa (Alché *et al.* 1998; Butteroni *et al.* 2005). Las bandas restantes podrían representar tanto subunidades de CuZn-SODs como otros tipos de SODs.

En plantas superiores, las enzimas CuZn-SODs son las SODs más abundantes, encontradas en el citosol y en el cloroplasto. Las Mn-SODs están presentes en mitocondria y peroxisomas y las Fe-SODs se encuentran generalmente en cloroplastos (Alscher *et al.* 2002). Estudios previos en polen de tabaco muestran la presencia de Mn-SOD y CuZn-SOD (Jing *et al.* 2009), en polen de maíz se observan Mn-SODs, similares a una de las identificadas en polen de tabaco (Odén *et al.* 1992) y en polen de camelia se ha purificado y caracterizado una CuZn-SOD de peso molecular 69,5 kDa, siendo un dímero compuesto por 2 subunidades idénticas (He *et al.* 2005). En polen de olivo se han descrito 4 CuZn-SODs y en ensayos inmunoblot se observa una única banda de 16,5 kDa, consistente con la masa molecular de una de las subunidades de CuZn-SOD encontradas en otras especies vegetales (Alché *et al.* 1998). Es por ello que, basados en hallazgos anteriores, asumimos que la Fe-SOD no será una de las SODs encontradas en nuestro patrón de bandas inmunoreactivas al anticuerpo utilizado para detectar Ole e 5, ya que el polen no presenta cloroplastos.

Los resultados de los inmunoblots nos revelan que la síntesis y acumulación de todas las SODs observadas, se produce antes de la antesis, puesto que todas están presentes en el polen maduro. La proteína Ole e 5 presenta su mayor expresión en este estadio y posteriormente en el estadio de polen hidratado, cayendo su expresión a los 5 minutos del cultivo, recuperándose levemente a una hora de la germinación y posteriormente, se mantiene prácticamente indetectable hasta el final de ésta. Estos datos sugieren la importancia de Ole e 5 en la fase previa a la germinación del grano de polen, momento en el que se produce un drástico cambio en su estado de hidratación. Las tres bandas correspondientes a proteínas SODs de peso molecular 19, 22 y 29 kDa también se observan en su máxima expresión en la fase de polen maduro e hidratado, siendo inapreciables en las demás fases de la germinación. Las isoformas SODs de 31,3 y 66 kDa se aprecian en varios estadios del desarrollo del tubo polínico, con una alta expresión en polen maduro e hidratado, aunque su nivel de expresión es variable a lo largo de la germinación.

Estudios previos en plantas de tomate y en maíz han mostrado una correlación entre el incremento de la actividad de CuZn-SOD y la



tolerancia a la intensa sequía (Arora *et al.* 2002). También se ha comprobado que la sobreexpresión de genes SODs en plantas transgénicas incrementan la tolerancia a la sequía y a la congelación en diversas especies (Gupta *et al.* 1993; McKersie *et al.* 1996; McKersie *et al.* 1993). Estos hallazgos sugieren que la expresión de enzimas SODs confieren tolerancia a la deshidratación, revelando la importancia de los altos niveles de Ole e 5 y de las SODs encontradas en el polen maduro, momento en que el polen ha alcanzado su máximo grado de deshidratación.

El hecho de que múltiples isoenzimas de SODs co-existan en el grano de polen implica que juegan un papel importante en la germinación y el crecimiento del tubo polínico. Investigaciones anteriores indican que la formación de ROS está implicada en la polarización del crecimiento del tubo. La presencia de ROS en el extremo del tubo polínico del grano de polen debe involucrar la eliminación o purgado de ROS por enzimas SODs (Hiscock *et al.* 2007; Potocky *et al.* 2007). Por tanto las SODs observadas durante el desarrollo del polen, podrían tener una función protectora contra el estrés oxidativo.

Por otra parte, el medio de cultivo mostró visiblemente a Ole e 5 en los estadios de 1 h y 4h, así como a la SODs de 66 kDa. Estudios previos han apuntado hacia la implicación de SODs en el proceso de reconocimiento polen-estigma (Dickinson and Lewis 1975; Hodgkin *et al.* 1988), lo que se ha visto apoyado por su localización a microscopía electrónica en la pared del grano de polen de olivo, concretamente, en la exina (Alché 1998). De esta forma, podría ser posible que Ole e 5 y la SODs de 66 kDa, observadas en el medio de cultivo, participasen en dichos procesos de reconocimiento.

Ole e 9

Los inmunoblots muestran la presencia de dos bandas de la proteína Ole e 9 de peso molecular calculado 43 y 46 kDa en los estadios de polen maduro, polen hidratado y 1h de germinación. Ello es debido probablemente a una ausencia de una completa desnaturalización, provocando la aparición de una banda de Ole e 9 desnaturalizada de 46 kDa, y la otra banda de Ole e 9 no completamente desnaturalizada de 43 kDa. Se muestran efectivamente las acumulaciones de las dos formas de la proteína Ole e 9 antes de la antesis, en el estadio de polen maduro y la alta expresión también en polen hidratado, momento en el



que se hace necesario un balance entre formación y pérdida de pared en la apertura de germinación, para facilitar la emergencia del tubo polínico.

La proteína Ole e 9 ha mostrado actividad hidrolítica 1,3-beta-glucanasa (Huecas *et al.* 2001). La actividad 1,3-beta-glucanasa parece ser relevante en el comienzo de la germinación del polen (Roggen H.P.J.R. 1969), disolviendo la pared de calosa presente en el poro que se produce en la intina en el lugar donde comienza a crecer el tubo polínico, por lo que la presencia masiva en el inicio del cultivo en los presentes experimentos se correspondería a la mayor actividad hidrolítica de Ole e 9 en esta fase.

Así mismo, se observan fases cíclicas de aumento-disminución de expresión de proteína a lo largo del cultivo, probablemente debido a la sintetización de nuevo de Ole e 9 en determinadas fases del desarrollo, en relación a la necesidad de extensión del tubo polínico, y consecuentemente de pérdida y formación de pared.

Por otra parte, en el medio de cultivo encontramos una gran difusión de la proteína de Ole e 9 al inicio de la inmersión del polen en el medio, manteniéndose a niveles más bajos a lo largo del cultivo. Estudios previos sugieren que Ole e 9 es una proteína de secreción al medio extracelular (Huecas *et al.* 2001). Además, se ha propuesto que las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos son liberadas al medio con un posible papel en el metabolismo de la superficie polen/estigma (Dai *et al.* 2007; Suen *et al.* 2003) y con funciones de reconocimiento de azúcares, en concreto, se ha relacionado a Ole e 9 con la capacidad de interactuar con el polisacárido 1,3-beta-laminarina (Rodriguez *et al.* 2007).

Por tanto, Ole e 9 podría tener un papel fisiológico importante tanto en la hidrólisis de la pared del polen para facilitar la formación del poro por el que emergerá el tubo polínico, así como en la extensión y desarrollo del tubo polínico. Además, la difusión experimentada por Ole e 9 podría dar lugar a la interacción y reconocimiento polen-pistilo, así como a funciones de hidrolización de paredes del estigma y células del tracto en pistilos, facilitando el crecimiento e invasión del tubo polínico por medio de su localización alrededor de la pared del tubo o siendo liberadas a nivel del tracto.

A nivel clínico, la solubilidad de esta proteína, junto a su capacidad de difusión, facilitaría la reacción alérgica durante el contacto del polen con las mucosas de los pacientes sensibilizados a ella.



5.5 Antigenicidad y alergenidad diferencial de distintos extractos comerciales procedentes de distintos cultivares y agrupación de 57 cultivares de acuerdo a los niveles de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.

Los extractos proteicos destinados a vacunas para diagnóstico e inmunoterapia se estandarizan habitualmente en base a su potencia alérgica (medida de IgE total). La determinación de la variabilidad de los extractos en cantidad y naturaleza de los alérgenos que contienen los extractos ayudaría a una estandarización precisa de éstos. El método multiplex desarrollado permite la detección fluorescente y la cuantificación de dos alérgenos mayoritarios (Ole e 1 y Ole e 9) y dos minoritarios (Ole e 2 y Ole e 5) en la misma membrana. De esta forma, se podrían diseñar dosis adecuadas en relación a los alérgenos contenidos en un extracto. Además, el análisis se ha extendido al estudio de la reactividad IgE de un conjunto de sueros de ocho pacientes alérgicos al polen de olivo, usando un método de detección quimioluminiscente sobre la misma membrana, de forma que se han podido identificar las bandas que se superponen en la detección fluorescente de alérgenos y quimioluminiscente de alérgenos que reaccionan con IgE. Se ha comprobado la variabilidad cuantitativa y cualitativa de alérgenos en los diferentes extractos y su respuesta diferencial a IgE, mostrando que dicha variabilidad debe afectar a la potencia alérgica total de estos extractos. La alta reactividad de las IgE frente a Ole e 1 (isoformas de 18,4 y 20 kDa) en los extractos coincide con los altos niveles de expresión de estas isoformas, cuantificadas en los mismos extractos. Diversos polimorfismos de Ole e 9 podría estar presentes en las variedades, afectando a la capacidad de enlace de IgE. Se ha sugerido que para una inmunoterapia eficiente, los pacientes alérgicos deberían ser tratados con los alérgenos a los que reaccionan con altos niveles de IgE (Valenta *et al.* 1999; Valenta *et al.* 1998). De acuerdo a esta teoría, el extracto comercial genérico de *Olea europaea* testado en esta investigación no sería eficaz para inmunoterapia en los ocho pacientes alérgicos estudiados, ya que no muestra reactividad IgE. Por el contrario, una combinación de los extractos procedentes de Picual y Lechín o Picual y Arbequina podrían ser la mejor elección para la vacunación en este caso. Para asegurar la eficacia del tratamiento, sería necesario determinar inicialmente el perfil de IgE de cada paciente testando sueros individuales para los diversos extractos.

Debido al gran número de cultivares existentes y la gran variabilidad en el patrón de expresión de los alérgenos del polen entre cultivares, se



hace necesaria una agrupación de éstos según su contenido alérgico, constituyendo una herramienta muy útil para la diagnosis y elección de inmunoterapias específicas. Para ello, se proponen 14 grupos que integran los 57 cultivares estudiados, catalogados según su contenido en los alérgenos del polen Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9, en orden a simplificar los test de reactividad frente a IgE y la elección de inmunoterapia específica. De esta forma, un paciente alérgico a Ole e 5, sin respuesta frente a Ole e 1, Ole e 2 y Ole e 9, podría tratarse con un extracto procedente del grupo 2. Un paciente con reactividad frente a Ole e 1 y Ole e 5 y sin reactividad frente a Ole e 2 y Ole e 9 podría tratarse con extractos procedentes del grupo 9, evitando de esta forma posibles nuevas sensibilizaciones.

