

## “Perfiles de sensibilización molecular a polen de amarantáceas”.

Prof. Mayte Villalba Díaz.

*Catedrática del Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Vicedecana de Investigación y Relaciones internacionales. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.*

### Introducción

Los pólenes son una de las principales fuentes de aeroalérgenos desencadenante de hipersensibilidad tipo I, alcanzando valores de hasta el 30% entre la población de los países industrializados ([www.eaaci.org](http://www.eaaci.org)). Con la excepción de ciertos pólenes entomófilos como el de algunas Oleáceas, como el aligustre, o el de frutales como el de melocotón, la sensibilización polínica está fundamentalmente restringida a plantas anemófilas, árboles, gramíneas y malezas, con pólenes de pequeño tamaño [1]. Entre esas plantas, se encuentran la mayoría de los miembros de las Amarantáceas que son plantas herbáceas y arbustivas anuales, perennes y de una elevada resistencia a agresiones ambientales, cuyo crecimiento se adapta perfectamente a los suelos salados y a los ambientes áridos, de los cuales extraen altas concentraciones de nitrógeno [2]. A esta adaptación ha contribuido enormemente el cambio climático, que está afectando no solo a la intensidad y duración de la polinización de determinadas plantas sino a la aparición de especies y subespecies nuevas de géneros que eran de localización exclusiva en países semidesérticos, y que han aparecido y están invadiendo determinadas áreas de nuestro hábitat [3]. En general, las malezas son plantas con una alta capacidad de adaptación al medio, especialmente en regiones donde la vegetación autóctona ha sido dañada por la sequía, y son muy resistentes ante cualquier condición climática adversa. Esta alta estabilidad las convierte en fuentes importantes de pólenes que causan alergia en un número cada vez mayor de personas. Los miembros de la familia Amarantácea son muy numerosos pero todos ellos comparten una morfología en sus granos de polen casi indistinguible mediante técnicas de microscopía estándar: los granos son esféricos con una disposición de abertura pantoporada que es similar a la superficie de una “pelota de golf”. El número de granos de polen de estas especies tiende a ser incluso menor que en otras especies anemófilas [4], pero no así su capacidad de desencadenar una respuesta alérgica, lo que refleja la optimización de los recursos por las plantas xerófitas en entornos adversos. En un intento de contrarrestar esta baja producción de polen, las especies Amarantáceas tienen un periodo muy extenso

de floración entre los meses de junio a octubre, una vez que el principal período de polinización de la mayoría de las especies de latitudes templadas ha terminado.

Por tanto, aspectos a considerar y que pueden dificultar el diagnóstico de los pacientes polínicos son modificaciones de la flora de nuestras regiones en respuesta a cambios ambientales van acompañadas de la presencia de partículas ambientales [5] como consecuencia de la contaminación ambiental y el contenido de ozono, así como el humo de tabaco, el ejercicio, etc. y ayudan a aumentar de forma considerable la alergia respiratoria y el asma [6]. La concepción de los granos de polen como meros transportadores pasivos de alérgenos ha sufrido un cambio de paradigma y el ser considerados como vehículos de componentes inmunomoduladores, proteasas, oxidorreductasas y metabolitos como la adenosina [7], que facilitan el acceso de los alérgenos al organismo del paciente alterando de manera significativa su sistema inmune, ha permitido empezar a hablar de especies polínicas más o menos alergénicas, precisamente por su contenido en sustancias que no son alérgenos. Otro factor a considerar en relación con el conteo de granos de polen y su capacidad para producir alergia, es tener en cuenta que la carga de alérgenos en el aire es atribuible no sólo a los granos de polen, sino también a los alérgenos presentes en las partículas biológicas submicrónicas y paucimicrónicas y polensomas [8]. Además, dificultades adicionales a la hora de realizar un correcto diagnóstico del paciente son el solapamiento de la polinización de varios pólenes, incluso del mismo género, las distancias que estos pueden recorrer antes de acceder al organismo, su fácil ruptura por inclemencias del tiempo o por su fragilidad intrínseca, liberando de esta manera sus alérgenos. En los últimos años, varios proyectos han abordado la dinámica de estas partículas no polínicas transportadas por el aire y en general, la comparación de los registros de polen con los análisis de alérgenos aerotransportados mediante ELISA sugiere que, si bien la carga alérgica exterior se debe principalmente al polen, la cuantificación de los alérgenos aerotransportados podría mejorar la evaluación de la exposición de los pacientes [9].

La climatología y la flora específica a la que están expuestos los pacientes alérgicos a pólenes de la zona de Zaragoza, hace que presenten una alta prevalencia a Amarantáceas, fundamentalmente a *Salsola kali*. Pero en general, los pacientes sensibilizados a esta maleza, son pacientes polisensibilizados a otros pólenes, frecuentes también en esta población [10]. En ese sentido, los pólenes incluidos en el estudio han sido aquellos frente a lo que presentan una mayor prevalencia los pacientes incluidos en el estudio, por un lado, otro miembro de Amarantáceas, *Chenopodium album*, un miembro de las Poáceas, *Lolium perenne*, una Oleácea, *Olea europaea*, y por último una platanácea como el plátano de sombra, *Platanus acerifolia* (Figura 1).

