

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA



Facultat de Medicina i Odontologia. Departament de Fisiologia

Programa de doctorado: Ciencias Aplicadas al Deporte

RELEVANCIA CLÍNICA DE LA SENSIBILIZACIÓN A
POLEN DE MORERA Y ESTUDIO DE SU REACTIVIDAD
CRUZADA CON OTROS PÓLENES.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

D. Francisco David El-Qutob López

Dirigida por:

Dr. D. Antonio Alberola Aguilar

Dra. D^a Amparo Mir Gisbert

Dr. D. Antonio Alberola Aguilar, Catedrático de Fisiología del
Departament de Fisiologia de la Universitat de València.

Dra. D^a. Amparo Mir Gisbert, Catedrática de Medicina del
Departament de Medicina de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que D. Francisco David El-Qutob López, licenciado en
Medicina y Cirugía por la Universitat de València, ha realizado
bajo su dirección la presente tesis titulada:

“RELEVANCIA CLÍNICA DE LA SENSIBILIZACIÓN A POLEN
DE MORERA Y ESTUDIO DE SU REACTIVIDAD CRUZADA
CON OTROS PÓLENES”

Para la obtención del Título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente
certificado.

Valencia, a 16 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dr. D. Antonio Alberola Aguilar.

Fdo.: Dra. D^a Amparo Mir Gisbert

Agradecimientos

Tras varios años de trabajo por fin queda concluida esta tesis doctoral. Y aunque se ha demorado en el tiempo más de lo que hubiera querido, la espera ha valido la pena. Espero que sirva para iniciar nuevas investigaciones en el campo de la Alergología. Yo al menos lo pretendo.

En primer lugar mi más sincera gratitud a Borja Bartolomé por su tiempo, dedicación y profesionalidad. Sin su colaboración no habría sido posible esta tesis. El intercambio continuo de teorías, razonamientos y propuestas ha permitido ir dando forma a esta tesis. Mi aprecio eterno. Igualmente reconocer el desempeño de Carlos Pastor que ha permitido llevar este trabajo a su nivel científico más alto.

Gracias a los catedráticos D. Antonio Alberola y Doña Amparo Mir, directores de esta tesis que con paciencia y sabiduría han reconducido este barco a buen puerto. Ha sido una larga travesía con continuas revisiones del trabajo, lo que me ha permitido mejorar como persona y como profesional. Su trabajo ha sido inconmensurable sobre todo en los últimos meses del proyecto y espero colaborar con ellos en proyectos de investigación en el futuro.

Reconocer la contribución continua y desinteresada de mis compañeros de la Unidad de Alergia del Hospital La Plana de Vila-Real, la Dra Gemma Mencia y la enfermera Doña Cristina

Peinado. Mi gratitud a los miembros de la AVAIC que con su trabajo con los captadores de polen nos permiten conocer el nivel de polen de nuestro entorno. Es de agradecer la labor de Mari Blanch y Begoña Tortajada por hacer tan bien su trabajo. A mi amigo Rober por su aportación artística.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido es para mi mujer Isabel y mis hijos David y Lucía, que han tenido que soportar las prolongadas horas de trabajo, dándome la energía necesaria en forma de amor para seguir con este proyecto.

A mis padres, Amparo y Ghaleb, por su ejemplo de lucha y trabajo, por darme la oportunidad de poder ser lo que soy; hago todo lo posible día a día para que estéis orgullosos de mi, aquí o allá donde estéis; a mi hermano Maher y su familia, a mis cuñados/as y suegros por su paciencia y ayuda a lo largo de los años. Y si me dejo a alguien a quien dar las gracias ruego me disculpe.

Es difícil expresar con palabras la satisfacción que me embarga una vez finalizado un trabajo tan largo, pero esto me sirve para seguir esforzándome en mejorar y no cejar en investigar cualquier idea interesante.

"Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas."

Dr. D. Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	16
1. La respuesta inmunitaria en la alergia respiratoria	16
2. Patología alérgica por sensibilización a pólenes	21
2.1. Rinitis alérgica	21
2.2. Conjuntivitis alérgica.....	49
2.3. Asma bronquial.....	60
3. Aeropalinología	63
3.1. Colectores de pólenes	64
3.2. Morfología del polen	71
3.3. Morfología de la planta	74
4. Alérgenos polínicos.....	77
4.1. Características generales de los alérgenos polínicos.....	77
4.2. Panalérgenos.....	83
4.3. Factores que favorecen la alergia al polen	97
4.4. Clasificación botánica y distribución geográfica de las plantas con pólenes alérgicos	98
5. Hipótesis y objetivos	124
6. Plan de trabajo	126
II. MATERIAL Y MÉTODOS	129
1. Material.....	129
1.1. Pacientes	129
1.2. Aparatos	130
1.3. Reactivos y material fungible.....	132

2. Métodos.....	138
2.1. Obtención de extracto de polen de morera y cuantificación de contenido proteico	138
2.2. Pruebas cutáneas con aeroalérgenos.....	140
2.3. Prueba de provocación conjuntival con polen de morera	143
2.4. Extracción sanguínea y obtención del suero plasmático .	144
2.5. Cuantificación de IgE específica	144
2.6. Determinación de masas moleculares de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE).....	150
2.7. Determinación de las proteínas alérgicas mediante <i>western-blotting</i>	155
2.8. Estudio mediante <i>western-blotting</i> inhibición con proteínas de polen de <i>Morus alba</i> y otras proteínas	158
2.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	159
2.10. Análisis estadístico	163
III. RESULTADOS.....	166
1. Cálculo del tamaño muestral.....	166
2. Pruebas cutáneas con extractos de aeroalérgenos	167
3. Prueba de provocación conjuntival con extracto de polen de <i>Morus alba</i>	168
4. Cuantificación de IgE específica sérica	169
5. Determinación de masas moleculares de proteínas del extracto de polen de <i>Morus alba</i>	170
6. Determinación de las proteínas alérgicas mediante <i>western-blotting</i>	171
7. Estudio mediante <i>western-blotting</i> inhibición de las proteínas alérgicas de polen de <i>Morus alba</i> y otras proteínas	172
8. Identificación de proteínas	180
9. Estudio mediante <i>western-blotting</i> inhibición con LTP	181

IV. DISCUSIÓN	185
V. CONCLUSIONES	205
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208

ABREVIATURAS

- AAAAI: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
- AINEs: Antiinflamatorios no-esteroides
- ARIA: Allergic rhinitis and its impact on Asthma
- ARN: Ácido Ribonucleico
- AVAIC: Asociación Valenciana de Alergología e Inmunología Clínica
- BSA: Bovine serum albumin
- CALT: Conjunctiva-associated lymphoid tissue
- CCD: Cross-reactive carbohydrate determinants
- CGRP: Calcitonin-gen related protein
- CPA: Célula presentadora de antígeno
- EAACI: European Association of Allergy and Clinical Immunology
- EAST: Enzyme Allergo Sorbent Test
- ECP: Eosinophil cationic protein
- FcεR: Receptor epsilon de fracción cristalizable de inmunoglobulina E
- GA²LEN: Global Allergy and Asthma European Network
- HLA: Human Leukocyte Antigen
- ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1
- IgA: Inmunoglobulina A
- IgE: Inmunoglobulina E
- IgG: Inmunoglobulina G
- IFN: Interferon

IL-:	Interleucina
ISAAC:	International Study of Asthma and Allergy in Childhood
kDa:	Kilo Dalton
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LTP:	Lipid Transfer Protein
MALDI-TOF:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MALT:	Mucosa-associated lymphoid tissue
MET:	Microscopio electrónico de transmisión
MO:	Microscopio óptico
MCP:	Membrane Cofactor Protein
MHC:	Major Histocompatibility Complex
MS/MS:	Tandem mass spectrometry
NARES:	Non-allergic rhinitis with eosinophilia
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NKA:	Neurokinin A
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Phosphate buffered saline
PGD2:	Prostaglandina D2
PLA2:	Fosfolipasa A2
PRP:	Pathogenesis-related protein
PVDF:	Difluoruro de polivinilideno
p-NPP:	p-nitrofenol fosfato

RANTES: Regulated upon activation normal T cell
expressed and presumably secreted

RAST: Radio Allergo Sorbent Test

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel
Electrophoresis

SP: Sustancia P

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TAC: Tomografía Axial Computarizada

Th: T helper

TL: Tampón de lavado.

TCR: Receptor de linfocito T

TNF: Tumoral necrosis factor

VIP: Vasoactive intestinal peptide

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. La respuesta inmunitaria en la alergia respiratoria

Los alérgenos son antígenos de naturaleza proteica o glicoproteica capaces de producir una reacción clínica mediante la producción de anticuerpos inmunoglobulina E (IgE) específicos en individuos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas. Este proceso de sensibilización puede producirse tras la exposición al alérgeno, ya sea por contacto, inhalación, ingestión o por inoculación (1). Los factores genéticos tienen un papel importante en la aparición de la enfermedad alérgica hasta tal punto que si ambos padres tienen alergia a pólenes, la probabilidad de transmitir la enfermedad a sus hijos es de alrededor del 80% (2).