Por otra parte, un resultado claro de estas agrupaciones, una vez detectadas las variedades con un bajo contenido en alérgenos o con ausencia de isoformas de alta alergenidad, será facilitar la selección e introducción de variedades de olivo para su cultivo extensivo u ornamental, contribuyendo a la reducción de los niveles de alérgenos en el aire y a la prevención de alergia al polen de olivo. Claramente, por nivel de alérgenos, para estos fines se aconsejarían variedades del grupo 1, tales como Arbequina y Bella de España.

5.6 Localización y aproximación a la función de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 9 y de actina, ligando de Ole e 2, en el grano de polen de olivo.

La localización de Ole e 1 en la exina, en la región apertural y en la zona apical del tubo polínico aporta evidencias de su posible papel en la hidratación y germinación del grano de polen, así como molécula señal en procesos de reconocimiento polen-pistilo.

La proteína Ole e 1 ha sido localizada durante la hidratación y la germinación del grano de polen de olivo. Su localización en las regiones aperturales, en la exina del grano de polen y a lo largo del crecimiento del tubo polínico, con una alta expresión en su extremo proximal y apical, aporta evidencias de que debe ser una molécula clave en la hidratación y germinación del grano de polen. Su presencia en la exina y en el extremo apical del tubo podría deberse a una posible implicación en el proceso de reconocimiento entre polen y estigma y células estilares. Resultados previos del grupo de investigación sugirieron estas dos hipótesis (Alche *et al.* 1999; Alche *et al.* 2004). En la primera de ellas, Ole e 1 crearía el gradiente osmótico necesario para la hidratación y germinación del polen. Ello implicaría



que el polen de variedades con diferente contenido en Ole e 1 experimentarían cambios en su capacidad de hidratarse y germinar. En la segunda hipótesis, en la que Ole e 1 estaría implicado en el reconocimiento polen-estigma, se podría postular que variedades con diferente contenido en Ole e 1 presentarían diferentes grados de compatibilidad. Los resultados mostrados en capítulos anteriores muestran que ambas funciones podrían ser desarrolladas por Ole e 1. Ole e 1 se expresa en altas cantidades en granos de polen de variedades con alta capacidad de germinación. Además, el estudio de la germinación *in vitro* ha permitido determinar que Ole e 1 se encuentra altamente expresada en la fase de la hidratación del grano de polen.

Por otra parte, se observa que las variedades autoincompatibles presentan altos niveles de Ole e 1 respecto a variedades autocompatibles. Adicionalmente, los estudios de germinación *in vitro* determinan una alta difusión, hasta prácticamente el final del cultivo, de dos de las tres isoformas de la proteína, lo que podría significar un papel en la señalización de Ole e 1 para el reconocimiento estilar y guía del tubo polínico en vistas a la fertilización.

Ole e 2 co-localiza con áreas altamente activas del citoesqueleto y se libera al medio de cultivo durante la germinación in vitro, apoyando la hipótesis de la disociación de los complejos actina-profilina para promover la polimerización de filamentos de actina.

Las diferencias en la localización de profilina entre los dos procedimientos descritos (estándar y de alta permeabilización) se atribuyen a diferencias en la capacidad de los compuestos químicos y particularmente, de los anticuerpos ensayados para penetrar a través de la pared celular del polen. Esta limitación, claramente observada tras el uso del protocolo estándar, fue resuelta con la aplicación de enzimas para la digestión de la pared celular, mejorando la permeabilización. Por otra parte, el procedimiento estándar permite visualizar una rápida solubilización y liberación en el medio acuoso de la proteína alergénica Ole e 2 o profilina. Esta característica se ha demostrado a nivel celular para los alérgenos Bet v 1 y profilina de polen de abedul, Ole e 1 de olivo y diversos alérgenos de la hierba timotea (*Phleum pratense*) (Alche *et al.* 2004; Grote *et al.* 1993; Vrtala *et al.* 1993). En el caso de la hierba timotea, la profilina se liberaba rápidamente en grandes cantidades a partir del polen hidratado, sin embargo, la profilina de abedul quedaba retenida en el grano de polen hidratado (Vrtala *et al.* 1993). Se ha propuesto que la liberación de proteínas alergénicas al medio de



cultivo se realiza a través de microcanales de la superficie del grano de polen, y en el caso de que el grano de polen esté expuesto a largos tiempos en el medio de cultivo, la liberación masiva se haría efectiva a través de las regiones aperturales (Grote *et al.* 1993; Howlett *et al.* 1973). En el grano de polen de olivo, la presencia de una intensa señal en el medio de cultivo y en la exina indica que la profilina del polen de olivo se libera de forma masiva en el medio acuoso tras la prehidratación. La fluorescencia se localizó intensamente en forma de anillo, rodeando las aperturas por las que emerge el tubo polínico, lo que representa una evidencia clara de la liberación sustancial de profilinas. Los mecanismos de descarga deben implicar o ser dependientes de algún tipo de transporte fisiológico, ya que los granos de polen no germinados no presentan señal de profilinas en la exina.

Por otra parte, la estructura en forma de anillo únicamente se observa alrededor de la zona de emergencia del tubo polínico y no en las otras dos regiones aperturales. Esta liberación de alérgenos del grano de polen, que en el olivo afecta entre otros, a Ole e 1 y Ole e 2, hace que estas proteínas estén disponibles para el sistema inmune y las caracteriza como potentes alérgenos. Diversos autores llegan a la misma conclusión para el alérgeno Ole e 1 (Alche *et al.* 2004; Carnes *et al.* 2002).

El uso de procedimientos de fijación convencionales para la visualización de actina induce una disrupción de la reorganización de actina, incluyendo los microfilamentos (Doris and Steer 1996; He and Wetzstein 1995). En los ensayos realizados se han utilizado protocolos de preservación de filamentos de actina. A pesar de ello, y debido a protocolos agresivos de permeabilización, tales como digestión de pared celular para mejorar la penetración de los anticuerpos, no se ha podido visualizar correctamente la organización de actina, aunque sí se ha obtenido una visión general de su distribución. La señal de actina detectada en el tubo polínico del polen de olivo representa áreas de alta densidad de microfilamentos y/o grandes acumulaciones de monómeros de actina enlazados o libres, los cuales son reconocidos por el anticuerpo. La fluorescencia acumulada en la zona proximal y apical del tubo polínico debe indicar la presencia de regiones implicadas en un metabolismo muy alto de actina. Ambas regiones también coinciden con áreas de alta concentración de profilina en el polen de olivo. En el extremo apical del tubo polínico de polen de tabaco se ha descrito un marcado de profilinas muy intenso (Mittermann *et al.* 1995). En regiones coincidentes con extremos apicales de otros tipos celulares, tales como pelos radicales, las



profilinas se localizan específicamente en la región apical (Baluska *et al.* 2000; Braun *et al.* 1999). La co-localización de Ole e 2 y actina en la apertura donde se hace efectiva la salida del tubo polínico y en la región apical del tubo polínico puede ser interpretada como una evidencia de una disociación masiva de los complejos de actina-profilina, tal como ha sido previamente sugerido (Grote *et al.* 1993), o una movilización de los monómeros de actina almacenados y por tanto, una iniciación de la polimerización de filamentos de actina en estas áreas. Esta actividad debe comenzar a ocurrir en las tres regiones aperturales del grano de polen para finalizar enfocándose hacia la apertura “efectiva” del polen y hacia el tubo polínico, anclándose los filamentos en el inicio y en el final del tubo polínico. Estas dos zonas se podrían considerar los sitios de mayor formación, dinámica y control celular sobre el citoesqueleto de actina, permitiendo el crecimiento polarizado del tubo polínico y la presencia de un “flujo invertido” de corrientes citoplasmáticas (Cardenas *et al.* 2005; Vidali and Hepler 2001), observadas ampliamente en el tubo polínico de olivo (resultados no mostrados). La visualización del cerco cortical de actina observado en el ápice del tubo polínico de *Lilium* (Lovy-Wheeler *et al.* 2005) se ha podido apreciar muy levemente en el polen de olivo.

El uso de anticuerpos específicos para cada isoforma de profilina, todas ellas localizadas con un mismo anticuerpo en el presente trabajo, nos daría información de una posible localización diferencial de las isoformas de profilinas, tal como se ha descrito para polen de diferentes especies y células vegetales (Kandasamy *et al.* 2002; Ren and Xiang 2007; von Witsch *et al.* 1998).

La localización ultraestructural de profilina en el grano de polen y en el tubo polínico de diferentes especies de plantas ha sido investigada usando análisis inmunocitoquímicos (Fischer *et al.* 1996; Grote *et al.* 1995; Grote *et al.* 1993; Hess *et al.* 1995; Kandasamy *et al.* 2002; Vidali and Hepler 1997). Con algunas excepciones (por ejemplo, se ha localizado Phl p 4 en amiloplastos (Fischer *et al.* 1996) de polen de hierba timotea), la mayoría de autores localizaron la profilina en el citoplasma, en la exina del grano de polen y en el citoplasma del tubo polínico. En el polen de olivo, la profilina y la actina están localizadas como proteínas solubles, distribuidas uniformemente en el citoplasma del grano de polen y del tubo polínico, sin observarse una localización preferencial en orgánulos, estructuras o compartimentos. La actina



tampoco se encuentra representada en las paredes del grano de polen, indicando la integridad de la membrana plasmática. La presencia de marcado de profilina con partículas de oro asociadas a la exina, al material adherido a la exina y la endexina de la zona apertural es distintiva, representando una evidencia de la liberación masiva del alérgeno mostrada también por inmunofluorescencia.

Ole e 9 podría promover el remodelado de la pared del grano de polen y del tubo polínico, aumentando la capacidad de germinación del polen y es liberada al medio de cultivo durante la germinación in vitro, probablemente para permitir la entrada del tubo polínico mediante hidrólisis de la pared del estigma.

El ensayo multiplex de microscopía confocal ha permitido mostrar la localización de Ole e 9 en la exina del grano de polen, en la zona inmediata a la emergencia del tubo polínico y en su extremo apical. La presencia de esta proteína en la exina apoya la hipótesis de que Ole e 9 es una proteína de secreción al medio extracelular (Huecas *et al.* 2001). Además, esta proteína fue detectada en el medio de cultivo en experimentos de germinación *in vitro* en todas sus fases (resultados mostrados en el capítulo 4.4). Considerando su papel como enzima 1,3-beta-glucanasa y su implicación en el metabolismo de carbohidratos (Rodríguez *et al.* 2007) se podría sugerir su participación en la hidrólisis de la pared del estigma y del tracto transmisor para la entrada y avance del tubo polínico, tal como se ha sugerido para proteínas de la familia de las beta-glucanasas en polen (Dai *et al.* 2007; Suen *et al.* 2003). La localización en la apertura “efectiva” del tubo polínico podría facilitar la hidrólisis de la pared del grano de polen para formar y extender el poro por el que emerge el tubo, disolviendo el tapón de calosa inicialmente presente en la intina de la región apertural, función mostrada en otras enzimas hidrolíticas de pared de polen (Roggen H.P.J.R. 1969). La localización de Ole e 9 en la zona apical del tubo polínico podría promover la extensión y desarrollo del tubo polínico a través de la pérdida de pared, permitiendo la entrada de nuevos constituyentes en ésta. Esta misma función ha sido sugerida en proteínas del metabolismo de carbohidratos en polen de maíz (Suen *et al.* 2003). De esta forma, variedades con mayor contenido en Ole e 9 deberían mostrar una mayor capacidad germinativa de su polen. Los resultados mostrados en el capítulo 4.2 presentan un aumento casi significativo ($p=0,06$) en la cantidad de Ole e 9 de variedades con alta capacidad germinativa respecto de las que presentan baja capacidad germinativa.