El utilizar como alternativa a los extractos polínicos los cuales contienen muchas sustancias no alergénicas los alérgenos purificados, ha simplificado y mejorado el diagnóstico y tratamiento de los pacientes. Este proyecto de investigación que se ha iniciado en colaboración con los Dres. Carlos Colás y Ana Agulló del Servicio de Alergología del Hospital Universitario Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, ha surgido como continuación de estudios previos que se iniciaron 8 años atrás y en los que se identificaron la mayor parte de alérgenos de este polen en un grupo de 29 pacientes seleccionados como monosensibilizados al polen de *S. kali*. Sin embargo, para este estudio se han seleccio-

nado 50 pacientes con elevados niveles de IgE específica a Sal k 1, alérgeno principal de *Salsola kali*, con independencia de sus otras sensibilizaciones a diferentes pólenes, frecuentes en esta zona geográfica.

Los objetivos de este análisis han sido estudiar los perfiles de sensibilización molecular y clínico de estos pacientes frente a los alérgenos de *Salsola kali* y realizar en paralelo un estudio de los perfiles alérgénicos moleculares de otros pólenes frente a los que estos pacientes están sensibilizados. Las especies de gramíneas como el Lolium, Phleum y Cynodon, árboles como las Oleáceas, y Platanáceas y malezas como Salsola o quenopodio, son importantes fuentes de alérgenos. Dentro de cada orden botánico e incluso considerando géneros distintos, los pólenes poseen alérgenos con una alta similitud estructural lo que da cuenta de una extensa reactividad cruzada entre sus alérgenos. Así, la determinación de los perfiles alérgénicos de los pacientes mediante este estudio molecular y clínico pueden permitirnos analizar si la sensibilización a Amarantáceas va acompañada de una co-sensibilización a otros pólenes frecuentes en las sensibilizaciones de la zona, si puede dar pie a futuras sensibilizaciones a través de fenómenos de reactividad cruzada, cuáles son las especies y los alérgenos predominantes en la época del año.

Los extractos de pólenes en este proyecto son : Amaranthaceae, Oleaceae, Poaceae y Platanaceae



Figura 1. Pólenes cuyos extractos se han manejado en este proyecto.

En ese sentido resulta esencial identificar los alérgenos específicos y marcadores genuinos de una especie polínica pero también se ha convertido en una tarea prioritaria el identificar alérgenos minoritarios que en determinadas zonas puedan convertirse en moléculas alérgénicas muy relevantes, responsables de procesos de reactividad cruzada.

Los alérgenos purificados que se usan como herramientas diagnósticas permitiendo una información detallada sobre los perfiles de sensibilización de cada paciente, pueden ser obtenidos de forma natural y recombinante, dependiendo en el caso de estos últimos de la calidad con la que se obtienen. La producción recombinante sobre todo en bacterias, levaduras, como sistemas de expresión permite disponer de alérgenos de muy alta calidad y en grandes cantidades, lo que ha permitido caracterizarlos, produciendo aquellas isoformas que pueden diagnosticar a un mayor número de pacientes [11]. Tosa esta tecnología ha

originado un inmenso avance en el diagnóstico molecular por componentes purificados en sistemas de cribado y de Microarrays de proteínas. Con estas proteínas y las técnicas inmunológicas utilizadas como el inmunoblotting y el ELISA hemos podido completar estos estudios de prevalencia a alérgenos y perfiles clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

## Alérgenos de *Salsola Kali*

La *Salsola* es, junto con *quenopodio*, los géneros de la familia *Amarantácea* con propiedades alérgicas mejor caracterizadas. *Salsola* reúne varias especies alérgicas, incluyendo *Salsola kali*, *S. pestifer*, *S. vermiculata* y *S. oppositifolia* [12].

La especie de *Salsola* cuyos alérgenos han sido mejor identificados es *S. kali* [13]. El resto de los alérgenos de otras especies se han caracterizado en la mayoría de los casos, por ensayos inmunoquímicos, y por la reactividad a las IgE de los pacientes sobre las bandas proteicas separadas en una electroforesis, determinándose su masa molecular. Al igual que con la mayoría de las malezas de esta familia, *S. kali* es una planta típica de suelos con alto contenido en sales y se encuentra principalmente en hábitats donde la lluvia es escasa. De hecho, cuando madura en verano forma esos típicos arbustos esféricos que ruedan por los caminos de las zonas muy áridas (“tumbleweeds”). En España, *S. kali* es muy común en Andalucía, Murcia, Levante y Aragón, siendo Zaragoza el área con la segunda tasa de sensibilización más alta [14]. En algunas zonas del sureste y centro de España, la sensibilización a *S. kali* es casi tan frecuente como la sensibilización al olivo y a gramíneas.

Se ha detectado un alto grado de reactividad cruzada entre el polen de *S. kali* y los de otras especies de *Amarantáceas* e incluso de familias no relacionadas. Curiosamente, aunque en contraste con los pacientes alérgicos a *C. album*, mayoritariamente polisensibilizados, la monosensibilización a *S. kali* ha sido bastante frecuente, en la actualidad es difícil localizar pacientes con esas características inmunológicas.