La IgE puede unirse específicamente mediante su fracción variable F(ab) al antígeno proteico que ha dado lugar a su producción. Esta IgE igualmente se une por su fracción constante a receptores de superficie de mastocitos y basófilos (FcεR de alta afinidad). Cuando dos o más de estas moléculas de IgE que se encuentran en la superficie celular se unen a su

antígeno específico se produce el entrecruzamiento (*cross-linking*) de dichas moléculas. Este hecho transmite una señal al interior de la célula que finaliza con la degranulación de mastocitos y basófilos, y la liberación de mediadores como histamina, triptasa prostaglandinas y leucotrienos, entre otros (3). Para que se produzca el entrecruzamiento de dos moléculas de IgE es necesario que el antígeno tenga al menos dos sitios de unión a la IgE (epítomos) cada uno de los cuales con un tamaño mínimo de 15 aminoácidos. Por lo tanto, el alérgeno debe tener un tamaño de al menos 30 aminoácidos.

Habitualmente los alérgenos son antígenos multivalentes que poseen más de dos sitios de combinación al anticuerpo (4-6). El inicio de la respuesta alérgica se establece con la primera exposición al antígeno (fase de sensibilización) en individuos con predisposición genética (7). Las células dendríticas están situadas en el epitelio de la piel, la mucosa respiratoria y la mucosa digestiva. En dichas localizaciones actúan como células presentadoras de antígeno (CPA), captan el alérgeno, lo procesan por proteólisis y expresan los péptidos resultantes en la membrana junto a molécula de histocompatibilidad de

clase II. Entonces emigran a los ganglios linfáticos regionales. La unión del antígeno a la célula Th mediante su receptor T-cell-receptor (TCR), da lugar a la diferenciación de células CD4+ (Th0) en células Th2 en los pacientes alérgicos, ya que en los individuos sanos se produce diferenciación a células Th1 y producción de citocinas que producen inmunidad celular y anticuerpos bloqueantes tipo inmunoglobulina G (IgG) por los linfocitos B (8). La interacción de CD40 en el linfocito B con CD40L en el linfocito T está implicada en la inducción del cambio de isotipo de anticuerpos en los linfocitos B. Los linfocitos Th2 producen citocinas como las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que, entre otras acciones, estimulan la síntesis de IgE por las células plasmáticas (9). Así pues, los alérgenos proteicos deben contener igualmente epítomos T con el potencial de inducir respuestas Th2.

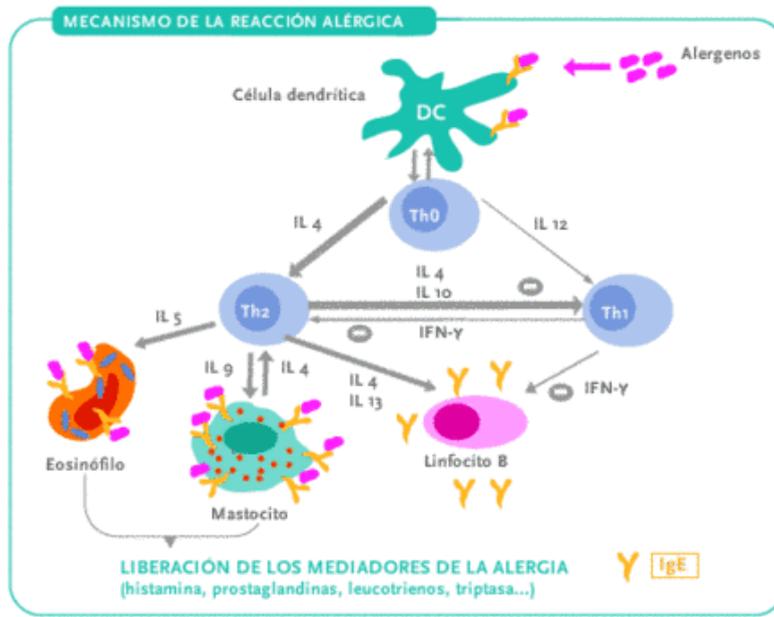


Figura 1. Mecanismo de sensibilización. Fuente: <http://www.stallergenes.es/ciencia-e-innovacion/inmunoterapia-con-alergenos/mecanismo-de-accion.html> (10)

La alergenidad de los antígenos depende de varios factores como la presencia de enlaces disulfuro, la resistencia a la proteólisis por las enzimas gástricas o su grado de glicosilación (11). En el caso de los aeroalérgenos, el tamaño y la solubilidad son factores importantes, especialmente para aquellos que acceden al organismo a través de las vías respiratorias transportados por partículas volátiles. La mayoría de aeroalérgenos son proteínas pequeñas, entre 4 y 60 kiloDalton (kDa), y solubles en soluciones acuosas (12) lo que facilita su paso a través de la barrera epitelial y

así entrar en contacto con las CPA. Entre los aeroalérgenos podemos distinguir alérgenos de interior, que originan síntomas de carácter crónico (alérgenos de ácaros, cucarachas y epitelios de animales), y alérgenos de exterior, fundamentalmente de origen vegetal, como los pólenes de gramíneas, árboles y malezas. Los hongos son alérgenos tanto de interior como de exterior. Su tamaño determina el tiempo de permanencia en el aire siendo de menor tamaño los que permanecen en suspensión por periodos de tiempo más prolongados (13). La exposición a aeroalérgenos en pacientes sensibilizados puede producir rinitis y conjuntivitis y, en muchos casos, asma. Además se ha observado que el aumento ambiental de partículas diesel por contaminación atmosférica contribuye al mantenimiento y desarrollo de enfermedades alérgicas en pacientes previamente sensibilizados a alérgenos inhalantes (14, 15). Dicha sensibilización se encuentra facilitada por daño en la mucosa aérea y la alteración del aclaramiento mucociliar (16) que produce la polución ambiental.

2. Patología alérgica por sensibilización a pólenes

2.1. Rinitis alérgica

La rinitis alérgica es una enfermedad inflamatoria mediada por la IgE de la mucosa nasal que se caracteriza por la presencia de prurito, estornudos, secreción y congestión nasal (17). Esta enfermedad es cada vez más frecuente y afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes (18). Además, tiene efectos negativos sobre el rendimiento escolar y laboral, siendo una de las principales causas de absentismo, lo que puede conllevar costes muy importantes tanto directos como indirectos (19, 20). Por otra parte, la rinitis alérgica es un factor de riesgo para el desarrollo del asma (21). De hecho, diversas evidencias epidemiológicas, fisiopatológicas y clínicas han confirmado la idea de una única vía respiratoria, como un concepto esencial en el manejo de pacientes diagnosticados de rinitis y/o asma, ya que su diagnóstico precoz y su tratamiento conjunto mejoran el control y el pronóstico de ambas entidades (22, 23).

2.1.1. Clasificación de la rinitis alérgica

Hasta el año 1999, la rinitis alérgica se clasificaba en estacional y perenne. La rinitis alérgica perenne es una afección a largo y los síntomas no tienen estacionalidad. La rinitis alérgica estacional aparece siempre durante un período determinado del año. Sin embargo, en el año 1999, un grupo de expertos, el Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Workshop Expert Panel, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), elaboraron una guía basada en la evidencia (24). En una actualización reciente de esta guía, se propone una nueva clasificación de la rinitis recogida en la tabla 1 basada en la duración de los síntomas. A su vez, la rinitis se clasifica en leve, moderada y grave, en función de la intensidad de las manifestaciones clínicas y de la repercusión sobre la calidad de vida (25).

Intermitente	Menos de 4 días a la semana	Durante menos de 4 semanas
Persistente	Más de 4 días a la semana	Y durante más de 4 semanas
Leve	No hay	<ul style="list-style-type: none"> • Trastornos del sueño • Deterioro de las actividades diarias de ocio y/o deportivas • Impedimento de la asistencia al centro de enseñanza o al puesto de trabajo • Síntomas molestos
Moderada	Hay	Alguno de los anteriores
Grave	Hay	Todos los anteriores

Tabla 1. Clasificación de la rinitis alérgica según Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Workshop Expert Panel.

Un grupo de investigadores demostró que los términos intermitente y persistente no son sinónimos de estacional y perenne de la clasificación clásica de la rinitis alérgica. Vieron que la mayor parte de los pacientes tienen rinitis grave y/o persistente, y en estos casos hay que evaluar la presencia de asma (26).