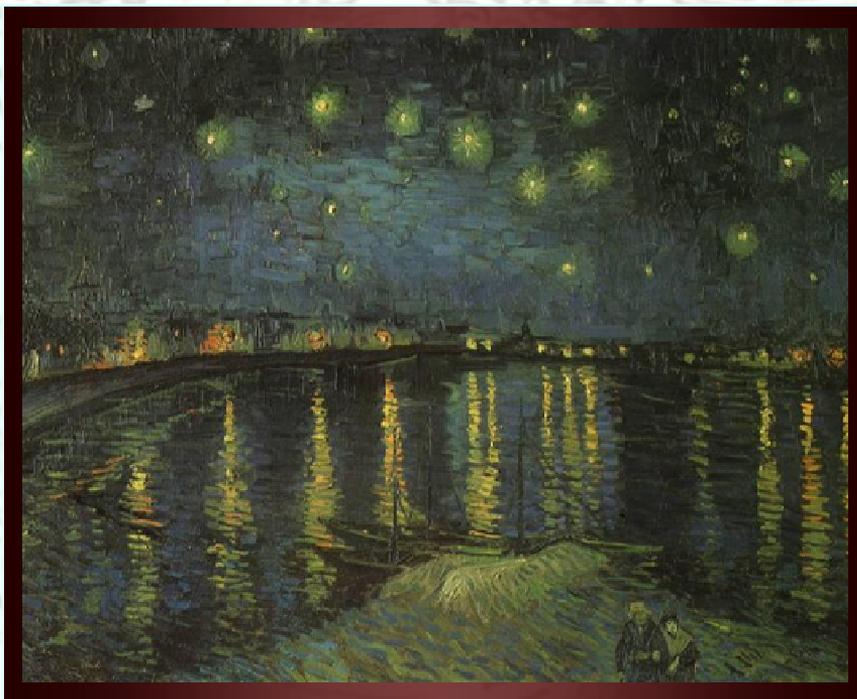
La localización ultraestructural de Ole e 9 muestra su distribución en el citoplasma, manifestando su carácter soluble. En particular, se ha observado un marcado asociado a vacuolas en las que la proteína Ole e 9 podría ser almacenada. La exina del polen también muestra señal de Ole e 9, siendo esto una evidencia más de la liberación de la proteína al medio. Además se ha observado una acumulación en la región apertural del grano de polen, estando de acuerdo esta localización con la función de hidrólisis de calosa en dicha región del grano de polen.

La inmunolocalización múltiple de proteínas muestra una localización similar a la obtenida mediante inmunolocalización simple.

Finalmente, apuntar que la localización múltiple de proteínas, tanto a microscopía confocal como electrónica ha permitido verificar una localización específica y similar a la obtenida en las inmunolocalizaciones simples, siendo este método más rápido y eficiente en la co-localización espacial de proteínas. De esta forma, se ha verificado que el más intenso marcado a microscopía confocal de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2 y Ole e 9 se localiza en la región apertural de emergencia del tubo polínico, así como en el extremo apical de éste, ambas zonas de intensa actividad metabólica. En el caso del ensayo mediante microscopía electrónica, destaca la presencia de Ole e 2 y Ole e 9 en la exina del grano de polen, confirmando su liberación al medio y facilitando la reacción alérgica durante el contacto del polen con las mucosas de los pacientes sensibilizados a estas proteínas.

}

CONCLUSIONES



Van Gogh. *Starry night over the Rhone*
Arles, France: September, 1888
Musée d'Orsay
Paris, France, Europe}



6. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un sistema multiplex para su aplicación en técnicas de inmunotransferencia, microscopía láser confocal y se ha adaptado el método para microscopía electrónica de transmisión. Este sistema permite la detección de múltiples antígenos en polen de olivo, independientemente del origen de la especie de los anticuerpos. El sistema se ha validado en las tres técnicas descritas, logrando la inmunodetección específica de tres antígenos con dos anticuerpos de suero policlonal de conejo y un monoclonal de ratón.
2. Se han obtenido los perfiles antigénicos de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 procedentes de polen maduro de 57 cultivares. Los niveles totales de estos alérgenos y sus isoformas fueron variables cuantitativa y cualitativamente entre variedades de olivo. El estudio de los niveles de expresión de los alérgenos parece indicar un patrón homogéneo en su síntesis proteica, exceptuando el caso de la isoforma de mayor peso molecular de Ole e 2.
3. Se ha evaluado la relación entre diversos parámetros de interés agronómico y los niveles de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en polen maduro de diferentes cultivares:
 - a) Los resultados sugieren una implicación de la capacidad de germinación del grano de polen con altos niveles de Ole e 1 y Ole e 2.
 - b) La autoincompatibilidad de los cultivares de olivo muestra relación con altos niveles en su polen de Ole e 1 y de la isoforma de menor peso molecular de Ole e 2.
 - c) Existe una relación directa entre el día medio de la floración de las variedades y el contenido en su polen de Ole e 1. Los niveles de expresión de Ole e 1 son mayores en variedades con floración tardía.
4. Las altas temperaturas, el elevado volumen y frecuencia de las precipitaciones, así como una alta humedad relativa, anterior y durante la floración, parecen ejercer un efecto en el aumento de la



- expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el polen de olivo.
5. Los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 presentan un aumento en su expresión durante la transición de polen maduro a polen hidratado. El patrón cíclico de la expresión de los alérgenos es común a lo largo del cultivo *in vitro*.
 6. La difusión de isoformas de los alérgenos es diferencial. En el medio de germinación se detectan únicamente dos de las tres isoformas de Ole e 1. Las dos isoformas de Ole e 2 detectadas se liberan al medio de cultivo únicamente al inicio, en el caso de la isoforma de menor peso molecular o de forma homogénea a lo largo del cultivo, en el caso de la isoforma de mayor peso molecular. Los alérgenos Ole e 5 y Ole e 9 muestran una mayor difusión a la mitad y al inicio del cultivo, respectivamente. Además, debido a la liberación de estos alérgenos en medios acuosos, se facilitan las reacciones alérgicas de pacientes sensibilizados a ellos.
 7. Los extractos de polen comerciales testados, de diferente origen varietal y utilizados en diagnóstico e inmunoterapia específica, muestran una variabilidad cuantitativa y cualitativa en los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y una respuesta diferencial a IgEs de pacientes alérgicos a polen de olivo. En orden a simplificar los test de reactividad de diversos extractos varietales frente a IgE y la elección de inmunoterapia específica, se han propuesto 14 grupos de variedades que integran los cultivares estudiados, catalogados según su contenido en los alérgenos de polen Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.
 8. La distribución espacial de los alérgenos Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 2 y del ligando de este último, la actina, se confirma en zonas de intensa actividad metabólica, tales como la región de emergencia del tubo polínico y en su extremo apical. Dichos alérgenos se localizan también en la exina del grano de polen. Estas evidencias, unidas a todos los resultados obtenidos, sugieren que estos alérgenos participan en la hidratación, la germinación del grano de polen, el remodelado del tubo polínico (Ole e 2 y Ole e 9) y la interacción con el estigma.



9. Los resultados presentados se podrían aplicar a la mejora de la producción en el olivar y paralelamente, disminuir las repercusiones en la salud pública que provoca su cultivo intensivo. Los ensayos de campo para alcanzar este objetivo incluirían la utilización de variedades autocompatibles de floración temprana, alternando su cultivo con variedades de alta capacidad germinativa, inter-compatibles con la variedad de interés y cuya fenología permita su uso como polinizadora. La selección de las variedades de cultivo extensivo y de las variedades polinizadoras se podría apoyar en la agrupación de cultivares propuesta, escogiendo aquéllas con baja y moderada o alta cantidad en los alérgenos estudiados, respectivamente. Finalmente, el cultivo debería mantenerse en seco, tanto para evitar una desviación en el índice de compatibilidad de variedades parcialmente autocompatibles, como para mantener bajos los niveles de alérgenos en el grano de polen.

BIBLIOGRAFÍA

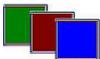


Van Gogh. *Still life with bible*

Nueneu: October, 1885

Van Gogh Museum

Amsterdam, The Netherlands, Europe}



7. BIBLIOGRAFÍA

Abou Chakra OR, Sutra J-P, Demey Thomas E, Vinh JL, Lacroix G, Poncet P, Senechal Hln (2011) Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules *Journal of Proteome Research*.

Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J (1998) Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hamet-ahiti) pollen. *Clin Exp Allergy* 28, 1384-1388.

Alché J, Cismondi I, AJ. C, Hamman Khalifa A, Rodríguez García M (2003) Temporal and spatial gene expression of Ole e 3 allergen in olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Acta biologica cracoviensia Series Botanica* 45, 89-95.

Alché J, Corpas F, Rodríguez-García M, del Río L (1998) Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol Plant* 104, 772-776.

Alche JD, Castro AJ, Jimenez-Lopez JC, Morales S, Zafra A, Hamman-Khalifa AM, Rodriguez-Garcia MI (2007) Differential characteristics of olive pollen from different cultivars: biological and clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 Suppl 1, 17-23.

Alche JD, Castro AJ, Olmedilla A, Fernandez MC, Rodriguez R, Villalba M, Rodriguez-Garcia MI (1999) The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci* 112 (Pt 15), 2501-2509.

Alché JD, Fendri M, Rejón JD (2010) El polen a escala íntima. *Ainnova* 33, 32-33.

Alche JD, M'Rani-Alaoui M, Castro AJ, Rodriguez-Garcia MI (2004) Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol* 45, 1149-1157.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants *J Exp Bot* 53, 1331-1341.

Androulakis II, Loupassaki MH (1990) Studies on the self-fertility of some cultivars in the area of Crete. *Acta Horticulturae* 286, 159-162.

Anyo G, Brunekreef B, de Meer G, Aarts F, Janssen NA, van Vliet P (2002) Early, current and past pet ownership: associations with sensitization, bronchial responsiveness and allergic symptoms in school children. *Clin Exp Allergy* 32, 361-366.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science* 82, 1227-1238.