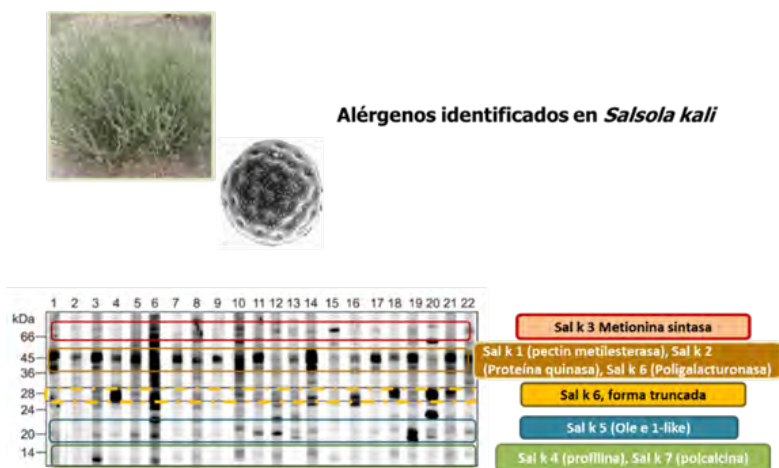


Figura 2. Immunoblotting de sueros individuales e identificación de los alérgenos ya identificados

Los alérgenos presentes en el polen de *S. kali* han sido exhaustivamente estudiados en los últimos años. A partir del complejo alergograma del extracto proteico de este polen, se han identificado y caracterizado siete de sus alérgenos (Figura 2) y cinco de ellos se han producido como proteínas recombinantes en bacteria (*Escherichia coli*) y levadura (*Pichia pastoris*).

**Sal k 1**, el primer alérgeno identificado en este polen, es una proteína polimórfica (Figura 3), con una masa molecular de alrededor de 37 kDa de la que se han identificado más de 20 isoformas que difieren en su composición de aminoácidos y en su componente glicosídico, con pls que van desde 4 a 9,5. Sal k 1 es una pectín metilesterasa y pertenece a la familia de enzimas glicosil hidrolasas. Es considerado un alérgeno principal, ya que más del 50% de los pacientes sensibilizados son alérgicos a esta enzima.

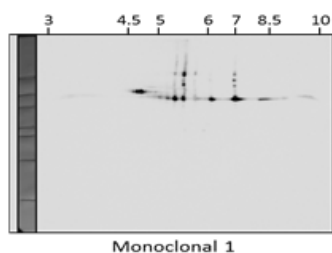


Figura 3. Isoformas de Sal k 1 identificadas por Western blot con un suero policlonal específico

Sal k 1 es responsable de aproximadamente el 80% de los casos de sensibilización a *S. kali*. De hecho, Sal k 1 se ha propuesto como marcador de sensibilización a *S. kali*, ya que su presencia es la principal diferencia entre las sensibilizaciones a *S. kali* y *C. album*. Su producción recombinante en la levadura *P. pastoris* demostró la escasa contribución del carbohidrato en la alergenicidad. El hecho de su alto polimorfismo (Figura 3) hizo que se seleccionara cuidadosamente aquella isoforma [11] con una mayor relevancia para su uso diagnóstico, ya que una única forma molecular es capaz de aglutinar la capacidad inmunológica de las isoformas más representativas de la proteína natural aislada del polen.

La identificación de **Sal k 2** en 2002 como una posible proteína quinasa debido a su centro catalítico conservado es uno de los escasos datos que se tienen de este alérgeno junto con su masa molecular de aproximadamente 36 kDa. **Sal k 3** fue identificado por primera vez en 2011 por Assarehzadegan y col [15] La banda de 45 kDa no corresponde a un alérgeno intacto, sino que se identificó como un fragmento de una metionina sintasa independiente de la coenzima cobalamina de aproximadamente 85 kDa. Sal k 3 recombinante ha sido caracterizada mediante IgE-inmunodetección, ELISA inhibición, y pruebas cutáneas (SPT).

**Sal k 4** es la profilina del polen de *S. kali*. De esta proteína polimórfica se han producido en forma recombinante en *E. coli* tres isoformas, una por Assarehzadegan y col y otras dos por Mas y col [16], una de ellas hipoalergénica. Gracias a esta observación y a la disponibilidad de su estructura tridimensional y su diferente capacidad de unión a IgE, se ha podido realizar un detallado estudio sobre la topología de sus epítopos IgE, identificándose aquellos aminoácidos implicados en dicha pérdida de capacidad de unión a IgE.