2.1.2. Epidemiología

Aunque la rinitis alérgica puede iniciarse a cualquier edad suele aparecer en adolescentes, observándose un descenso de su presencia en la edad avanzada. Existe una variación considerable en la prevalencia de rinitis en los países de diferentes partes del mundo, como se ha observado en el Estudio Internacional de Asma y Alergia en la Infancia (ISAAC). Se ha estimado una prevalencia media entre el 15-20% de la población estudiada, con cifras mucho más altas en algunos países en los que cerca del 40% de los niños presentan sintomatología compatible con rinitis alérgica (27, 28). Bauchau y Durham publicaron en el año 2004 (29) los resultados de un estudio multicéntrico que tenía como objetivo determinar la prevalencia de la rinitis alérgica entre los adultos europeos en el que participaron Bélgica, Francia, Alemania, Italia, el Reino Unido y España. Las cifras de prevalencia obtenidas arrojaron un promedio del 23%. Con respecto a la prevalencia en España, el estudio Alergológica demostró que la sintomatología nasal fue el motivo de consulta del 57,4% de los pacientes atendidos en los servicios de alergia (30). Según datos del estudio ISAAC, la prevalencia de rinitis alérgica en España es del 22% siendo el 57% de ellas de origen polínico (31).

2.1.3. Etiopatogenia y fisiopatología

Aunque la predisposición genética y la exposición a alérgenos son requisitos esenciales para el desarrollo de la rinitis alérgica, los datos epidemiológicos indican que puede haber factores de riesgo de rinitis alérgica en los primeros años de vida del paciente como son el aumento de la polución ambiental y el descenso de infecciones virales y bacterianas (32).

Las fosas nasales son un sistema de conducción aérea, siendo sus principales funciones el calentamiento y la humidificación del aire que transcurre por ellas. Pero también poseen otras funciones como son: el filtrado de partículas inhaladas (irritantes, agentes infecciosos, alérgenos) del aire inspirado, la expulsión de partículas retenidas mediante la función mucociliar, y la disolución de los gases solubles en la mucosa (33). Por último, la vía aérea superior cumple un papel importante en la función olfativa. Todas estas funciones están alteradas en la rinitis cuando el paciente se ve obligado a respirar por la boca por insuficiencia respiratoria nasal.

A excepción del vestíbulo nasal y de la región olfatoria, las fosas nasales y los senos paranasales están recubiertos por epitelio de tipo respiratorio, es decir epitelio cilíndrico, pseudoestratificado, constituido por

células ciliadas y células caliciformes cuya membrana basal, descansa en un corion de tejido conectivo rico en fibras elásticas, tejido linfoide, glándulas mucosas, serosas, vasos sanguíneos (capilares y plexos venosos) y en terminaciones nerviosas. Este delicado epitelio está protegido por una capa de moco que previene su desecación e interviene en el acondicionamiento del aire (34).

La rinitis alérgica se define clínicamente como un trastorno nasal sintomático debido a una inflamación mediada por IgE tras la exposición a un alérgeno. El alérgeno es presentado por las células dendríticas, que actúan como células presentadoras de antígeno, al linfocito T CD4⁺ Th0 o *naive* que, en presencia de IL-4, se diferencia a Th2, el cual induce la síntesis de IgE específica por los linfocitos B mediante la producción de IL-4 e IL-13 (35).

En la fase inicial, las células dendríticas captan el alérgeno en la mucosa, lo procesan y expresan péptidos antigénicos en la membrana junto con moléculas de histocompatibilidad de clase II. A continuación las células dendríticas migran al ganglio regional y allí el complejo péptido antigénico-molécula *Human Leukocyte Antigen* (HLA) es reconocido por células T CD4⁺ *naive* específicas que expresan el

receptor TCR específico del péptido. La unión del TCR con el complejo péptido-molécula HLA activa a la célula T CD4⁺ que prolifera y se diferencia convirtiéndose en linfocitos T CD4⁺ específicos efectores llamadas también células sensibilizadas, que salen del ganglio y vuelven a la circulación, y de ahí a la mucosa de la vía aérea. Estos linfocitos T CD4⁺ en presencia de IL-4 se diferenciarán a linfocitos Th2. El linfocito Th2 a su vez libera IL-4 que va a inducir la síntesis de IgE específica en el linfocito B. Entre el linfocito T CD4⁺ y el linfocito B se producen dos señales activadoras; por un lado la unión del receptor de superficie CD40 del linfocito B y su ligando en el linfocito T CD40L, y por otro lado, la unión CD80/86 del linfocito B con el receptor CD28 en el linfocito T (36). Esto produce un cambio de clase en la producción de inmunoglobulinas en el linfocito B favoreciendo la síntesis de IgE. La IgE específica sintetizada puede circular libremente en la sangre o unirse a la superficie de los mastocitos mediante el receptor FcεRI, de alta afinidad. En una segunda exposición al antígeno, este se une a la IgE en la superficie del mastocito, provocando la liberación de sus mediadores químicos que producen la sintomatología clínica y atraen a las células

inflamatorias al foco que amplían y mantienen la inflamación.

Estudios mediante biopsia nasal han revelado uno de los datos característicos de la rinitis alérgica como es la infiltración por eosinófilos y la activación de los mastocitos. El reclutamiento tisular de eosinófilos es reflejo de la secreción local de citocinas Th2, fundamentalmente derivadas de linfocitos T activados y mastocitos y de la consecuente activación de las células endoteliales con un aumento selectivo de la expresión de las moléculas de adhesión. Esta liberación de citocinas da lugar también a la activación de las células epiteliales. El epitelio puede generar gran cantidad de moléculas incluyendo una variedad de quimiocinas, que están involucradas en la atracción y la activación de las células de la mucosa nasal.

Los mediadores liberados por las células activadas, como mastocitos, basófilos y eosinófilos, son los responsables de las manifestaciones clínicas de la rinitis por sus acciones sobre los nervios sensitivos, los componentes glandulares y las estructuras vasculares nasales (37). En la mucosa nasal se observa una infiltración del epitelio por mastocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos T. Los eosinófilos pasan a la luz y pueden detectarse en el moco y en el lavado nasal

(38). Los basófilos también pueden pasar a las secreciones. En la submucosa se acumulan eosinófilos, neutrófilos, basófilos y linfocitos. En biopsias nasales de pacientes con rinitis alérgica estacional se ha observado un aumento de 25 veces la cantidad de gránulos de eosinófilos en el espacio extracelular por lisis de estas células (39). Existe hiperplasia de las glándulas seromucosas y edema del tejido intersticial. Los mastocitos son las células más importantes en la patogenia de la rinitis alérgica ya que, además de ser las principales células efectoras, mantienen la inflamación, inducen la síntesis de IgE y su participación parece ser también muy importante en la fase de sensibilización, ya que proporcionan la IL-4 necesaria para que los linfocitos CD4⁺ Th0 se diferencien en CD4⁺ Th2 y para que en los linfocitos B, productores de inmunoglobulinas se produzca el cambio al isotipo IgE. El citoplasma de los mastocitos contiene gránulos con mediadores preformados, como la histamina, las proteasas triptasa y quimasa, citocinas como IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y heparina; también sintetizan, a partir de los fosfolípidos de la membrana, leucotrienos y prostaglandinas, principalmente la prostaglandina D2 (PGD2). Los mastocitos son células constitutivas de la

mucosa nasal normal, pero normalmente no se encuentran en las capas más superficiales del epitelio de las vías respiratorias. La tinción inmunohistoquímica de biopsias nasales con anticuerpos monoclonales anti-triptasa muestra un aumento de los mastocitos en el epitelio de las vías respiratorias, tanto en la rinitis alérgica estacional como persistente en comparación con los hallazgos de la biopsia en sujetos no atópicos sin rinitis. La migración de los mastocitos y otras células inflamatorias al epitelio tras la exposición al alérgeno durante la estación polínica es considerada la base patogénica del “cebado” (*priming*) de la mucosa (40). El efecto “cebado” explica como las provocaciones repetidas con el alérgeno preparan la mucosa para responder cada vez con menos concentración de polen. El “cebado” también favorece la respuesta a estímulos inespecíficos. Se han observado correlación entre la severidad de la rinitis alérgica determinada mediante puntuación de síntomas y de medicación, y la liberación de histamina por basófilos, la eosinofilia, el nivel de proteína catiónica del eosinófilo (*eosinophil cationic protein-ECP*) y la proteína eosinófila X (41). La inervación de la mucosa nasal juega un importante papel modulador en la patogenia de la rinitis alérgica. En los individuos con

rinitis alérgica se observa un aumento de la expresión de neuropéptidos en la mucosa y en el lavado nasal tras la exposición natural al alérgeno y tras la prueba de provocación nasal. Las terminaciones nerviosas sensitivas, simpáticas y parasimpáticas, de la mucosa nasal pueden estimularse por la histamina, serotonina, bradicinina, triptasa, etc., provocando la liberación de sustancia P (SP), del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin-gen-related peptide-CGRP*) y de la neuroquinina A (NKA). La sustancia P produce aumento de la secreción glandular y del aclaramiento mucociliar, vasodilatación con extravasación de plasma e induce la degranulación de los mastocitos (42). Además, por reflejo axónico, se estimula el sistema parasimpático y la liberación del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Tras la prueba de provocación nasal con histamina, en el lavado nasal sólo aumenta el VIP. De lo que se deduce que la histamina induce un reflejo colinérgico, ya que el VIP es liberado por el sistema parasimpático (43).