Arriba-Mendez S, Sanz C, Isidoro-Garcia M, Pascual M, Avila C, Davila I, Lorente F (2008) Analysis of 927T > C CYSLTR1 and -444A > C LTC4S polymorphisms in children with asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 36, 259-263.

Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R (1997) Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 100, 365-372.

Baier G, Stopper H, Kopp C, Winkler U, Zwirner-Baier I (2002) [Respiratory diseases and genotoxicity in tobacco smoke exposed children]. *Laryngorhinootologie* 81, 217-225.

Baluska F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Samaj J, Chua NH, Barlow PW, Volkmann D (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges *Dev Biol* 227, 618-632.

Ballesta F (1998) Genética y alergia. *Allergologia et immunopathologia* 26, 83-86.

Barber D, Carpizo J, Garcia-Rumbao MC, Polo F, Juan F (1990) Allergenic variability in olea pollen. *Ann Allergy* 64, 43-46.

Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodriguez R (2004a) A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity. *J Immunol* 172, 3644-3651.

Barral P, Suarez C, Batanero E, Alfonso C, Alche Jde D, Rodriguez-Garcia MI, Villalba M, Rivas G, Rodriguez R (2005) 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* 390, 77-84.

Barral P, Tejera ML, Trevino MA, Batanero E, Villalba M, Bruix M, Rodriguez R (2004b) Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen, in *Pichia pastoris* yeast: detection of partial oxidation of methionine by NMR. *Protein Expr Purif* 37, 336-343.

Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (2008) El Cultivo del Olivo. *Mundi-Prensa. Junta de Andalucía*.

Barranco D RL (2005) Épocas de floración y maduración. Variabilidad y selección. Variedades del olivo en España *Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa*, 281-292.

Barranco D. TI, Rallo L. (2005) Elaiografía Hispánica. Variedades del olivo en España. *Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa*, 45-232.

Bartolini G (1994) Olive tree germplasm: descriptor list of cultivated varieties in the world. *Act Hort.* 356, 116-118.



- Bartolini G (1998) Olive germplasm: Cultivars and world wide collection. *FAO. ROMA*.
- Batanero E, Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R (1997) Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett* 410, 293-296.
- Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS, Rodriguez R (1996a) Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 241, 772-778.
- Batanero E, Villalba M, Monsalve RI, Rodriguez R (1996b) Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1264-1271.
- Batanero E, Villalba M, Rodriguez R (1994) Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol Immunol* 31, 31-37.
- Besnard G, Bervillé A (2000) Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 323, 173-181.
- Bienz K, Egger D (1998) Electron microscopic-silver enhancement for double labeling with antibodies raised in the same species. *Methods Mol Biol* 80, 313-318.
- Blumenthal MN, Namboodiri K, Mendell N, Gleich G, Elston RC, Yunis E (1981) Genetic transmission of serum IgE Levels. *Am J Med Genet* 10, 219-228.
- Boluda L, Alonso C, Fernandez-Caldas E (1998) Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol* 101, 210-216.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* 209, 435-443.
- Brown JK, Pemberton AD, Wright SH, Miller HR (2004) Primary antibody-Fab fragment complexes: a flexible alternative to traditional direct and indirect immunolabeling techniques. *J Histochem Cytochem* 52, 1219-1230.
- Buchwalow IB, Minin EA, Boecker W (2005) A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting. *Acta Histochem* 107, 143-148.



Burastero SE, Paolucci C, Fabbri M (2009) Ambient pollutants as adjuvant for allergic sensitization: the emerging role of platinum group elements. *J Biol Regul Homeost Agents* 23, 207-215.

Buters JT, Kasche A, *et al.* (2008) Year-to-year variation in release of Bet v 1 allergen from birch pollen: evidence for geographical differences between West and South Germany. *Int Arch Allergy Immunol* 145, 122-130.

Butteroni C, Afferni C, *et al.* (2005) Cloning and Expression of the *Olea europaea* allergen Ole e 5, the pollen Cu/Zn superoxide dismutase. *Int Arch Allergy Immunol* 137, 9-17.

Calvani M, Alessandri C, Sopo SM, Panetta V, Tripodi S, Torre A, Pingitore G, Frediani T, Volterrani A (2004) Infectious and uterus related complications during pregnancy and development of atopic and nonatopic asthma in children. *Allergy* 59, 99-106.

Cardaba B, De Pablo R, *et al.* (1996) Allergy to olive pollen: T-cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens. *Clin Exp Allergy* 26, 316-322.

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK (2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton* 61, 112-127.

Carnes J, Fernandez-Caldas E, Boluda L, Casanovas M, Sastre J, Lluch Bernal M, Blanca M (2002) Rapid release of Ole e 1 from olive pollen using different solvents. *Allergy* 57, 798-804.

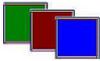
Carnes Sanchez J, Iraola VM, Sastre J, Florido F, Boluda L, Fernandez-Caldas E (2002) Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*. *Allergy* 57, 313-318.

Casanovas M, Florido F, Saenz de San Pedro B, Gonzalez P, Martinez-Alzamora F, Maranon F, Fernandez-Caldas E (1997) Sensitization to *Olea europaea*: geographical differences and discrepancies. *Allergol Immunopathol (Madr)* 25, 159-166.

Castro A (2001) Aproximación a la función biológica del alérgeno mayoritario del polen del olivo (*Ole e 1*). Implicaciones clínicas y ambientales. *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.*

Castro A, Bednarczyk A, Schaeffer-Reiss C, Rodríguez-García M, Van Dorsselaer A, Alché J (2010a) Screening of Ole e 1 polymorphism among olive cultivars by peptide mapping and N-glycopeptide analysis. *Proteomics* 10, 953-962.

Castro AJ, Bednarczyk A, Schaeffer-Reiss C, Rodriguez-Garcia MI, Van Dorsselaer A, de Dios Alche J (2010b) Screening of Ole e 1 polymorphism among olive cultivars by peptide mapping and N-glycopeptide analysis. *Proteomics* 10, 953-962.



Castro AJ, de Dios Alche J, Cuevas J, Romero PJ, Alche V, Rodriguez-Garcia MI (2003) Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1. *Int Arch Allergy Immunol* 131, 164-173.

Cecchi L, D'Amato G, *et al.* (2010) Projections of the effects of climate change on allergic asthma: the contribution of aerobiology. *Allergy* 65, 1073-1081.

Coca AF, Walzer M, Thommen AA (1931) 'Asthma and hay fever in theory and practice: Hypersensitiveness, anaphylaxis, allergy. Asthma, by Matthew Walzer. Hay fever, by August A. Thommen.' (C. C. Thomas).

Conde Hernandez J, Conde Hernandez P, Gonzalez Quevedo Tejerina MT, Conde Alcaniz MA, Conde Alcaniz EM, Crespo Moreira P, Cabanillas Platero M (2002) Antigenic and allergenic differences between 16 different cultivars of *Olea europaea*. *Allergy* 57 Suppl 71, 60-65.

Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM (1989) Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1, 1292-1295.

Corsico R, Falagiani P, *et al.* (2000) An epidemiological survey on the allergological importance of some emerging pollens in Italy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10, 155-161.

Crimi P, Boidi M, Minale P, Tazzer C, Zanrudi S, Ciprandi G (1999) Differences in prevalence of allergic sensitization in urban and rural school children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 83, 252-256.

Cuevas J (2005) Incompatibilidad polen-pistilo. Variedades del olivo en España. *Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa*, 301-308.

Chapman MD (1998) Allergens. *Encyclopedia of Immunology*. 2^a ed. London: Academic Press 1, 1-6.

Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A (2000) Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 106, 409-418.

D'Amato G, Liccardi G (1994) Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 24, 210-219.

D'Amato G, Spieksma FTM, Bonini S (1991) Allergenic Pollen and Pollinosis in Europe. *Blackwell Science, Oxford, UK*.

D'Amato G (2009) Allergenic Pollen and Urban Air Pollution in the Mediterranean Area. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*.

D'Amato G, Bonini S, Bousquet J, Durham SR, Platts-Mills TAE (2001) Pollenosis 2000-Global Approach. *JGJ Editions, Naples, Italy*.



Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T (2007) Proteomics Identification of Differentially Expressed Proteins Associated with Pollen Germination and Tube Growth Reveals Characteristics of Germinated *Oryza sativa* Pollen. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 207-230.

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

De Linares C (2007) Análisis del polen alergógeno en la atmosfera de Granada: Evolución de las concentraciones polínicas, actividad alergénica e incidencia en la población atópica. *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.*

de Nettancourt D (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* 10, 185-199.

Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G (2000) Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 30, 1403-1410.

Díaz de la Guardia C, Alonso R, Bocio I (1991) Análisis de las recetas de vacunas antialérgicas en la provincia de Granada. *Monogr FI Veg Béticas* 6.

Dickinson H, Lewis D (1975) Interaction between the pollen grain coating and the stigmatic surface during compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Raphanus*. In *the Biology of the Male Gamete. Academic Press, London.*, 165-175.

Domínguez E (1995) Aerobiología en Andalucía. El olivo, *Olea europaea*. *Boletín de la red española de aerobiología* 1, 21-22.

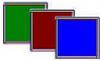
Doris FP, Steer MW (1996) Effects of fixatives and permeabilisation buffers on pollen tubes: implications for localisation of actin microfilaments using phalloidin staining. *Protoplasma* 195, 25-36.

Durham SR, Till SJ (1998) Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 102, 157-164.

Emberlin J, Detandt M, Gehrig R, Jaeger S, Nolard N, Rantio-Lehtimäki A (2002) Responses in the start of *Betula* (birch) pollen seasons to recent changes in spring temperatures across Europe. *Int J Biometeorol* 46, 159-170.

FAO (2008) The FAO Statistical Database (FAOSTAT): Online publication. <http://faostat.fao.org>. *Food and Agriculture Organization of the United Nations.*

Fernández- Escobar R, Gómez Valledor, G., Rallo-Romero L. (1981) Germinación "in vitro" del polen de cultivares de olivo. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 15, 261-272.