**Sal k 5** [17] es una proteína de la familia que recibe su nombre del principal alérgeno del polen de olivo, Ole e 1-like. Los sueros de pacientes alérgicos a *S. kali* o *C. album* reconocen tanto este alérgeno como su homólogo en el polen de *C. album*, Che a 1, es decir poseen reactividad cruzada. Sin embargo, ésta fue prácticamente nula con Ole e 1, el alérgeno del polen de olivo, lo que vuelve a apoyar el hecho de que la reactividad cruzada de esta y otras familias de alérgenos está restringida a los miembros pertenecientes a la familia botánica y que vie-

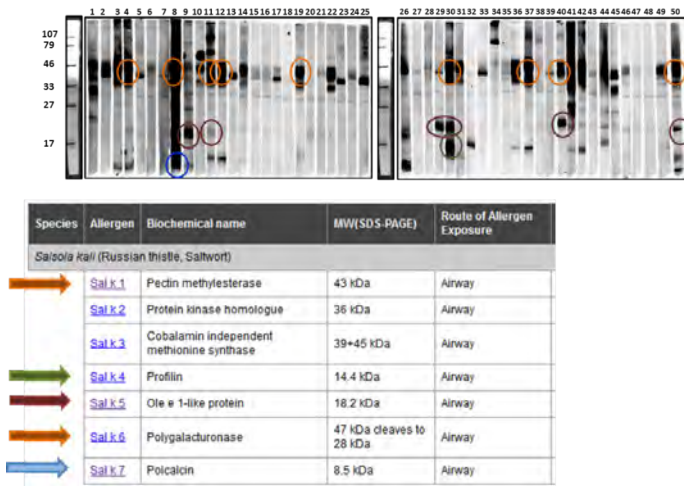


Figura 4. Immunoblotting con sueros de los pacientes del estudio con el extracto de *Salsola kali*. Se han señalado con círculos y flechas coloreados los alérgenos que se han identificado en esos pacientes mediante ELISA

ne corroborado por la identidad de su secuencia de aminoácidos del 68% y 32% con Che a 1 y Ole e 1, respectivamente. La proteína recombinante obtenida en *E. coli* exhibía propiedades físicas, químicas e inmunológicas equivalentes a las de la proteína natural. Este alérgeno es una glicoproteína con 151 aminoácidos de longitud y una masa molecular de aproximadamente 17 kDa. Presenta un cierto polimorfismo con varias isoformas detectadas.

La frecuencia de sensibilización a Sal k 5 se situó entre el 30% y el 40%, en dos poblaciones de pacientes sensibilizados a *S. kali*, en Zaragoza y en la costa este de España.

#### Perfil de *Salsola kali* en los pacientes del estudio.

En la Figura 4 se observa:

- Una alta prevalencia de Sal k 1
- Una baja prevalencia de panalérgenos, profilina y policalcina
- Una baja prevalencia en Sal k 5, marcador de Amarantáceas
- Una baja prevalencia de Sal k 6
- Alérgenos de alta masa molecular no identificados todavía

El alérgeno **Sal k 6** fue identificado como una banda de 28 kDa reconocida por un número considerable de sueros de pacientes alérgicos a *S. kali* dentro del primer estudio realizado en Zaragoza, aproximadamente el 35%. Mediante técnicas proteómicas se realizó la huella peptídica que presentó homología con las enzimas poligalacturonasas [18]. Estas y otras enzimas alergénicas, tienen una función esencial en la plasticidad de la pared vegetal durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico. La secuencia de cDNA que codificaba esta proteína dio como resultado una proteína con masa molecular de 40.064 Da y un pI de 6.7. Es interesante resaltar que los anticuerpos policlonales obtenidos frente a esta enzima reconocen proteínas homólogas en Poáceas y Platanáceas, donde se han descrito estas enzimas como alérgenos, pero también y de forma más interesante para este estudio, en otras no descritas como Amarantáceas, Oleáceas y Betuláceas. Porqué no es fácil identificar aquellos pacientes sensibilizados frente a este alérgeno, está motivado por el solapamiento de su masa molecular con la del alérgeno principal Sal k 1. La prevalencia de Sal k 6 en las tres poblaciones analizadas (Zaragoza, Murcia y Alicante) fue de 39% en las dos primeras y 18% en la última, valores que se correlacionan bien con los niveles relativos de granos de polen de Amarantáceas en las tres poblaciones. Sal k 6 comparte epítomos IgE con el alérgeno Ole e 14 de olivo (*Olea europaea*) una inhibición del 65%. No se ha detectado inhibición con extractos derivados de alimentos vegetales.

## Alérgenos de *Chenopodium Album*

La familia Amarantácea incluye entre sus especies además de *Salsola kali*, el cenizo blanco o quenopodio (*Chenopodium album*), cuyos alérgenos han sido bien caracterizados y cuya relevancia alérgica es relativamente escasa. Esta planta perenne que se puede encontrar en todo tipo de suelos, tiene sin embargo una alta predilección por los áridos y ricos en sal [19]. La polinización del cenizo suele darse como ocurre con la *Salsola* durante los meses de junio a octubre.

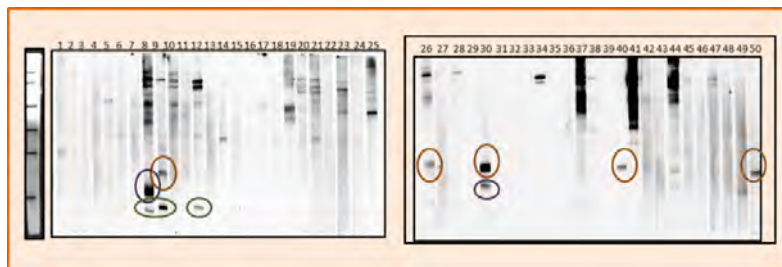
Las zonas geográficas con incidencia clínica en España son la costa este española y la meseta central, y en el resto del mundo, Estados Unidos de América, Irán, Kuwait y Arabia Saudita [20]. En la población alérgica con rinitis alérgica o asma en países desérticos, como Kuwait o Irán, este polen es el principal agente sensibilizante, con índices de prevalencia mayores que los de ácaros o mohos debido al uso de esta planta en programas ecológicos y/o etnoagrícolas.