2.1.4. Clínica

Los síntomas fundamentales de la rinitis alérgica son prurito nasal, estornudos, rinorrea y obstrucción, aunque los pacientes pueden presentar sólo algunas de estas manifestaciones. Con frecuencia, a los síntomas clásicos de la rinitis se asocian otros como prurito ocular y lagrimeo, prurito ótico y faríngeo. Los estornudos, la obstrucción y la destilación nasal debidos a la rinitis alérgica son más intensos durante la mañana en el 70% de los casos, aproximadamente. La rinitis alérgica estacional se caracteriza por la aparición de la sintomatología durante una parte del año que coincide con la época de polinización del alérgeno responsable. En 1819 Bostock describió por primera vez la fiebre del heno y Blackey en 1873, confirmó mediante la escarificación y pruebas de exposición que los síntomas tenían una relación causal directa con el polen (44). La rinitis estacional polínica o polinosis, es la más frecuente con un 75% de todas las rinitis alérgicas considerando globalmente a los pólenes como causa. Algunos hongos de exterior del género *Cladosporium* o *Alternaria* presentan variaciones en la producción de esporas dependiendo de las variaciones climáticas y, por tanto, en el desencadenamiento de los síntomas. En la polinosis, los síntomas suelen ser más

intensos con la realización de actividades de forma prolongada al aire libre, especialmente a primera hora de la mañana y a última de la tarde, y aumentan en los días soleados y de viento, mejorando tras la lluvia. En el caso de la alergia a los pólenes de gramíneas se ha comprobado que existe una relación directa entre las lluvias de otoño e invierno y los niveles de polen en la siguiente primavera (45). La presencia e intensidad de los síntomas se relacionan de forma directa con los niveles atmosféricos de aeroalérgenos (46, 47) o de pequeñas partículas de alérgenos derivadas de las plantas o de los propios pólenes, de manera que existen estudios que correlacionan las admisiones en urgencias con los niveles de polen en el ambiente (48, 49) así como con los de algunos hongos como *cladosporium* (50).

2.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la rinitis alérgica persistente es más difícil que el de la rinitis alérgica estacional y depende más de la detección de la condición atópica por pruebas cutáneas o medición de IgE específica en sangre periférica contra alérgenos específicos. Una rinitis puede ser causada por diversos agentes, además de los alérgenos (Tabla 2).

Infecciones: víricas, bacterianas, por otros agentes infecciosos
Alérgenos
Fármacos: AINEs, Antihipertensivos, vasoconstrictores
Hormonas
Irritantes inespecíficos: olores fuertes, humo de tabaco, cambios de temperatura
Reflujo gastroesofágico
Atrofia de mucosa nasal
Estados emocionales
Alimentos

Tabla 2. Causas de rinitis (51).

Cambios en el estado hormonal, como la pubertad y el embarazo, pueden estar asociados con obstrucción nasal. La rinorrea acuosa en hombres de edad avanzada se ha atribuido a la deficiencia de testosterona. Algunas enfermedades endocrinas, como el hipotiroidismo y la acromegalia, pueden estar asociadas con síntomas nasales. Ciertos fármacos sistémicos, sobre todo los que se utilizan en patología cardiovascular, pueden inducir obstrucción nasal debido a la alteración del tono vascular local. El uso tópico de aerosoles vasoconstrictores como descongestionantes nasales para la insuficiencia

respiratoria nasal se asocia clásicamente con hiperemia de rebote, produciendo un aumento de la obstrucción nasal y empeoramiento de la rinitis con el uso continuado. Los pacientes con rinitis en los que no se detecta sensibilización alérgica, y en los que han sido excluidas otras causas de rinitis y otras enfermedades que pueden manifestarse con síntomas nasales, se diagnostican de rinitis idiopática.

a. Los datos de la anamnesis

Toda historia clínica debe recoger una serie de datos que nos ayudarán al diagnóstico. Se valorará la edad de inicio, el entorno del paciente (domiciliario y laboral), y la presencia de mascotas y hábitos sociales (tabaco, alcohol y drogas). Hay que definir el inicio y duración de los síntomas, recalcando su relación con determinados factores externos así como el ritmo circadiano y reflejar en la historia clínica los síntomas actuales y el predominio estacional de los mismos. Se debe recoger la presencia de otras enfermedades atópicas tanto personales como familiares y registrar los tratamientos seguidos por el paciente y la respuesta obtenida. Se intentará identificar los factores de exacerbación de la enfermedad y el influjo de los irritantes inespecíficos

como humo del tabaco, aire frío, cambios bruscos de temperatura y vapores químicos.

b. Exploración física

La exploración física debe comenzar por la inspección nasofacial, es decir, de la cara y la parte externa de la nariz. Con frecuencia se observa un oscurecimiento periorbitario por edema de estos tejidos así como un doble pliegue en el párpado inferior (signo de Dennie-Morgan) característico de individuos atópicos. Cuando la obstrucción nasal es intensa, se puede observar que el paciente respira por la boca. Debido al prurito nasal, tiende a frotarse la nariz en sentido ascendente lo que con frecuencia da lugar a un pliegue transversal persistente en el tercio inferior de la nariz. La rinoscopia anterior, realizada con un otoscopio o una lámpara frontal con espéculo nasal, permite la visualización del tercio anterior de la vía aérea nasal. La exploración nasal aporta pocos datos patognomónicos, pero debe realizarse siempre porque nos permite, en muchas ocasiones, detectar alteraciones estructurales como son la presencia de pólipos, hipertrofia de cornetes nasales, desviaciones del tabique nasal o neoplasias. En las fases asintomáticas, es decir, cuando no hay exposición al alérgeno, la mucosa tiene generalmente

un aspecto normal. Durante la polinosis suele apreciarse un edema bilateral de la mucosa con hipertrofia de los cornetes nasales inferiores que aparecen inflamados y cubiertos de secreciones acuosas.

c. Exploraciones complementarias

Puesto que el mecanismo fisiopatológico de la rinitis alérgica es una reacción de hipersensibilidad inmediata, es imprescindible para establecer el diagnóstico, poner en evidencia la presencia de IgE específica de un alérgeno, ya sea mediante técnicas *in vitro* o *in vivo*.

1. Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas son la técnica de elección para poner de manifiesto una reacción alérgica IgE mediada. Si se realizan adecuadamente, aportan evidencias que permiten confirmar el diagnóstico de una alergia específica. La prueba intraepidérmica (*prick test*) es el método de referencia por su gran sensibilidad, por la amplia variedad de alérgenos disponibles y por su bajo coste, además de su relativa sencillez técnica, comodidad para el paciente y su alta correlación con los síntomas y con las pruebas de provocación (52).

Las pruebas cutáneas son muy seguras aunque se han publicado casos de anafilaxia en pacientes durante la realización de pruebas de *prick test* (53). Este método se basa en la técnica modificada por Pepys (54) y cuenta con el aval de la European Association Academy of Allergy and Clínica Immunology (EAACI) (55) y de American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) (56) como prueba principal para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE. La interpretación adecuada de los resultados de las pruebas cutáneas requiere un conocimiento de la historia clínica, de los síntomas y de los hallazgos de la exploración física. Una prueba cutánea por sí sola indica únicamente sensibilización frente a un alérgeno. En ocasiones una sensibilización cutánea no se acompaña de síntomas relacionados, lo que se conoce como alergia latente. Cuando un resultado positivo en la prueba cutánea mediante *prick test* se correlaciona con la historia clínica, las pruebas in vitro pueden no ser necesarias. La correlación entre las pruebas cutáneas y la cuantificación de IgE específica depende de la calidad y estandarización del extracto utilizado en ambos tipos de pruebas.

Para la realización del *prick test* se coloca una gota de extracto de alérgeno sobre la superficie de la piel sana de la cara volar (la que corresponde a la palma) del antebrazo y se punciona con cuidado con una lanceta en la epidermis a través de la gota. Deben usarse controles positivos y negativos para interpretar adecuadamente los resultados de la prueba. La histamina se utiliza como control positivo mientras que la solución salina se usa como control negativo. Las pruebas que no den lugar a un edema cutáneo superior en más de 3 mm al control negativo se consideran indeterminadas, siendo positivas las de mayor tamaño. Como referencia para valorar el grado de positividad se utiliza el tamaño de la pápula y del eritema originados por la histamina (57). Existen fármacos que pueden interferir en el resultado de las pruebas cutáneas por lo que deben ser retirados con la antelación necesaria (Tabla 3).