- Fernandez-Caldas E, Carnes J, Iraola V, Casanovas M (2007) Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Ann Allergy Asthma Immunol* 98, 464-470.
- Ferreira F, Hirtenlehner K, *et al.* (1996) Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J Exp Med* 183, 599-609.
- Ferri GL, Gaudio RM, Castello IF, Berger P, Giro G (1997) Quadruple immunofluorescence: a direct visualization method. *J Histochem Cytochem* 45, 155-158.
- Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R (1996) Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98, 189-198.
- Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Meyers DA, Ansari AA, Bias WB, Marsh DG (1988) Association of HLA-DR3 with human immune response to Lol p I and Lol p II allergens in allergic subjects. *Tissue Antigens* 31, 211-219.
- Friml J, Benkova E, Mayer U, Palme K, Muster G (2003) Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J* 34, 115-124.
- Galan C, Carinanos P, Garcia-Mazo H, Alcazar P, Dominguez-Vilches E (2001) Model for forecasting *Olea europaea* L. airborne pollen in South-West Andalusia, Spain. *Int J Biometeorol* 45, 59-63.
- Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels MJ, Armentia A, Salcedo G, Gomez L (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* 6, 471-477.
- Geller-Bernstein C, Arad G, Keynan N, Lahoz C, Cardaba B, Waisel Y (1996) Hypersensitivity to pollen of *Olea europaea* in Israel. *Allergy* 51, 356-359.
- Gern JE, Reardon CL, *et al.* (2004) Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 113, 307-314.
- Gibbon BC, Ren H, Staiger CJ (1997) Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function in vitro and in live cells. *Biochem J* 327 (Pt 3), 909-915.
- Gibbon BC, Zonia LE, Kovar DR, Hussey PJ, Staiger CJ (1998) Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell* 10, 981-993.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Baldassare JJ, Pollard TD (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247, 1575-1578.
- Gonzalez EM, Villalba M, Lombardero M, Aalbers M, van Ree R, Rodriguez R (2002) Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use



of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. *Mol Immunol* 39, 93-101.

Goubran Botros H, Poncet P, Rabillon J, Fontaine T, Laval JM, David B (2001) Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens. *Eur J Biochem* 268, 3126-3136.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4, 117.

Griffith IJ, Pollock J, Klapper DG, Rogers BL, Nault AK (1991) Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96, 296-304.

Grote M, Swoboda I, Meagher RB, Valenta R (1995) Localization of profilin- and actin-like immunoreactivity in in vitro-germinated tobacco pollen tubes by electron microscopy after special water-free fixation techniques. *Sexual Plant Reproduction* 8, 180-186.

Grote M, Vrtala S, Valenta R (1993) Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting. *J Histochem Cytochem* 41, 745-750.

Gupta AS, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993) Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress (Induction of Ascorbate Peroxidase in Superoxide Dismutase-Overexpressing Plants). *Plant Physiology* 103, 1067-1073.

Hamman Khalifa A (2005) Utilización de marcadores relacionados con la alergenicidad y la biosíntesis de lípidos para la discriminación entre cultivares de olivo. *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada*.

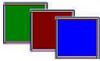
Hamman Khalifa A, Castro, A.J., Rodríguez García, M.I. and Alché, J.D (2008) Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen. *BMC Plant Biology* 8, 10.

He X-h, Wu M, Li S-y, Fan H, Chu Y-z, Liu L-y (2005) Purification and Characterization of Superoxide Dismutase(SOD) from *Camellia* Pollen. *Chemical research in chinese universities* 21, 558-561

He Y, Wetzstein HY (1995) Fixation induces differential tip morphology and immunolocalization of the cytoskeleton in pollen tubes. *Physiologia Plantarum* 93, 757-763.

Heinzmann A, Grotherr P, Jerkic SP, Lichtenberg A, Braun S, Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (2000) Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13-24. *Clin Exp Allergy* 30, 1555-1561.

Hess MW, Mittermann I, Luschnig C, Valenta R (1995) Immunocytochemical localisation of actin and profilin in the generative cell of angiosperm pollen: TEM



studies on high-pressure frozen and freeze-substituted *Ledebouria socialis* Roth (Hyacinthaceae). *Histochem Cell Biol* 104, 443-451.

Hiller R, Laffer S, *et al.* (2002) Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 16, 414-416.

Hiscock SJ, Bright J, McInnis SM, Desikan R, Hancock JT (2007) Signaling on the Stigma: Potential New Roles for ROS and NO in Plant Cell Signaling. *Plant Signal Behav* 2, 23-24.

Hodgkin T, Lyon GD, Dickinson HG (1988) Recognition in flowering plants: A comparison of the Brassica self-incompatibility system and plant pathogen interactions. *New Phytologist* 110, 557-569.

Holt PG (1995) Environmental factors and primary T-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr Allergy Immunol* 6, 1-10.

Hony D, Twell D (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 5, R85.

Howlett BJ, Knox RB, Heslop-Harrison J (1973) Pollen-wall proteins: release of the allergen Antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and *Cosmos*. *J Cell Sci* 13, 603-619.

Huecas S (2001) Biología molecular y caracterización inmunológica de dos alérgenos principales del polen de olivo: Ole e 1 y Ole e 9. *Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.*

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

Hughes CH, Jones RC, Wright DE, Dobbs FF (1999) A retrospective study of the relationship between childhood asthma and respiratory infection during gestation. *Clin Exp Allergy* 29, 1378-1381.

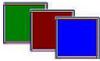
Jahn-Schmid B, Sirven P, *et al.* (2008) Characterization of HLA class II/peptide-TCR interactions of the immunodominant T cell epitope in Art v 1, the major mugwort pollen allergen. *J Immunol* 181, 3636-3642.

Jenkins MA, Hopper JL, Giles GG (1997) Regressive logistic modeling of familial aggregation for asthma in 7,394 population-based nuclear families. *Genet Epidemiol* 14, 317-332.

Jensen HL, Norrild B (2005) Herpes simplex virus-cell interactions studied by immunogold cryosection electron microscopy. *Methods Mol Biol* 292, 143-160.



- Jiménez López J (2008) Caracterización molecular del polimorfismo de las profilinas en el polen de olivo y otras especies alergénicas. *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.*
- Jing W, Xuequn L, Guanghui Y (2009) Identification of superoxide dismutase isoenzymes in tobacco pollen. *Front Biol China* 4, 442-445.
- Kabesch M, Hoefler C, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E (2004) Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax* 59, 569-573.
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB (2002) Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 52, 22-32.
- Kattah MG, Alemi GR, Thibault DL, Balboni I, Utz PJ (2006) A new two-color Fab labeling method for autoantigen protein microarrays. *Nat Methods* 3, 745-751.
- Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH (1987) The erasable Western blot. *Anal Biochem* 161, 89-95.
- Kay AB (1997) Allergy and allergic diseases. *Blackwell science, Oxford.*
- Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M (2000) Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 30, 201-208.
- Kim MJ, Park HY, Kim J, Ryu J, Hong S, Han SJ, Song R (2008) Western blot analysis using metal-nitrilotriacetate conjugated CdSe/ZnS quantum dots. *Anal Biochem* 379, 124-126.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W (1994) Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 224-233.
- King TP, Norman PS, Connell JT (1964) Isolation and Characterization of Allergens from Ragweed Pollen. Ii. *Biochemistry* 3, 458-468.
- Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, Bursill LA (1997) Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 27, 246-251.
- Köhler F (1887) Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica. (Ed.) Gera-Untermhaus
- Kovar DR, Drobak BK, Staiger CJ (2000) Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell* 12, 583-598.
- Krajewski S (2009) "Rainbow" western blotting. *Methods Mol Biol* 536, 463-472.



Lachowsky F, Lopez M (2001) Occupational allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 1, 587-593.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Latalova M. MM, Uruska A. (2002) Seasonal variations in the atmospheric Betula pollen count in Gdansk (southern Baltic coast) in relation to meteorological parameters. *Aerobiologia* 18, 33-43.

Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U (2000) Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 356, 1392-1397.

Lauzurica P, Maruri N, Galocha B, Gonzalez J, Diaz R, Palomino P, Hernandez D, Garcia R, Lahoz C (1988) Olive (*Olea europea*) pollen allergens II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol Immunol* 25, 337-344.

Lavee S (1994) ¿Por qué la necesidad de nuevas variedades de olivo? *Fruticultura profesional* 62, 29-38.

Lavee S, Taryan J, Levin J, Haskal A (2002) Importancia de la polinización cruzada en distintas variedades de olivo cultivadas en olivares intensivos de regadío. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional* 91, 25-36.

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

Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R (1998b) 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* 258, 454-459.

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

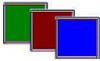
Ledesma A, Villalba M, Vivanco F, Rodriguez R (2002) Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens. *Allergy* 57, 40-43.

Lewis Carl SA, Gillete-Ferguson I, Ferguson DG (1993) An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. *J Histochem Cytochem* 41, 1273-1278.

Li YQ., Moscatelli A., Cai G., M. C (1997) Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants. *Int Rev Cytol.* 176, 133-199.



- Liu CA, Wang CL, Chuang H, Ou CY, Hsu TY, Yang KD (2003) Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 112, 899-904.
- Lombardero M, Barbas JA, Moscoso del Prado J, Carreira J (1994) cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. *Clin Exp Allergy* 24, 765-770.
- Lombardero M, Quirce S, Duffort O, Barber D, Carpizo J, Chamorro MJ, Lezaun A, Carreira J (1992) 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* 89, 884-894.
- Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221, 95-104.
- Llanes E, Quiralte J, Lopez E, Sastre B, Chacartegui M, del Pozo V, Palomino P, Lahoz C, Cardaba B (2009) Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. *Int Arch Allergy Immunol* 148, 228-238.
- M'rani-Alaoui M (2000) Estudio a nivel celular de la germinación del polen, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europaea* L.). *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.*
- Makrides SC, Gasbarro C, Bello JM (2005) Bioconjugation of quantum dot luminescent probes for Western blot analysis. *Biotechniques* 39, 501-506.
- Mao S-Y, Walker JM (2002) Conjugation of Fluorochromes to Antibodies. *The Protein Protocols Handbook (Humana Press)* 351-354.
- Marsh DG, Meyers DA, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Roebber M, Norman PS, Hsu SH, Bias WB (1982) HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. II. Response after ragweed immunotherapy. *J Exp Med* 155, 1452-1463.
- Martin K, Hart C, Liu J, Leung WY, Patton WF (2003) Simultaneous trichromatic fluorescence detection of proteins on Western blots using an amine-reactive dye in combination with alkaline phosphatase- and horseradish peroxidase-antibody conjugates. *Proteomics* 3, 1215-1227.
- Martinez A, Asturias JA, *et al.* (2002) The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy* 57 Suppl 71, 17-23.
- Mascarenhas JP (1993) Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* 5, 1303-1314.
- Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S (2002) Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 110, 381-387.