Los pacientes sensibilizados a este polen son frecuentemente polisensibilizados y en muchos de los casos sus síntomas se originan por reactividad cruzada con otros pólenes relacionados o no relacionados filogenéticamente [21] a través de los 3 principales alérgenos que se han descrito hasta la fecha, Che a 1 (Ole e 1-like), Che a 2 (profilina) y Che a 3 (polcalcina), estos últimos dos de los panalérgenos más relevantes [22]. Los tres se han expresado en forma recombinante en la levadura *Pichia pastoris* o en la bacteria *Escherichia coli* y se han utilizado como herramientas diagnósticas en CRD (“Component-resolved diagnosis”).

**Che a 1** es un alérgeno principal atendiendo al criterio de ser responsable de la sensibilización en más de un 50% de los pacientes sensibilizados a este polen. Este miembro de la familia Ole e 1-like se identifica mediante inmunodetección tras el PAGE-SDS como una banda de aproximadamente 20 kDa con las IgEs de los pacientes alérgicos a *C. album*. Che a 1 es una glicoproteína de 143 aminoácidos de marcado carácter ácido, característica común a muchos alérgenos [23]. El oligosacárido que forma parte de su estructura no tiene ninguna relevancia desde el punto de vista alérgico a diferencia de lo que sucede con Ole e 1. Su secuencia de aminoácidos comparada con la de otros miembros de la misma familia proteica ya descritos, presenta una identidad de secuencia muy bajo con las secuencias de estas proteínas y un 68% con Sal k 5, explicando así la reactividad cruzada entre ambas moléculas. Esto hace que los mismos pacientes que son positivos a Sal k 5 tengan también IgEs dirigidas frente a este alérgeno (Figura 5). Sorprendentemente, aunque cuantitativamente no se trataba de un alérgeno relevante puesto que los niveles de IgE dirigidas a este alérgeno no es muy alto, la prevalencia de este alérgeno es alta. La proteína está producida en forma recombinante en levadura *Pichia pastoris* [24].

**Che a 2** es un panalérgeno de 14 kDa reconocido por el 55% de los sueros [25]. Es un alérgeno minoritario desde el punto de vista clínico en la mayoría de pólenes. La relevancia de la profilina está asociada con la polisensibilización de los pacientes sensibilizados a este polen y fue estudiada en 2004, con 104 sueros de individuos alérgicos a *C. album*. La frecuencia de reconocimiento de este alérgeno es de apenas un 20%. La comparación de la similitud de la secuencia de aminoácidos de esta proteína con las de otros

miembros de la familia de profilinas vegetales mostró una mayor identidad de secuencia con Hev b 8 (la profilina del látex) y con las profilinas alimentarias derivadas de plantas (Mal d 4 de manzana o Ara h 5 de cacahuete) que con profilinas de polen (Ole e 2 de olivo, Bet v 2 de abedul y Phl p 12 de gramíneas).



Species	Allergen	Biochemical name	MW(SDS-PAGE)	Route of Allergen Exposure
<i>Chenopodium album</i> (Lamb's quarters, white goosefoot)				
→	Che a 1	Ole e 1 homologue	17 kDa	Airway
→	Che a 2	Profilin	14 kDa	Airway
→	Che a 3	Polcalcín	10 kDa	Airway

Figura 5. Immunoblotting con sueros de los pacientes del estudio con el extracto de *Chenopodium album*. Los círculos coloreados corresponden a los alérgenos identificados mediante ELISA.

#### Perfil de *Chenopodium album* en los pacientes del estudio.

En la Figura 5 se observa:

- La contribución de *C. album* en las sensibilizaciones de estos pacientes es baja.
- Cinco de los pacientes que reconocen a Sal k 5 reconocen a Che a 1.
- Poco reconocimiento a los panalérgenos, profilina y polcalcina

Los niveles de inhibición fueron superiores al 80% con alérgenos de polen y látex y se obtuvieron valores entre el 10 y el 95% con extractos de alimentos vegetales.

Che a 3 es la polcalcina, proteína de unión de calcio en dos sitios EF-hand, que presenta una reactividad del 46% [26]. Tiene una masa molecular de 9,5 kDa y un pI de 4,43 y una identidad de secuencia del 90% con Bet v 4 (polcalcina de abedul) y 89% con Ole e 3 y Aln g 4, polcalcinas de olivo y polen de aliso, respectivamente.