Medicamento	Tiempo sin medicación
Antihistamínicos	5-7 días
Estabilizadores de la membrana del mastocito	No interfieren
B-adrenérgicos	6 horas
Antidepresivos: doxepina, imipraminas, fenotiazinas	10-21 días
Corticoide tópico (en la zona de la prueba)	7 días
Corticoide sistémico	No interfiere
Teofilina	72 horas

Tabla 3. Medicamentos que pueden interferir en los resultados de las pruebas cutáneas (51).

2. Prueba de provocación nasal

Las pruebas de provocación se usan en investigación y muy pocas veces en la práctica clínica. Sin embargo, son importantes para el diagnóstico de las rinitis ocupacionales. Existen diversos métodos para valorar la respuesta del paciente a la administración del alérgeno: la rinomanometría anterior activa, la rinomanometría posterior activa, la rinomanometría anterior pasiva, la rinometría acústica y la medición del pico de flujo inspiratorio nasal. Aunque ninguno de ellos es aceptado de manera unánime, la rinomanometría anterior activa es la técnica estandarizada mejor evaluada. En general, las pruebas de provocación

nasal con alérgenos están indicadas cuando existen discrepancias entre la historia clínica y el resultado de las pruebas o entre el resultado de las diferentes pruebas entre sí. Es decir, cuando existe una clara duda diagnóstica. Quizá la más justificada de sus indicaciones sea la de obtener un diagnóstico de certeza en las rinitis ocupacionales. En la práctica, existen una serie de problemas que limitan la utilidad del test de provocación nasal, entre las que cabe destacar la gran diversidad de técnicas existentes que imposibilita la comparación de los resultados, la ausencia de estandarización en los protocolos de trabajo de cada método, la existencia de una gran variabilidad intraindividual de los parámetros nasales utilizados y la necesidad de contar con personal experto para su correcta realización e interpretación. La correlación entre las pruebas de provocación nasal, las pruebas cutáneas y la cuantificación de la IgE específica son variables debido fundamentalmente a la hiperreactividad inespecífica. Bousquet *et al* detectaron una correlación estadísticamente significativa entre las pruebas de provocación nasal y las pruebas cutáneas, no encontrando dicha correlación entre las pruebas cutáneas o la prueba de provocación nasal con el nivel de IgE específica sérica (58). Generalmente, la

correlación estadística es muy buena cuando la positividad de las pruebas cutáneas y los niveles de IgE son elevados; por el contrario, suele ser baja o inexistente cuando la positividad de las pruebas cutáneas y los niveles de IgE específica son bajos, cuando se utilizan extractos no estandarizados y cuando existe discrepancia entre la historia clínica y las pruebas cutáneas, que es precisamente cuando más nos interesaría realizarla. En los pacientes con rinitis alérgica y en aquellos con sinusitis crónica no alérgica, hay aumento de la expresión de ARNm de eotaxina, una quimiocina selectiva para eosinófilos, siendo este aumento aún mayor en los pacientes con rinitis alérgica, tras una prueba de provocación nasal (59), no obstante la determinación de este parámetro no está incluida entre las de uso clínico habitual.

3. Técnicas *in vitro*

Como en cualquier otro proceso de naturaleza alérgica mediada por un mecanismo inmunológico de hipersensibilidad inmediata, las pruebas diagnósticas *in vitro* de mayor utilidad son las basadas en la determinación de la IgE específica.

3.1. IgE sérica total

En la actualidad para la cuantificación de IgE sérica total se emplean métodos automatizados en la mayoría de los laboratorios, como el UniCAP[®] de Phadia, una técnica de fluoroenzimoinmunoensayo (ELISA) tipo *sándwich* (Figura 2). El interés de la determinación de los niveles de IgE sérica total en la rinitis alérgica es escaso porque los rangos en la población normal son amplios y una IgE elevada puede ser debida a otras causas ó incluso no estar relacionada con patología alguna. Además, se conoce que un 20-30% de pacientes presentan cifras normales de IgE. La determinación de los niveles de IgE total tiene muy poca especificidad y es de escasa utilidad (51).

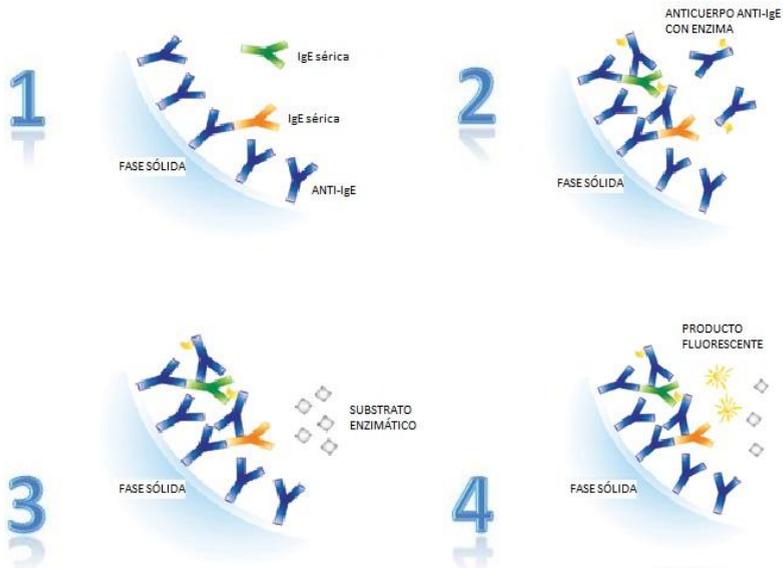


Figura 2. Medición de IgE específica mediante Sistema UniCAP. Fuente: modificado de www.phadia.com. Un anticuerpo anti-IgE, unido de forma covalente a la fase sólida, reacciona con la IgE total en la muestra de suero del paciente (Fig. 2-1). Después del lavado, otros anticuerpos anti-IgE marcados con enzima se añaden para formar una mezcla (Fig. 2-2). Después de la incubación, los anticuerpos anti-IgE no unidos marcados con enzima se eliminan y la mezcla de unión se incuba con un agente de desarrollo (Fig. 2-3). Después de detener la reacción, se mide la fluorescencia del eluido (Fig. 2-4). La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de IgE en la muestra de suero.

3.2. IgE sérica específica

El método más utilizado para la determinación de la IgE específica es el CAP System Pharmacia de Phadia, un inmunoensayo fluoroenzimático en fase sólida completamente automatizado que es una modificación

de la técnica RAST (*radioallergosorbent test*) que mejora su sensibilidad, manteniendo la especificidad (60). Presenta una buena correlación con las pruebas de provocación nasal y con el resultado de las pruebas cutáneas si se utilizan extractos alérgicos estandarizados. La determinación de la IgE sérica específica es un método complementario de las pruebas cutáneas a las que no puede sustituir salvo en aquellos casos en los que no sea posible realizarlas por ejemplo por la imposibilidad de interrumpir los antihistamínicos u otras medicaciones, o cuando su interpretación es difícil, como sucede a veces en pacientes con dermatopatías graves o con dermatografismo. Su cuantificación no es necesaria cuando el diagnóstico está claro, basándose en la anamnesis y en el resultado de las pruebas cutáneas. Puede ser también de utilidad en los pacientes polisensibilizados para indicar la composición de la inmunoterapia según los niveles de cada alérgeno. Sin embargo algunos autores ha observado que la capacidad diagnóstica de la historia clínica no difiere cuando se añaden como prueba complementaria las pruebas cutáneas o la medición de IgE específica (61).

4. Técnicas de diagnóstico por la imagen

Los métodos radiológicos utilizados actualmente para el estudio de la patología nasosinusal son la radiografía simple, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética. Todos ellos son de escaso interés en la rinitis alérgica y únicamente se utilizan para descartar otras patologías nasosinusales.

Las indicaciones de una TAC serían: descartar otras enfermedades, diagnosticar complicaciones de la rinitis, en pacientes que no responden al tratamiento y en pacientes con rinitis unilateral. En cuanto a la resonancia magnética, puede ser útil en el caso de las sinusitis fúngicas.

d. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de rinitis alérgica debe hacerse con cuidado ya que puede dar lugar a iniciar tratamientos caros y a recomendar cambios en el modo de vida del paciente. A la hora de plantear el diagnóstico diferencial, es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones: a) un mismo sujeto puede tener varios tipos de rinitis; b) la presencia de IgE específica en sujetos con síntomas nasales únicamente indica sensibilización a ese alérgeno; c) otras enfermedades

pueden manifestarse con síntomas nasales. Quedan recogidas en la siguiente tabla las patologías con las que hay que realizar el diagnóstico diferencial en caso de rinitis (62).