- McCormick S (1993) Male Gametophyte Development. *The Plant Cell Online* 5, 1265-1275.
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O (1996) Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiology* 111, 1177-1181.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J (1993) Superoxide Dismutase Enhances Tolerance of Freezing Stress in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 103, 1155-1163.
- Meltzer EO (2001) Quality of life in adults and children with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 108, S45-53.
- Méndez de Inocencio J, Huerta López, J.G., Bellanti, J.A., Ovilla Martínez, R., Escobar Gutiérrez, A. (2009) Alergia. Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos. *Editorial médica panamericana*.
- Miescher SM, Vogel M (2002) Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med* 23, 413-462.
- Mittermann I, Swoboda I, Pierson E, Eller N, Kraft D, Valenta R, Heberle-Bors E (1995) Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation. *Plant Molecular Biology* 27, 137-146.
- Moffatt MF, Cookson WO (1998) The genetics of asthma. Maternal effects in atopic disease. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 1, 56-61; discussion 65-56.
- Morales S, Alché Ramírez JdD, Rodríguez García MI (2010) Advances in multilabeling for TEM and CLSM using primary antibodies derived from the same species. Application of Fab fragments to co-localize olive pollen allergens. In *'Microscopy: Science, Technology, Applications and Education'*. (Ed. Formatex).
- Morales S, Jimenez-Lopez JC, Castro AJ, Rodriguez-Garcia MI, Alche JD (2008) Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. *J Microsc* 231, 332-341.
- Moverare R, Westritschnig K, *et al.* (2002) Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 128, 325-335.
- Muschietti J, Dircks L, Vancanneyt G, McCormick S (1994) LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *The Plant Journal* 6, 321-338.
- Mygind N, Dahl, R., Pedersen, S., Thestrup-Pedersen, K. (1996) Allergens. *Essential allergy*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 81.



Napoli A, Aiello D, Di Donna L, Sajjad A, Perri E, Sindona G (2006) Profiling of hydrophilic proteins from *Olea europaea* olive pollen by MALDI TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 78, 3434-3443.

Negoescu A, Labat-Moleur F, Lorimier P, Lamarcq L, Guillermet C, Chambaz E, Brambilla E (1994) F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence. *J Histochem Cytochem* 42, 433-437.

Nielsen B, Borup-Christensen P, Erb K, Jensenius JC, Husby S (1987) A method for the blocking of endogenous immunoglobulin on frozen tissue sections in the screening of human hybridoma antibody in culture supernatants. *Hybridoma* 6, 103-109.

Ober C, Yao TC (2011) The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 242, 10-30.

Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, Kurzius-Spencer M, Guerra S, Wright AL (2003) TGF-beta in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 112, 723-728.

Odén PC, Karlsson G, Einarsson R (1992) Demonstration of superoxide dismutase enzymes in extracts of pollen and anther of zea mays and in two related products, baxtin® and polbax®. *Grana* 31, 76-80.

Oguma T, Palmer LJ, Birben E, Sonna LA, Asano K, Lilly CM (2004) Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med* 351, 1752-1763.

Oke TR (1987) *Boundary Layer Climates*. London: Routledge.

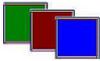
Orlandi F, Sgromo C, Bonofiglio T, Ruga L, Romano B, Fornaciari M (2010) Spring Influences on Olive Flowering and Threshold Temperatures Related to Reproductive Structure Formation. *HortScience* 45, 1052-1057.

Ostrander DB, Gorman JA, Carman GM (1995) Regulation of profilin localization in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphoinositide metabolism. *J Biol Chem* 270, 27045-27050.

Owen GR, Hakkinen L, Wu C, Larjava H (2010) A reproducible technique for specific labeling of antigens using preformed fluorescent molecular IgG-F(ab')₂ complexes from primary antibodies of the same species. *Microsc Res Tech* 73, 623-630.

Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodriguez R (2005) 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 35, 345-351.

Palomares O, Villalba M, Rodriguez R (2003) The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain



with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J* 369, 593-601.

Pomes A (2002) Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy* 57, 673-679.

Potocky M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Zarsky V (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* 174, 742-751.

Prenner C, Mach L, Glossl J, Marz L (1992) The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine. *Biochem J* 284 (Pt 2), 377-380.

Quirarte J, Palacios L, Rodriguez R, Cardaba B, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Lahoz C (2007) Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 Suppl 1, 24-30.

Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ (1994) Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40, 57-75.

Rallo L (2005) Variedades de olivo en España: una aproximación cronológica. *Variedades de olivo en España*, 15-45.

Ren H, Xiang Y (2007) The function of actin-binding proteins in pollen tube growth. *Protoplasma* 230, 171-182.

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

Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Salamanca G (2007) Emerging pollen allergens. *Biomed Pharmacother* 61, 1-7.

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

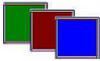
Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E (2000) Potencial diagnóstico y terapéutico de alérgenos purificados: Alérgenos del polen de olivo como modelo. *Alergología e inmunología clínica* 15, 114-134.

Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E, Ledesma A, Tejera ML, Huecas S, García M, García I (1998) Perfiles de reconocimiento alérgico del polen de olivo. Aplicación en la diagnosis e inmunoterapia. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat (Esp)* 92, 253.

Roggen HPJR, Stanley RG (1969) Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* 84, 295-303.



- Romagnani S (2004) The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112, 352-363.
- Sabariego S (2003) Estudio aerobiológico del polen y las esporas de la atmósfera de Almería: Modelos de pronósticos e incidencia en la población atópica. *Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.*
- Salamanca G, Rodriguez R, Quiralte J, Moreno C, Pascual CY, Barber D, Villalba M (2010) Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree. *FEBS J* 277, 2729-2739.
- Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G (1992) Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem J* 281 (Pt 2), 401-405.
- Sanz C, Isidoro-Garcia M, Davila I, de Pedro MP, Mendez Sde A, Padron J, Ruiz-SanFrancisco A, Lorente F (2009) A new PTGDR promoter polymorphism in a population of children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 20, 151-156.
- Serrano I, Suárez C., Olmedilla A, HF. R, MI. R-G (2008) Structural organization and cytochemical features of the pistil in Olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual at anthesis *Sexual Plant Reproduction* 21, 99-111.
- Shamji MH, Durham SR (2011) Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 41, 1235-1246.
- Singh SS, Chauhan A, Murakami N, Chauhan VP (1996) Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry* 35, 16544-16549.
- Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16, 465-472.
- Staiger CJ, Goodbody KC, Hussey PJ, Valenta R, Drobak BK, Lloyd CW (1993) The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J* 4, 631-641.
- Staines WA, Meister B, Melander T, Nagy JI, Hokfelt T (1988) Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section. *J Histochem Cytochem* 36, 145-151.
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
- Strachan DP (1995) Epidemiology of hay fever: towards a community diagnosis. *Clin Exp Allergy* 25, 296-303.
- Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A, Fernández J, Jerez M, Ferreiro M (1998) Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Rev Esp Allergol Inmunol Clín* 13, 45-58.



- Suen DF, Wu SS, Chang HC, Dhugga KS, Huang AH (2003) Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. *J Biol Chem* 278, 43672-43681.
- Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, Knox RB (1992) Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 339, 569-572.
- Szechynska-Hebda M, Wedzony M, Dubas E, Kieft H, van Lammeren A (2006) Visualisation of microtubules and actin filaments in fixed BY-2 suspension cells using an optimised whole mount immunolabelling protocol. *Plant Cell Rep* 25, 758-766.
- Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R (1999) Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 104, 797-802.
- Torrecillas M, Muñoz C, Palomeque M, de la Fuente J, Barceló J, Vega Chicote J, Miranda A, García González J (1996) Patrón de sensibilización a pólenes en Málaga en 1990 y 1995. *XX congreso de la SEAIC* 14, 4-5.
- Trevino MA, Garcia-Mayoral MF, Barral P, Villalba M, Santoro J, Rico M, Rodriguez R, Bruix M (2004) NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem* 279, 39035-39041.
- Tsurui H, Nishimura H, Hattori S, Hirose S, Okumura K, Shirai T (2000) Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J Histochem Cytochem* 48, 653-662.
- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH (2002) Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 3, 715-720.
- Valenta R, Duchene M, *et al.* (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 175, 377-385.
- Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 29, 896-904.
- Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V (2011) Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* 66, 775-783.
- Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D (1998) Recombinant allergens. *Allergy* 53, 552-561.
- van Ree R (1997) Analytic aspects of the standardization of allergenic extracts. *Allergy* 52, 795-805.
- van Ree R (2007) Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol* 119, 270-277; quiz 278-279.



- Vidali L, Hepler PK (1997) Characterization and localization of profilin in pollen grains and tubes of *Lilium longiflorum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 36, 323-338.
- Vidali L, Hepler PK (2001) Actin and pollen tube growth. *Protoplasma* 215, 64-76.
- Villalba M, Batanero E, Lopez-Otin C, Sanchez LM, Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lahoz C, Rodriguez R (1993) The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem* 216, 863-869.
- Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lahoz C, Rodriguez R (1994) Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem* 269, 15217-15222.
- von Mutius E (1999) Allergy and the environment. *Allergy* 54 Suppl 56, 16-17.
- von Witsch M, Baluska F, Staiger CJ, Volkmann D (1998) Profilin is associated with the plasma membrane in microspores and pollen. *European Journal of Cell Biology* 77, 303-312.
- Vrtala S, Grote M, Duchene M, van Ree R, Kraft D, Scheiner O, Valenta R (1993) Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol* 102, 160-169.
- Wadonda-Kabondo N, Sterne JA, Golding J, Kennedy CT, Archer CB, Dunnill MG (2004) Association of parental eczema, hayfever, and asthma with atopic dermatitis in infancy: birth cohort study. *Arch Dis Child* 89, 917-921.
- Waisel Y, Geller-Bernstein C (1996) Reliability of olive pollen extracts for skin prick tests. *J Allergy Clin Immunol* 98, 715-716.
- Wang BL, Larsson LI (1985) Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining. Novel light and electron microscopical double and triple staining method employing primary antibodies from the same species. *Histochemistry* 83, 47-56.
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH (2008) Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148, 1201-1211.
- Weber A, Schroder H, Thalberg K, Marz L (1987) Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. *Allergy* 42, 464-470.
- Weidinger S, Gieger C, *et al.* (2008) Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet* 4, e1000166.
- Wessel GM, McClay DR (1986) Two embryonic, tissue-specific molecules identified by a double-label immunofluorescence technique for monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 34, 703-706.
- Wheeler AW (1992) Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*). *Clin Exp Allergy* 22, 1052-1057.



Wirtz KW (1997) Phospholipid transfer proteins revisited. *Biochem J* 324 (Pt 2), 353-360.

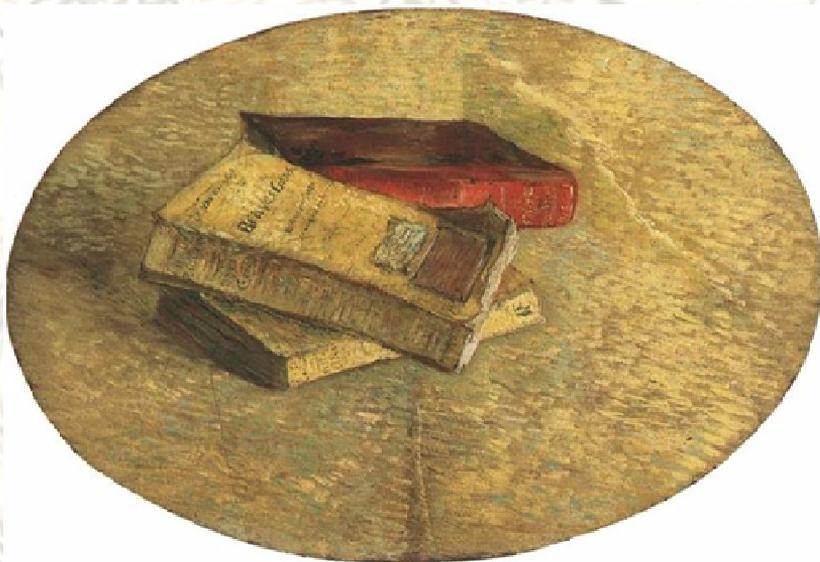
Xing Y, Chaudry Q, *et al.* (2007) Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nat Protoc* 2, 1152-1165.