## Alérgenos de *Olea Europaea*

Los alérgenos del polen de olivo son moléculas de baja masa molecular con tamaños de entre 5 kDa como el **Ole e 6** de olivo con apenas 50 aminoácidos hasta 45 kDa (la  $\beta$ -1,3-glucanasa **Ole e 9**); se trata de proteínas muy hidrofílicas, muy polimórficas es decir con un gran número de isoformas como Ole e 9 o la pectin metilesterasa, **Ole e 11**, y muchas con modificaciones postraduccionales como glicosilaciones (**Ole e 1**, **Ole e 9** y **Ole e 11**) o puentes



disulfuros que incrementan su estabilidad in vivo. La mayoría de ellos son proteínas ácidas, con la excepción de LTP (**Ole e 7**) [27]. La mayoría de ellos están localizados en la membrana externa del polen, la exina y se extraen fácilmente, muchos de ellos son específicos del polen (**Ole e 1**, **Ole e 3** y **Ole e 9**) y están implicados en los dramáticos cambios que experimenta el polen durante el crecimiento del tubo polínico y la germinación. Así varios alérgenos son enzimas o proteínas implicadas en dichos procesos [28], remodelado de la pared (glucanasas, pectín metilesterasas y la poligalacturonasa **Ole e 14**), cambios en el citoesqueleto (profilina, **Ole e 2**), sensores de calcio (polcalcina, **Ole e 3**), señalización (la LTP Ole e 7 y Ole e 1-like), mantenimiento del entorno redox (superóxido dismutasa, Ole e 5, o isoflavona reductasa, **Ole e 12**) y defensa (Ole e 7). Hay proteínas que establecen interacciones con ligandos tales como actina, iones de calcio, lípidos y flavonoides, muchos de ellos con un papel regulador. Están involucrados en procesos de defensa de plantas, remodelación celular durante la germinación, señalización celular y respuestas al estrés. En la actualidad, se han identificado catorce proteínas alérgicas (Ole e 1 a **Ole e 15**, la ciclofilina, con la excepción de **Ole e 13**) con incidencia clínica variada en el olivo. Ole e 4 es en realidad un fragmento derivado de Ole e 9. Producida como formas recombinantes en bacterias, levaduras, células de insectos, Arabidopsis.

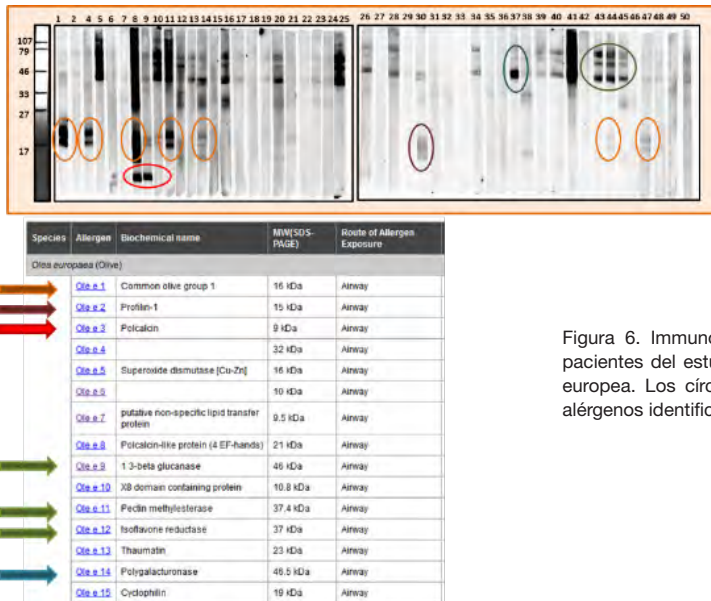


Figura 6. Immunoblotting con sueros de los pacientes del estudio con el extracto de *Olea europea*. Los círculos coloreados indican los alérgenos identificado en ELISA.

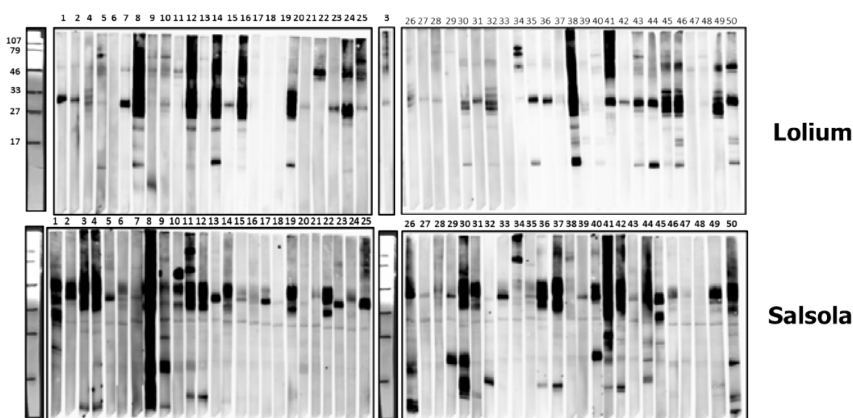
### Perfil de *Olea europaea* en los pacientes del estudio.