Síndromes de rinitis no alérgica	<ul style="list-style-type: none"> • Rinitis no alérgica sin eosinofilia • NARES (Non-Allergic Rhinitis with Eosinophilia) • Rinitis hormonal (hiper/hipotiroidismo, embarazo, anticonceptivos orales) • Fármacos (α-metildopa, β-bloqueantes, AINEs, vasoconstrictores) • Gustativa
Rinosinusitis infecciosa	<ul style="list-style-type: none"> • Vírica • Bacteriana • Fúngica
Enfermedades sistémicas	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrosis quística • Inmunodeficiencias • Síndrome de Kartagener • Síndrome de Sjögren
Alteraciones estructurales	<ul style="list-style-type: none"> • Desviación septal • Concha bullosa • Pólipos nasales • Hipertrofia de adenoides • Cuerpos extraños • Fístula de LCR • Neoplasias
Enfermedades granulomatosas	<ul style="list-style-type: none"> • Granulomatosis de Wegener • Sarcoidosis • Granuloma de la línea media • Vasculitis de Churg-Strauss

Tabla 4. Diagnóstico diferencial de rinitis alérgica (51)

La prevalencia de los diferentes trastornos que ocasionan síntomas nasales varía con la edad. Por ejemplo, los cuerpos extraños son más frecuentes en la infancia, la rinitis atrófica en la vejez, la rinitis tipo NARES en el adulto, etc. En todos los grupos de edad, la rinitis alérgica es la causa más frecuente de rinitis crónica por lo que llevar a cabo su correcto diagnóstico es de gran importancia. El diagnóstico diferencial se basará en la anamnesis en la que se describe la historia personal y familiar, la sintomatología presentada, los tratamientos seguidos y la respuesta obtenida con los mismos. La exploración nasal es imprescindible y permite descartar otras patologías como la presencia de pólipos.

El diagnóstico se lleva a cabo recopilando la información obtenida en la anamnesis, la exploración física, el resultado de las pruebas cutáneas y la cuantificación, en caso necesario, de los niveles de IgE específica sérica (63).

El diagnóstico de las polinosis no presenta gran dificultad sobre todo cuando los síntomas se han repetido en anteriores temporadas. Así, una historia clínica de rinitis intermitente con tests cutáneos positivos frente a uno o varios pólenes indica diagnóstico de polinosis.

Recientemente ha cobrado fuerza el concepto de rinitis alérgica local, caracterizada por la producción local de IgE específica nasal, infiltrado tipo Th2 durante la exposición natural a aeroalérgenos y respuesta positiva a provocación nasal específica. No se detecta en estos pacientes la existencia de IgE específica en sangre. Rondon *et al* (64), han publicado un nuevo protocolo de provocación nasal con múltiples aeroalérgenos para screening de pacientes con rinitis alérgica local, realizado en una única sesión, que resulta útil, sensible, específico y reproducible.

2.2. Conjuntivitis alérgica

2.2.1. Epidemiología

El término conjuntivitis alérgica incluye una serie de reacciones de hipersensibilidad que afectan a los párpados, a la conjuntiva o a la córnea. Incluye varias formas clínicas: conjuntivitis que puede ser intermitente o persistente, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica y conjuntivitis papilar gigante, además de la inducida por fármacos (65). En nuestro trabajo nos centraremos en la conjuntivitis alérgica IgE-mediada por pólenes, habitualmente

intermitente, que es además la forma más frecuente de conjuntivitis (66).

Aproximadamente, un 15-20% de la población tiene una enfermedad alérgica, de los cuales un 40-60% presentan sintomatología ocular (67), aunque existen grandes diferencias entre los distintos autores sobre la frecuencia de síntomas oculares en las enfermedades alérgicas. Bonini *et al* (68) detectan un 40% de patologías alérgicas oculares en un grupo de 898 pacientes alérgicos examinados en un centro de Alergia en Roma (Italia). En cambio, Bloch-Michel *et al* (69) encuentran solamente un 5% de alergia ocular en un estudio realizado en 2.000 pacientes. De éstos, el 50% presentaban conjuntivitis alérgicas, el 70% de las cuales eran persistentes y el 30%, estacionales (polinosis). Saraclar *et al* (70), en una encuesta epidemiológica sobre enfermedades alérgicas realizada en Turquía en 3.024 niños, detectaron una prevalencia acumulada de enfermedad alérgica del 23,4%, del 11,7% para la rinitis alérgica y del 4,6% para la conjuntivitis alérgica. En España, la presencia de rinoconjuntivitis en los pacientes que acuden a consulta de alergia es del 55% (71).

2.2.2. Anatomía de la conjuntiva

La conjuntiva es la primera barrera que, junto con los párpados, las pestañas y la córnea, sirve de defensa ocular a las agresiones externas. Desde el punto de vista inmunológico, en la conjuntiva encontramos respuestas intensas debido a su gran vascularización e innervación. Se trata de una fina membrana mucosa transparente muy vascularizada que tapiza la superficie interna de los párpados y la esclerótica anterior. En el limbo la conjuntiva se continúa con el epitelio corneal (avascular), y en el borde palpebral con la piel. Consta de tres zonas: la conjuntiva tarsal o palpebral, que recubre internamente ambos párpados, la conjuntiva bulbar, sobre la esclerótica anterior, y la conjuntiva de los fondos de saco, que une las otras dos porciones en sus partes superior e inferior (Figura 3). Histológicamente, se divide en dos capas, el sustrato epitelial, compuesto por un epitelio escamoso no queratinizado, con varias capas celulares de espesor, y la lámina o sustancia propia, compuesta por tejido conectivo vascular laxo conjuntival. En el epitelio conjuntival se encuentran linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos y no se observan mastocitos, eosinófilos ni basófilos. La sustancia propia presenta linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células

plasmáticas, células de Langerhans y células NK (72) (esta referencia corresponde a un libro de conjuntivitis alérgica escrito por alergólogos de prestigio). . Los mastocitos conjuntivales son triptasa y quimasa positivos, y expresan IL-4. El tejido linfático conjuntival (CALT) está formado por linfocitos y células plasmáticas conjuntivales y forma parte del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

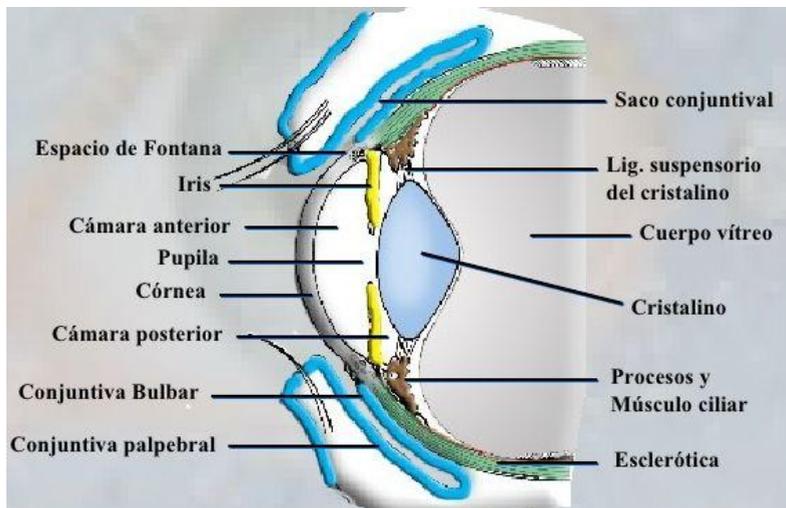


Figura 3. Anatomía de la conjuntiva. Fuente: modificado de <http://es.slideshare.net/Gabrielpm18/tema-30>.

2.2.3. Fisiopatología de la conjuntivitis alérgica

La conjuntivitis alérgica por pólenes, normalmente de carácter estacional, es una reacción IgE mediada con participación de los mastocitos y con escaso infiltrado eosinófilo en la fase aguda siendo mayor en la fase crónica. Consta de dos fases. En la fase temprana o inmediata, se produce un aumento en lágrimas de los niveles de triptasa, histamina, prostaglandinas, leucotrienos y el reclutamiento de células inflamatorias (73). La medición de triptasa en lágrimas puede ser un marcador clínico de participación mastocitaria en la patología ocular alérgica (74). Los mastocitos activados liberan citocinas como IL-4, que actúa favoreciendo la diferenciación de células Th2, pero son las células epiteliales y los fibroblastos los que producen quimiocinas como RANTES (Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted), MCP (monocyte chemoattractant protein) y MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), que atraen a las células inflamatorias al foco (75). También hay niveles elevados de IgE tanto en suero como en lágrimas, no detectándose cambios en la inmunoglobulina A (IgA) (76). Se ha visto que reducir la actividad mastocitaria mediante fármacos produce no solamente disminución de los síntomas de la fase aguda sino también de las

citocinas necesarias para la inflamación crónica (77). Se ha propuesto que los niveles de IL-5, secretada por linfocitos Th2, en lágrimas se utilicen como marcador para evaluar el estado clínico de la alergia ocular (78). En la fase tardía, aparece el infiltrado celular inflamatorio con neutrófilos, linfocitos, basófilos y eosinófilos. En las células del endotelio vascular hay un aumento de las moléculas de adhesión E-selectina e *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) inducido por las citocinas inflamatorias TNF α e IL-1 β que facilita la extravasación de células inflamatorias (79). La IL-12 tiene un papel relevante en la fase tardía de la conjuntivitis alérgica mientras que el interferón gamma (IFN- γ) limita esta fase de la enfermedad (80).