Yuan W, Fonager K, Olsen J, Sorensen HT (2003) Prenatal factors and use of anti-asthma medications in early childhood: a population-based Danish birth cohort study. *Eur J Epidemiol* 18, 763-768.

Zafra A (2007) Caracterización preliminar del polimorfismo de la proteína alergénica Ole e 5 en el polen del olivo de distintos cultivares. *Máster. Universidad de Granada.*

}

ANEXOS



Van Gogh. *Still life with three books*
Paris: March-April, 1887
Van Gogh Museum
Amsterdam, The Netherlands, Europe}



8. ANEXOS

8.1 LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la secuencia de acontecimientos de la respuesta inmediata dependiente de linfocitos T en la alergia tipo I.	2
Figura 2. Factores genéticos y ambientales involucrados en el desarrollo de la sensibilización y progresión de las enfermedades alérgicas.	9
Figura 3. Distribución geográfica del cultivo en el mundo	15
Figura 4. Detalle de una rama de olivo, de una flor de olivo mostrando las dos anteras y el pistilo y de la exina reticulada de un grano de polen de olivo.	16
Figura 5. Esquema de la microesporogénesis y la microgametogénesis de la mayoría de angiospermas (polen bicelular).	19
Figura 6. Espectro de excitación y emisión de los anticuerpos conjugados a fluorocromos ensayados.	42
Figura 7. Organigrama para la detección multiplex fluorescente de los alérgenos de polen de olivo Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en Western blots.	53
Figura 8. Detección fluorescente de los alérgenos de polen de olivo Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en Western blots.	55
Figura 9. Análisis cuantitativo de la intensidad de las bandas reactivas observadas en el blot multiplex, correspondientes a los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	56
Figura 10. Tinción con plata de extractos totales proteicos de 57 cultivares diferentes y detección multiplex de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	59
Figura 11. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección de Ole e 1 en 57 cultivares.	61
Figura 12. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección Ole e 2 en 57 cultivares.	62
Figura 13. Cuantificación relativa de las bandas correspondientes a la detección de Ole e 5 y Ole e 9 en 57 cultivares .	62
Figura 14. Comparación de los niveles de Ole e 1 en los grupos de variedades con baja y alta capacidad germinativa.	67
Figura 15. Comparación de los niveles de Ole e 5 y Ole e 9 en los grupos de variedades con baja y alta capacidad germinativa.	67
Figura 16. Comparación entre los niveles de Ole e 2 en los grupos de variedades con baja y alta capacidad germinativa.	68
Figura 17: Comparación entre los niveles de Ole e 1 y de la isoforma Ole e 2 de 14 kDa en los grupos de variedades autoincompatibles, parcialmente autocompatibles y autocompatibles.	72
Figura 18: Comparación entre los niveles de isoformas de Ole e 1 en los grupos de variedades de floración temprana, floración intermedia y floración tardía.	76
Figura 19. Tinción con azul de Coomassie de extractos totales proteicos de siete cultivares diferentes a lo largo de diversos años y	



detección multiplex de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	78
Figura 20. Gráficos de diferentes variedades mostrando la distribución de datos de las temperaturas respecto a la expresión del alérgeno Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	85
Figura 21. Gráficos de diferentes variedades mostrando la distribución de datos de las precipitaciones, humedad relativa y número de días de lluvia respecto a la expresión del alérgeno Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	85
Figura 22. Germinación <i>in vitro</i> de polen de olivo durante las fases de polen maduro (Pm), polen hidratado (Ph), y desde 5 minutos (5') hasta varias horas de germinación (1h, 4h, 7h, 13h) e inmunodetección multiplex en blots de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9.	87
Figura 23. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 1 en polen germinado, polen no germinado y medio de cultivo.	88
Figura 24. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 2 en polen germinado, polen no germinado y medio de cultivo.	89
Figura 25. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 5 en en polen germinado, polen no germinado y medio de cultivo.	90
Figura 26. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Ole e 9 en polen germinado, polen no germinado y medio de cultivo.	91
Figura 27. Tinción con plata de extractos comerciales totales de polen de olivo de cinco diferentes cultivares de olivo y un extracto total genérico de olivo, de origen varietal desconocido. Detección multiplex fluorescente de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 sobre la misma inmunotransferencia.	95
Figura 28. Análisis cuantitativo de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 detectados en la inmunotransferencia de la figura 27.	96
Figura 29. Análisis de la capacidad de enlace de IgE a proteínas totales de polen de olivo procedentes de extractos comerciales de cinco variedades y un extracto genérico de olivo (<i>Olea europaea</i>) por inmunotransferencia.	97
Figura 30. Localización de Ole e 1 en el grano de polen germinado <i>in vitro</i> por inmunofluorescencia a CLSM.	101
Figura 31. Inmunolocalización a CLSM del alérgeno Ole e 2 (profilina) en polen de olivo cultivado <i>in vitro</i> con procesamiento convencional de muestras.	103
Figura 32. Inmunolocalización de profilina en preparaciones de polen de olivo cultivado <i>in vitro</i> tras el uso de un protocolo extendido que incluye digestión de pared celular y alta permeabilización de membrana.	104
Figura 33. Inmunolocalización a CLSM de actina en preparaciones de polen de olivo cultivado <i>in vitro</i> después de un tratamiento extendido de fijación, digestión celular y permeabilización de membrana.	105
Figura 34. Localización simultánea de tres diferentes alérgenos mediante CLSM en preparaciones <i>in vitro</i> de granos de polen de olivo germinado durante 4 h.	107



Figura 35. Inmunolocalización de profilinas mediante TEM sobre secciones ultrafinas de granos de polen maduro.	108
Figura 36. Inmunolocalización a TEM de profilina sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo en germinación.	109
Figura 37. Inmunolocalización a TEM de actina sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo maduro.	110
Figura 38. Inmunolocalización a TEM de Ole e 9 sobre secciones ultrafinas de granos de polen de olivo maduro.	111
Figura 39. Inmunolocalización múltiple de actina y de los alérgenos Ole e 2 y Ole e 9 sobre secciones ultrafinas de granos de polen maduro.	112



8.2 LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Principales fuentes biológicas de alérgenos.	5
Tabla 2. Alérgenos descritos del polen de olivo.	21
Tabla 3. Variedades y cruzamientos de olivo en los que se basa el estudio.	31
Tabla 4. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunodetección de proteínas sobre membrana.	39
Tabla 5. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunodetección de proteínas sobre membrana.	40
Tabla 6. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y múltiple de proteínas a TEM.	46
Tabla 7. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y múltiple de proteínas a TEM.	46
Tabla 8. Anticuerpos primarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y multiplex de proteínas a CLSM.	49
Tabla 9. Anticuerpos secundarios y diluciones ensayadas en inmunolocalización convencional y multiplex de proteínas a CLSM.	49
Tabla 10. Dianas y anticuerpos usados para el procedimiento de detección multiplex en experimentos de Western blot.	54
Tabla 11. Distribución en terciles de datos correspondientes a las intensidades relativas de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en 57 cultivares.	63
Tabla 12. Análisis de correlación bivariada entre los alérgenos de 57 cultivares.	64
Tabla 13. Comparación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en variedades con baja y alta capacidad de germinación <i>in vitro</i> .	66
Tabla 14. Análisis de correlación bivariada entre el índice de autocompatibilidad y diversos alérgenos en variedades.	70
Tabla 15. Comparación de la expresión de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 y el índice de compatibilidad. Test de Kruskal-Wallis.	71
Tabla 16. Fecha media de plena floración de variedades y agrupación según éstas.	74
Tabla 17. Análisis de correlación bivariada entre el día medio de floración de variedades y nivel de diversos alérgenos.	74
Tabla 18. Análisis de diferencias de medias en el contenido de alérgenos en los grupos según la época de floración de variedades.	75
Tabla 19. Análisis de correlación bivariada de la expresión de las isoformas del alérgeno Ole e 1 con diversos parámetros climáticos.	80
Tabla 20. Análisis de correlación bivariada de la expresión de las bandas observadas del alérgeno Ole e 2 con diversos parámetros climáticos.	82
Tabla 21. Análisis de correlación bivariada de la expresión de Ole e 5 con diversos parámetros climáticos.	83
Tabla 22. Análisis de correlación bivariada de la expresión de Ole e 9 con diversos parámetros climáticos.	84
Tabla 23. Análisis de correlación bivariada entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 durante su germinación <i>in vitro</i> .	92

Listado de tablas



Tabla 24. Análisis de correlación bivariada entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 en el medio de cultivo durante su germinación <i>in vitro</i> .	93
Tabla 25. Agrupación de variedades dependiendo del contenido total de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 9 .	98



8.3 ABREVIATURAS

AC	Autocompatible
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Autoincompatible
AP	Autopolinización
Ap	Apertura
APC	Células presentadoras de antígeno
APS	Persulfato amónico
Ar	Argón
BGMO	Banco mundial de germoplasma del olivo
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citoplasma
cDNA	ADN complementario
CLSM	Microscopio de escaneo láser confocal
COI	Consejo Oleícola Internacional
Cu/Zn-SOD	Cupro/zinc superóxido dismutasa
DAB	3,3'-diaminobencidina
DO ₅₉₅	Densidad óptica a 595 nm
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EEZ	Estación Experimental del Zaidín
EGTA	Ácido etilen-glicol tetraacético
Ex	Exina
Fab	Fragmento del anticuerpo de unión a antígenos
Fc	Fragmento cristalizable del anticuerpo
FAO	Organización para la alimentación y agricultura
GP	Grano de polen
GUE	Guéjar Sierra
GWAS	Asociación por rastreo genómico
He/Ne	Helio/Neón
HLA	Antígeno leucocitario humano
HR	Humedad relativa
HRm	Humedad relativa media
IC	Índice de autocompatibilidad
Ig	Inmunoglobulina
IgE/G	Inmunoglobulina E/G
IgG (H+L)	Inmunoglobulina G (cadena pesada+cadena ligera)
IL	Interleucina o interleuquina
In	Intina
IT	Inmunotransferencia
LTP	Proteína de transferencia de lípidos
M	Mitocondria
MCO	Museo de la cultura del olivo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MTSB	Tampón estabilizador de microtúbulos
N	Núcleo



PAI	Parcialmente autoincompatible
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Polinización cruzada
PEG	Poli-etilen-glicol
PH	Polen hidratado
PL	Polinización libre
PF	Paraformaldehído
PIPES	Ácido piperazin-N,N2-bis(2-etanosulfónico)
PLP	Poli-L-prolina
PM	Polen maduro
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p/v	Peso/volumen
PVDF	Fluoruro de polivinilidina
RAST	Test de radioalergoabsorción
RE	Reticulo endoplasmático
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico
SOD	Enzima superóxido dismutasa
sp	Especies
SPT	Test de punción en la piel
T ^a	Temperatura
TBS	Tampón tris salino
TBST	Tampón tris salino tween-20
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N,N'-tetra-metil-etilendiamina
Th1/Th2	Células T colaboradoras de tipo 1 ó 2
Tm	Temperatura media
TP	Tubo polínico
Tricina	N-tri (hidroximetil) metil) glicina
Tris-base	Tris (hidroximetil)-aminometano
UV	Luz ultravioleta UV
V	Vacuola
v/v	Volumen/volumen



4 PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

Publicaciones internacionales:

Morales S, Jiménez-López JC, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD (2012). A novel multiplex method for the simultaneous detection and relative quantification of pollen allergens. *Electrophoresis* (en revisión).