En la Figura 6 se observa:

- No es un perfil típico de pacientes genuinamente alérgicos a olivo
- 20% de los pacientes reconocen Ole e 1. Sensibilización genuina a olivo
- Poco reconocimiento de panalérgenos, Ole e 2 y Ole e 3
- Hay un patrón repetitivo de proteínas de alta masa molecular
- 3 pacientes reconocen la poligalacturonasa Ole e 14
- El 80% de los pacientes positivos al extracto de olivo lo son por reactividad cruzada a otros pólenes
- No hay pacientes que reconozcan a la nsLTP Ole e 7

## Alérgenos de *Lolium Perenne*

La familia botánica Poáceas incluye 12.000 especies clasificadas en 771 géneros pertenecientes a 12 sub-familias. La mayoría son anuales o bianuales, sus pólenes son anemófilos y producen grandes cantidades de polen, con un tamaño medio de 35 x 40 µm. La polinización se produce al final de la primavera o principios del verano. En Poáceas aunque las especies pueden pertenecer a distintas familias, los alérgenos descritos en ellas presentan un alto grado de reactividad cruzada. Los alérgenos mejor caracterizados pertenecen a *Lolium perenne*, *Poa pratensis* y *Phleum pratense*. Los alérgenos del Grupo 1 están presentes en todas las familias de Poáceas mientras que el grupo 5 es exclusivo de la subfamilia de *Pooideae* [29]. Debido a su abundancia y potencia alérgica estos dos grupos son los más relevantes en gramíneas. Sin embargo, los panalérgenos profilina y polcalcina son responsables del 10 al 15% de la reactividad cruzada en gramíneas, malezas y árboles.



Species	Allergen	Biochemical name	MW(SDS-PAGE)	Route of Allergen Exposure
<i>Lolium perenne</i> (Rye grass)				
	<a href="#">Lol p 1</a>	Beta-expansin	27 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 2</a>		11 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 3</a>		11 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 4</a>		57 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 5</a>		31 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 11</a>	Ole e 1-related protein	16 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 12</a>	Profilin	12 kDa	Airway
	<a href="#">Lol p 13</a>	polygalacturonase	50-55 kDa	Airway

Figura 7. Immunoblotting con sueros de los pacientes del estudio con el extracto de *Lolium perenne*.

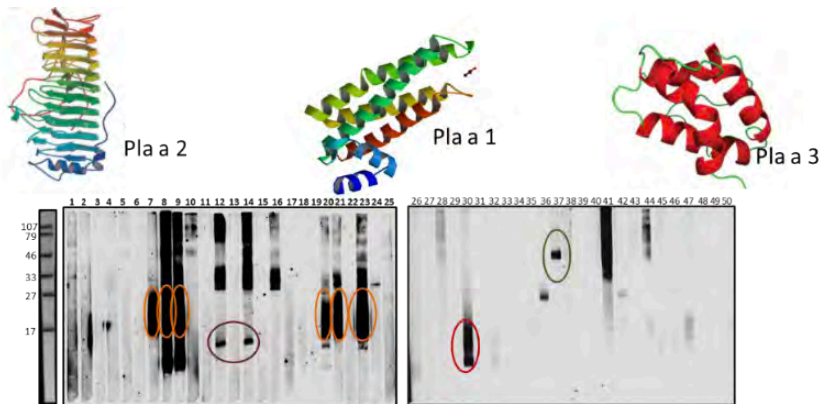
### Perfil de *Lolium perenne* en los pacientes del estudio.

En la Figura 7 se observa:

- 34 pacientes reconocen una banda de 27 kDa que corresponde a Grupo 1/Grupo 5
- 12 pacientes reconocen una banda de 11 kDa que puede corresponder a Lol p 2 y Lol p 3
- 2 pacientes reconocen a la profilina

## Alérgenos de *Platanus Acerifolia*

El polen del plátano de sombra (*Platanus acerifolia*) causa alergias respiratorias al comienzo de la primavera, desde marzo a abril en el Sur de Europa. Su prevalencia en el Nordeste de España puede alcanzar valores muy elevados de hasta el 50% [30]. El inhibidor de invertasa Pla a 1 [31], la poligalacturonasa Pla a 2 [32] y la nsLTP Pla a 3 [33]



Species	Allergen	Biochemical name	MW(SDS-PAGE)	Route of Allergen Exposure
<i>Platanus acerifolia</i> (London plane tree)				
→	Pla a 1	Putative invertase inhibitor	18 kDa	Airway
→	Pla a 2	Polygalacturonase	43 kDa	Airway
→	Pla a 3	Non-specific lipid transfer protein 1	10 kDa	Airway

Figura 8. Immunoblotting con sueros de los pacientes del estudio con el extracto de *P. acerifolia*.

### Perfil de *Platanus acerifolia* en los pacientes del estudio.

En la Figura 8 se observa:

- 25% de los pacientes reconocen al extracto de *Platanus acerifolia*
- 6 pacientes reconocen a Pla a 1, alérgeno principal y específico
- Dos pacientes reconocen a la poligalacturonasa Pla a 2 los mismos pacientes que a Sal k 6
- Pla a 3 es reconocida por dos pacientes. ¿Reactividad cruzada con LTPs de alimentos?
- Profilina reconocida por el suero 30.