La conjuntivitis alérgica requiere la existencia de una fase previa de sensibilización que se repetirá en las sucesivas exposiciones al alérgeno sensibilizante, cuyo mecanismo es similar al que se produce en la rinitis alérgica que se ha descrito anteriormente.

2.2.4. Clínica

La conjuntivitis alérgica se caracteriza por la presencia de prurito, epifora, hiperemia, quemosis intensa y edema palpebral aproximadamente 30 minutos después del contacto con el alérgeno. Los síntomas no

son patognomónicos y aunque es una patología ocular bilateral, puede ser asimétrica. Generalmente, son afecciones leves pero que producen intensas molestias, aunque no suelen afectar a la visión. La rinitis se asocia en más del 90% de los casos por lo que hay que poner en duda que una conjuntivitis sea alérgica si no se acompaña de síntomas de rinitis.

2.2.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la conjuntivitis alérgica se basa en la anamnesis, la clínica y exploraciones complementarias.

a. Datos de la anamnesis

La anamnesis debe reflejar en particular los siguientes aspectos:

1. La existencia de antecedentes atópicos familiares o personales tales como asma, eccema, urticaria, rinitis alérgica, alergia a fármacos u ocupacional, y de factores desencadenantes como pueden ser colirios, lentes de contacto, productos de desinfección, cosméticos, etc.
2. La incidencia temporal o espacial de la conjuntivitis.
3. El modo de inicio: agudo o crónico.

b. Clínica

En la conjuntivitis alérgica se presentan fundamentalmente los siguientes síntomas y signos:

1. Prurito. Es un síntoma casi necesario para el diagnóstico pero no es exclusivo de la conjuntivitis alérgica y cuando aparece como síntoma único debemos realizar el diagnóstico diferencial sobre todo con ojo seco (67).
2. Crisis de edema palpebral. La aparición de ojeras sin causa aparente puede ser un signo sugestivo.
3. Eritema conjuntival.
4. Lagrimeo

c. Exploración física

En la exploración se pueden encontrar signos sugestivos, pero inespecíficos. Habitualmente se observa quemosis, hiperemia y formación de papilas en la conjuntiva bulbar (81).

d. Exploraciones complementarias

La determinación de la existencia de una diátesis atópica se lleva a cabo mediante diversas pruebas, como la determinación de eosinofilia y de IgE específica sistémica y local, así como con la realización de pruebas cutáneas en el paciente. La presencia de eosinofilia no es patognomónica de enfermedad alérgica (82).

1. Pruebas cutáneas intraepidérmicas en *prick test*

La realización de pruebas cutáneas se lleva a cabo para identificar la sensibilización del paciente a algún alérgeno que puede ser desencadenante de alergia ocular.

2. Prueba de provocación conjuntival

Ya en la década de 1870 Blackley instiló algunos granos de polen en el ojo de un paciente con conjuntivitis. En las primeras décadas del siglo XX se utilizó esta prueba para comprobar la tolerancia a la exposición alérgica del paciente durante las desensibilizaciones (83). Existen métodos objetivos para medir la respuesta a la instilación de alérgenos en esta prueba, como la espectroradiometría o la

colorimetría así como la observación directa de eritema, edema y sintomatología subjetiva como la presencia de picor (84). La prueba de provocación ocular consiste en instilar en el fondo de saco conjuntival inferior, cantidades conocidas de un alérgeno y observar la reacción que produce. Habitualmente se utilizan concentraciones crecientes de alérgeno en una serie de diluciones. Si transcurridos 20 minutos no se observa ninguna reacción, se pasa a la dilución siguiente. Previamente al comienzo, se instila el diluyente (suero fisiológico) como control y se valora a los 10 minutos. La prueba se considera positiva si aparecen: prurito, irritación, eritema, quemosis o epifora.

Podría estar indicada una prueba de provocación para conocer la relevancia clínica de determinados alérgenos en pacientes polisensibilizados. Sirve además para controlar el efecto de la inmunoterapia sobre la enfermedad alérgica. También se utiliza en aquellos casos en que las pruebas cutáneas o la determinación de IgE específica en suero son discordantes con la historia clínica del paciente. Y por último nos serviría para determinar si existe una sensibilización exclusivamente local en aquellos pacientes con pruebas cutáneas negativas con

síntomas sugestivos de conjuntivitis alérgicas (85). Se considera una prueba segura siendo anecdóticos los casos de reacción sistémica tras una prueba de provocación ocular (86). Para la realización de la prueba de provocación ocular se deben retirar los fármacos que pueden interferir en los resultados de la misma (Tabla 5):

Antihistamínicos	5-7
Alfa-adrenérgicos	1
Corticosteroides no depot	7
Corticosteroides depot	30
Cromoglicato disódico	7

Tabla 5. Medicamentos que pueden interferir en la provocación conjuntival e intervalo de tiempo en días previo a la prueba en el que no deben administrarse (87).

2.2.6. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la conjuntivitis alérgica debe realizarse con otros tipos de conjuntivitis: viral, bacteriana, por clamidias y por alergia de contacto. También debe excluirse el síndrome de ojo seco, la existencia de cuerpos extraños, neoplasias o fístulas carotido-cavernosas, la obstrucción de las vías lacrimales, la uveítis anterior y la epiescleritis. En general, debe hacerse el diagnóstico diferencial con

cualquier patología que haga que el ojo se enrojezca asociando quemazón, prurito y lagrimeo (88).

2.3. Asma bronquial

Aunque la presencia de asma bronquial por polen de morera no es objeto de estudio en este trabajo, se comentará brevemente que los pólenes también son causa conocida de asma bronquial, existiendo una correlación entre los niveles de estos y las visitas a urgencias médicas por crisis asmáticas (89).

El asma es un trastorno inflamatorio de las vías aéreas que aparece en individuos susceptibles y que cursa con hiperreactividad bronquial y obstrucción, a menudo reversible, al flujo aéreo. Se presenta en forma de brotes recurrentes con alguno o algunos de los síntomas siguientes: sensación de opresión torácica, sibilantes, disnea y tos. El asma se asocia con frecuencia a la atopia denominándose asma alérgico en contraposición con el asma no-alérgico en el que no se detecta una base atópica (90).

El asma y la rinitis son enfermedades frecuentes que pueden afectar al 5% (91) y 10-25% respectivamente

de la población general siendo los dos principales motivos de consulta en los Servicios de Alergología en nuestro país (30). Según estudios publicados en los últimos años, el 71% de los pacientes con asma tiene rinitis (92), y el 37% de los pacientes con rinitis tiene asma (30). La prevalencia publicada de la rinitis polínica en los asmáticos es del 28-50%. En cambio, la prevalencia publicada del asma entre las personas con rinitis polínica es menor, del orden de 13-38% (93, 94). En un estudio se observó que tras diagnosticar de rinitis alérgica a 99 pacientes, el 32% de los pacientes a los diez años había desarrollado asma (95). Se ha detectado mayor asociación entre rinitis con asma y sensibilización a ácaros y epitelios de animales, mientras que la rinitis sin asma se relaciona más frecuentemente con sensibilización a pólenes (96). No obstante, niveles elevados de polen contribuyen a un aumento de las visitas a urgencias por asma (97). Según el documento *Allergic Rhinitis and its impact on Asthma* (ARIA), se ha visto que cuanto mayor es la gravedad y duración de la rinitis alérgica, tanto más probable podría ser la aparición de asma alérgica (98) aunque esta observación no tiene una significación estadística. De hecho, si disminuyen los síntomas de la

rinitis alérgica en pacientes asmáticos, también mejoran los síntomas bronquiales (99).

Se ha demostrado la presencia de hiperreactividad bronquial inespecífica en pacientes con rinitis alérgica sin síntomas ni signos sugestivos de asma bronquial (100). Además, en algunos pacientes el tratamiento de la rinitis alérgica con corticoides nasales y antihistamínicos mejora los síntomas bronquiales.

El asma y la rinitis alérgica están íntimamente relacionadas, lo que ha llevado a emitir el concepto de que ambas forman parte de una entidad clínica común, la enfermedad alérgica de la vía respiratoria. Tienen el mismo mecanismo fisiopatológico y existe una importante interacción clínica entre ellas.

3. Aeropalinología

El término aeropalinología hace referencia al estudio de los pólenes que son transportados por el viento (aeroalérgenos). Esta rama de las ciencias biológicas estudia todo lo referente a la aerovagancia de los pólenes, caracterizándolos y midiendo sus niveles atmosféricos. La cuantificación de aeroalérgenos, tanto de pólenes como de hongos, puede ser de gran ayuda en la clínica permitiendo evaluar el riesgo de sensibilización en pacientes atópicos, y sirviendo de apoyo diagnóstico en pacientes sensibilizados a más de un alérgeno, aportando además información en estudios epidemiológicos (101). A pesar de que ya existían diversos métodos de estudio de pólenes, la creación en las últimas dos décadas de redes nacionales e internacionales en las que se asocian grupos de trabajo e investigación en aerobiología, ha hecho posible la estandarización de métodos utilizados en diferentes laboratorios. El comportamiento aerodinámico de cualquier partícula en la atmósfera dependerá de su tamaño, densidad y forma. Los niveles de polen detectados en captadores puede verse afectado por la dirección y fuerza del viento (102).