Soleimani A, **Morales S**, Jiménez-López JC, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD (2012). Differential expression and sequence polymorphism of Ole e 1, a gene product of relevance for olive pollen physiology and allergenicity in two Iranian cultivars. *Iranian J Asthma, allergy and immunology* (enviado).

Jimenez-Lopez JC, **Morales S**, Castro AJ, Volkmann D, Rodríguez-García MI, Alché JD (2012). Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. *PLoS ONE* (en prensa).

Morales S, Rodriguez-García MI, Alché JD (2010). Advances in multilabeling for TEM and CLSM using primary antibodies derived from the same species. Application of Fab fragments to co-localize olive pollen allergens. *Formatex. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.)
<http://hdl.handle.net/10261/32446>

Morales S, Jiménez-López JC, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD (2008). Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. *Journal of microscopy* 231:332-341.
<http://hdl.handle.net/10261/32758>

Alché JD, Castro AJ, Jiménez-López JC, **Morales S**, Zafra A, Hamman-Khalifa AM, Rodríguez-García MI (2007). Differential characteristics of olive pollen from different cultivars: Biological and Clinical Implications. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 17, Suppl. 1:69-75.
<http://hdl.handle.net/10261/32754>

Publicaciones de divulgación científica:

Rejón JD, Fendri M, **Morales S**, Suárez C, Zafra A, Alché JD (2010). Ciencia Visual: El polen a escala íntima. Fotografías. *Ainnova* 14:32-33.
<http://hdl.handle.net/10261/39527>

Alché, JD, Castro AJ, Olmedilla A, Jiménez-López JC, Suárez C, Serrano I, **Morales S**, Fendri M, Zafra A, Rejón JD, Rodríguez-García MI (2007). Estudios sobre la reproducción sexual en el olivo. Actas VI Jornadas Internacionales de Olivar Ecológico. *Ecoliva* 35-40. Ed. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.
<http://hdl.handle.net/10261/39645>



Contribuciones a congresos internacionales:

Morales S, Ferreira E, Ribeiro H, Amorim I, Calado L, Castro A, Rodríguez-García MI, Alché JD, Abreu I.

Póster-oral: Assessment of the Allergenic Content of Olive Pollen from Portuguese Cultivars.

28th International Horticultural Congress. Lisboa, Portugal. 22-27 Agosto 2010.

<http://hdl.handle.net/10261/32921>

S Morales, N Ribeiro, L Calado, MI Rodríguez-García, JD Alche, I Abreu.

Póster: Análisis preliminar del contenido alergénico del polen de variedades de olivo de Portugal.

1^a Workshop Bioplant. Porto, Portugal. 10 Julio 2009.

http://www.map.edu.pt/bioplant/Ficheiros/Workshop1_BioPlant_caderno%20de%20resumos_final.pdf

Alché JD, Castro AJ, Jiménez-López JC, Zafra A, **Morales S**, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI.

Póster: Allergenic proteins in the context of pollen-stigma signalling in the olive.

Cell-cell communication in plant reproduction. Bath, U.K. 16-19 Septiembre 2009.

<http://hdl.handle.net/10261/40078>

S Morales, N Ribeiro, L Calado, MI Rodríguez-García, JD Alche, I Abreu.

Póster: Análisis preliminar del contenido alergénico del polen de variedades de olivo de Portugal.

XVI International A.P.L.E. Symposium of Palynology. Mallorca, España. Septiembre 2008.

<http://hdl.handle.net/10261/40065>

Zafra A, Jiménez-López JC, **Morales S**, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD.

Póster: Molecular characterization and polymorphism of superoxide dismutase (SOD) in olive (*Olea europaea* L.) pollen. Putative roles in the interaction pollen-stigma.

XX International Congress on Sexual Plant Reproduction. Brasília, Brasil. 4-8 Agosto 2008.

<http://hdl.handle.net/10261/32891>

Ali Soleimani, Juan de Dios Alché, Alireza Talaie, Zabiholah Zamani, José Carlos Jiménez, Mohammed Reza Naghavi and **Sonia Morales**.

Comunicación oral: cDNA study of olive pollen profilin in two Iranian cultivars "Rowghani and Zard".

The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Teherán, Irán. 24-26 Noviembre 2007.

<http://hdl.handle.net/10261/40063>

José Carlos Jiménez-López, **Sonia Morales**, Antonio Jesús Castro, María Isabel Rodríguez-García and Juan de Dios Alché.

Póster: Sequence polymorphism of Ole e 2 allergen (profilin) in olive tree cultivars. Biological and clinical implications.



2nd International Symposium on Molecular Allergology. Roma, Italia. 22-24 Abril 2007.

<http://www.allergome.org/meetings/rome2007/AbstractSubmitted.html>

Sonia Morales, Cynthia Suárez, José Carlos Jiménez-López, María Isabel Rodríguez-García and Juan de Dios Alché.

Póster: Application of CLSM and 3-D reconstruction techniques to the localization of allergenic proteins in olive (*Olea europaea* L.) pollen.

Focus on Microscopy. Valencia, España. 10-13 Abril 2007.

<http://hdl.handle.net/10261/32875>

JD Alché, AJ Castro, JC Jiménez-López, **S Morales**, C Suárez, AM Hamman-Khalifa and MI Rodríguez-García.

Comunicación oral: Allergenic proteins throughout pollen development and *in vitro* germination in the olive tree (*Olea europaea* L.).

8th International Botanical Microscopy Meeting. Salzburgo, Austria. 31 Marzo-5 Abril 2007.

<http://hdl.handle.net/10261/40032>

Juan de Dios Alché, Antonio Jesús Castro, Adela Olmedilla, José Carlos Jiménez-López, Cynthia Suárez, Irene Serrano, **Sonia Morales**, Adoración Zafra, Juan David García y María Isabel Rodríguez-García.

Comunicación oral: Estudios sobre la reproducción sexual en el olivo.

Ecoliva 2007. XI Jornadas internacionales del olivar ecológico. Jaén, España. 22-25 Marzo 2007.

<http://hdl.handle.net/10261/39645>

Sonia Morales, José Carlos Jiménez-López, Antonio Jesús Castro, María Isabel Rodríguez-García y Juan de Dios Alché.

Comunicación oral: Caracterización molecular y localización de profilinas en polen de olivo.

XV Congreso de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española (A.P.L.E.). Málaga, España. 18-21 Septiembre 2006.

<http://hdl.handle.net/10261/40015>

José Carlos Jiménez-López, **Sonia Morales**, Juan de Dios Alché y María Isabel Rodríguez-García.

Comunicación oral: Técnicas avanzadas de microscopía para el estudio de la estructura y la localización de componentes celulares en el polen del olivo.

XV Congreso de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española (A.P.L.E.). Málaga, España. 18-21 Septiembre 2006.

<http://hdl.handle.net/10261/40009>

Juan de Dios Alché, José Carlos Jiménez-López, **Sonia Morales**, AbdelMounim Hamman-Khalifa, Antonio Jesús Castro y María Isabel Rodríguez-García.

Comunicación oral: Polimorfismo alérgico en el polen de variedades de olivo. Implicaciones reproductivas y clínicas.

XV Congreso de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española (A.P.L.E.). Málaga, España. 18-21 Septiembre 2006.

<http://hdl.handle.net/10261/40013>



Alché JD, Jiménez-López JC, **Morales S**, Castro AJ, Rodríguez-García MI.
Comunicación oral: Characterization of profilin polymorphism in the pollen of olive (*Olea europaea* L.) cultivars.
XIX Internacional Congreso on Sexual Plant Reproduction. From gametes to genes.
Budapest, Hungría. 11-15 Julio 2006.
<http://hdl.handle.net/10261/40003>

Jiménez-López JC, **Morales S**, Alché JD and Rodríguez-García MI.
Comunicación oral: Profilin variability in olive (*Olea europaea* L.) pollen cultivars.
XII International Conference on plant embryology. Cracovia, Polonia. 5-7
Septiembre 2005.
<http://hdl.handle.net/10261/39992>

Contribuciones a congresos nacionales:

S Morales, JC Jiménez-López, C Suárez, AJ Castro, JD Alché y MI Rodríguez-García.
Comunicación oral: Localización de proteínas alergénicas y análisis estructural en el polen de *Olea europaea* L. mediante técnicas de microscopía fotónica.
XXIII Reunión Bienal de la Sociedad de Microscopía de España. Bilbao, España. 3-6
Julio 2007.
<http://hdl.handle.net/10261/40037>

Juan de Dios Alché, Antonio Jesús Castro-López, José Carlos Jiménez-López, **Sonia Morales**, Adoración Zafra y Maria Isabel Rodríguez-García.
Comunicación oral: Carácter alergénico diferencial del polen de olivo de distintas variedades.
I Jornadas del Grupo de Olivo de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas.
Córdoba, España. 9-10 Octubre 2006.
<http://hdl.handle.net/10261/40031>

JC Jiménez-López, **S Morales**, AJ Castro, JD Alché, MI Rodríguez-García.
Comunicación oral: Caracterización y localización de profilinas en el grano de polen de olivo durante la germinación.
XI Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Cádiz, España. 3-6
Noviembre 2005.
<http://hdl.handle.net/10261/32873>

Sonia Morales, José Carlos Jiménez, Antonio J. Castro, Josef Voglemeir, María Isabel Rodríguez-García y Juan de Dios Alché.
Póster: Localización de profilinas en tubos polínicos de olivo, obtenidos mediante germinación *in vitro*.
XXII Reunión Bienal de la Sociedad de Microscopía de España (SME). Granada, España. 28 junio- 1 julio, 2005.
<http://hdl.handle.net/10261/39985>