## Bibliografía

1. Piotrowska C. Pollen production in selected species of anemophilous plants. *Acta Agrobot.* 2008;61:41-52.
2. Carinanos P, Alcazar P, Galan C, Dominguez E. Environmental behavior of airborne Amaranthaceae pollen in the southern part of the Iberian Peninsula, and its role in future climate scenarios. *Sci Total Environ.* 2014;470-471:480-7.
3. Ariano R, Canonica GW, Passalacqua G. Possible role of climate changes in variations in pollen seasons and allergic sensitizations during 27 years. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 104(3):215-222
4. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodriguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy.* 2008;63:1550-8.
5. Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, Takano H, Yoshimoto T. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. *Clin Exp Allergy.* 2016 Jan;46(1):142-52.
6. Amato G, Vitale C, De Martino A, Viegi G, Lanza M, Molino A, Sanduzzi A, Vatrella A, Annesi-Maesano I, D'Amato M. Effects on asthma and respiratory allergy of Climate change and air pollution. *Multidiscip Respir Med.* 2015 Dec 22;10:39. doi: 10.1186/s40248-015-0036-x. eCollection 2015.
7. Wimmer M, Alessandrini F, Gilles S, Frank U, Oeder S, Hauser M, Ring J, Ferreira F, Ernst D, Winkler JB, Schmitt-Kopplin P, Ohnmacht C, Behrendt H, Schmidt-Weber C, Traidl-Hoffmann C, Guterath J. Pollen-derived adenosine is a necessary cofactor for ragweed allergy. *Allergy.* 2015 Aug;70(8):944-54.
8. Prado N, De Linares C, Sanz ML, Gamboa P, Villalba M, Rodríguez R, Batanero E. Pollensomes as Natural Vehicles for Pollen Allergens. *J Immunol.* 2015 Jul 15;195(2):445-9.
9. Perez-Badia R, Rapp A, Morales C, Sardinero S, Galan C, Garcia-Mozo H. Pollen spectrum and risk of pollen allergy in central Spain. *Ann Agric Environ Med.* 2010;17:139-51.
10. Vidal C, Enrique E, Gonzalo A, Moreno C, Tabar AI; Expert Clinical Participants. Diagnosis and allergen immunotherapy treatment of polysensitized patients with respiratory allergy in Spain: an Allergists' Consensus. *Clin Transl Allergy.* 2014 Nov 7;4:36.
11. Mas S, Boissy P, Monsalve RI, Cuesta-Herranz J, Díaz-Perales A, Fernández J, Colás C, Rodríguez R, Barderas R, Villalba M. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;167(2):83-93.
12. Ferrer L, Carnes J, Rojas-Hijazo B, Lopez-Matas MA, Sobrevia MT, Colas C. Assessing degree of flowering implicates multiple Chenopodiaceae/Amaranthaceae species in allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158:54-62.
13. Colas C, Lezaun A. Russian thistle pollinosis: from allergen characterization to specific immunotherapy treatment. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:4652-7.
14. Colas C, Monzon S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, Fernandez-Caldas E. Correlation between Chenopodiaceae/Amaranthaceae pollen counts and allergic symptoms in *Salsola kali* monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2005;15:254-8.
15. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Mol Biol Rep.* 2011;38:65-73.
16. Mas S, Barderas R, Colas C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. *FEBS J.* 2012;279:4338-49.
17. Castro L, Mas S, Barderas R, Colas C, Garcia-Selles J, Barber D, Rodríguez R, Villalba M. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;163:142-53.

18. Mas S, Oeo-Santos C, Cuesta-Herranz J, Díaz-Perales A, Colás C, Fernández J, Barber D, Rodríguez R, Barderas R, Villalba M A natural 28 kDa degradation product identified by proteomics of *Salsola kali* pollen extract is a relevant IgE reactive band of an integral 40 kDa polygalacturonase. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2017. Aug;1865(8):1067-1076.
19. Wurtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H, Ipsen H. Characterization of *Chenopodiales* (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. *Allergy*. 1995;50:489-97.
20. Nouri HR, Sankian M, Vahedi F, Afsharzadeh D, Rouzbeh L, Moghadam M, Varasteh A. Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis. *Mol Biol Rep*. 2012;39:3169-78.
21. Villalba M, Barderas R, Mas S, Colás C, Batanero E, Rodríguez R. *Amaranthaceae* pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(6):371-81
22. Barderas R, Villalba M, Batanero E, Pascual CY, Rodríguez R. Role of profilin and polcalcin in chenopod pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1132-3.
23. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127:47-54.
24. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Che a 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:284-92.
25. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem*. 2004;385:731-7.
26. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1192-8.
27. Villalba M, Rodríguez R, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*. 2014 Mar 1;66(1):44-54.
28. Mollet JC, Leroux C, Dardelle F, Lehner A. Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth. *Plants (Basel)*. 2013 Mar 7;2(1):107-47.
29. Kleine-Tebbe J, Davies J. Grass pollen allergens. *Global atlas of allergy. European Academy of allergy and Clinical Immunology (EAACI)*, 2014:22-26.
30. Enrique E, Cisteró-Bahíma A, Bartolomé B, Alonso R, San Miguel-Moncín MM, Bartra J, Martínez A. *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy*. 2002 Apr;57(4):351-6.
31. Asturias JA, Ibarrola I, Bartolomé B, Ojeda I, Malet A, Martínez A. Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen. *Allergy*. 2002 Mar;57(3):221-7.
32. Ibarrola I, Arilla MC, Martínez A, Asturias JA. Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a 2) from *Platanus acerifolia* pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jun;113(6):1185-91.
33. Lauer I, Miguel-Moncín MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D, Cistero-Bahima A, Vieths S, Scheurer S. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy*. 2007 Feb;37(2):261-9.