3.1. Colectores de pólenes

Los pólenes pueden ser recogidos por colectores basados en dos tipos de métodos: gravimétricos y volumétricos.

3.1.1. Método gravimétrico

Hace años se utilizaba este método para la captación de pólenes de la atmósfera y, preconizado por Durham, fue aceptado en su día por la mayoría de países. Esta técnica se basa en colocar en un soporte un portaobjetos horizontal impregnado en glicerina en el que, por deposición gravimétrica sedimentan los pólenes (103) (Figura 4). No obstante, su eficiencia de captación solamente es buena para partículas de más de 20 μm , siendo poco eficiente para la captación de las esporas y pólenes pequeños, que no quedan impactados. La velocidad del viento también influye de forma notoria. Por lo tanto, este método es válido para estudios cualitativos pero no para la cuantificación de pólenes.



Figura 4. Colector de Durham (105).

3.1.2. Método volumétrico

En la recogida de pólenes se utilizan básicamente dos tipos de dispositivos de muestreo basados en el método volumétrico: el dispositivo de impacto por succión y el de impacto por rotación. Otro grupo lo constituyen aquellos captadores que funcionan por filtración, ya sea a través de membranas de materiales diversos o a través de fibras, como es el caso del Captador Cour. Hirst ideó el método volumétrico con bomba de aspiración-succión (104). El aparato *Burkard seven day volumetric spore-trap*[®] es un colector de este tipo (Figura 5); es el sistema más utilizado en Europa. Consta de una cámara de admisión de aire con

un débito de 10 litros por minuto, a través de una hendidura de 14 milímetros de largo y 2 mm de ancho que está siempre frente a la dirección del viento gracias a que va montado sobre una veleta (Figura 6). La fuente colectora es una cinta de plástico cubierta de material adherente colocada verticalmente en un tambor que gira por la fuerza del viento y por lo tanto es inercial. La hendidura está muy próxima a la cinta (0,6 mm), quedando impactados sobre la capa de vaselina que la recubre la mayoría de los corpúsculos atmosféricos mayores de 1 μm de diámetro. La cinta se desplaza en el sentido de la agujas del reloj a una velocidad de 2 mm/hora durante un máximo de 7 días seguidos. Este sistema permite calcular el número medio de granos de polen por m^3 de aire en 24 horas. Las ventajas de estos dispositivos sobre los aparatos basados en métodos gravimétricos basados en el método de Durham son que se conoce exactamente el volumen de aire muestreado y que tienen una mejor eficiencia para captar partículas pequeñas (menores de 20 μm).



Figura 5. Captador por succión tipo Burkard. Fuente: <http://lap.uab.cat/aerobiologia/es/methods>.

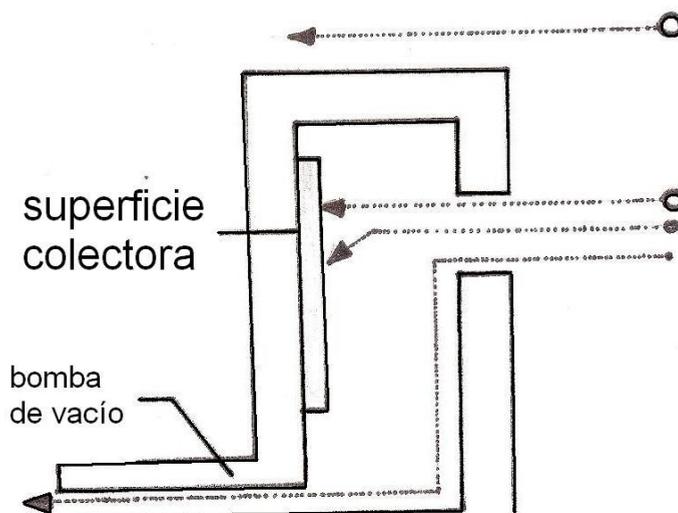


Figura 6. Esquema de un sistema de captación de pólenes basado en impacto por succión.

Otro de los métodos volumétricos para la captación de pólenes lo constituyen los dispositivos de impactación por rotación. Estos aparatos tienen dos barras verticales recubiertas de adhesivo y montadas en una barra cruzada que gira por medio de un eje vertical con motor eléctrico a alta velocidad (2400 rpm). El dispositivo Rotorod es el más conocido, con una eficacia mayor del 90% para capturar partículas de unos 10-15 μm de diámetro (Figura 7). Este es el sistema más utilizado en Estados Unidos. Tiene dos inconvenientes fundamentalmente, uno de ellos es que la velocidad de giro hace que el polen pueda ser lanzado hacia fuera y reducir el muestreo, y otro que al tener áreas de impactación pequeñas se sobrecarga rápidamente por lo que suele ponerse en funcionamiento de forma intermitente.



Figura 7. Sistema Rotorod. Fuente:
http://www3.uah.es/antonia_andrade/aeropalinol.htm

Por último, están los muestreadores de filtración en los que el aire pasa a través de un filtro colocado sobre unas placas cuadradas. Este sistema es muy similar al Rotorod pero en lugar de unas varillas impregnadas en el sistema tendríamos las placas cuadradas de 20 cm de lado con los filtros con la diferencia de que este muestreador es inercial. De este tipo es el sistema

Cour (105). En la parte posterior hay una veleta que mantiene orientadas las placas siempre al viento dominante. En una de las placas se pone un filtro que se recambia semanalmente y en la otra placa hay un contrapeso que se utiliza como resumen mensual (Figura 8). Cuando se trabaja con un captador de este tipo es necesaria la utilización de un anemómetro totalizador, para medir la velocidad del viento.



Figura 8. Sistema captador tipo Cour. Fuente: <http://lap.uab.cat/aerobiologia/es/methods>.

3.2. Morfología del polen

Los granos de polen son gametofitos masculinos vivos de plantas de tamaño grande (gimnospermas y angiospermas) y contienen la mitad de la carga cromosómica diploide de la planta de la que provienen (106). Se identifican mediante microscopio tanto óptico como electrónico de transmisión por su tamaño y por su forma así como por la estructura de su pared. El grano de polen resulta ser un receptáculo muy resistente que asegura su transporte desde las anteras hasta el estigma, fenómeno al que se llama polinización. Un grano de polen maduro está rodeado por una cubierta de celulosa y pectina llamada intina, muy similar a la pared de una célula vegetal. Por fuera de esta pared se encuentra otra cubierta denominada exina, compuesta por esporopolenina, un polímero de ácidos grasos con alto peso molecular que le confiere gran resistencia a condiciones climáticas adversas. Al estudiar a microscopía óptica el grano de polen, la exina se divide en una porción esculpida, llamada sexina, y una porción no esculpida, llamada nexina, la cual cubre la intina y consta de dos capas, la nexina 1 y nexina 2. (107). Cuando el estudio se realiza a microscopía electrónica de transmisión también aparecen dos capas con diferentes electrodensidades,

que reciben el nombre de ectexina, la más exterior, y endexina, la más interior (Figura 9). La sexina está formada por una capa externa o tectum que se apoya en la nexina a través de unas estructuras en forma de columnas llamadas columelas. El polen puede presentar un tectum completo (grano tectado), parcialmente completo (grano semitectado) o completamente ausente (grano intectado).

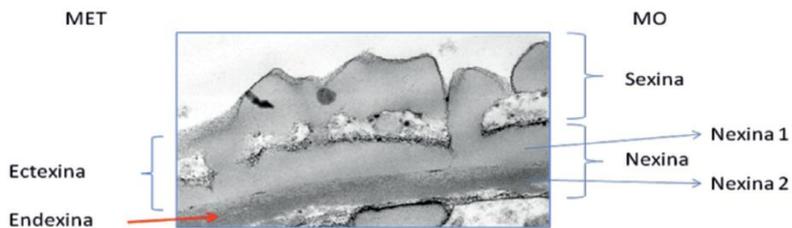


Figura 9. Esquema de la estructura de la pared de un grano de polen. Fuente: <http://www.alergomurcia.com>.

La mayoría de los pólenes presentan aperturas ocasionadas por pequeñas pérdidas de continuidad de la exina. Hay dos tipos principales de aperturas: los poros y los colpos, que son hendiduras paralelas al eje polar. Los pólenes con un solo poro se denominan “porados” y, los que tienen un solo colpo, “colpados”. Los que tienen aperturas compuestas por un poro y un colpo juntos se denominan “colporados” (Figura 10).

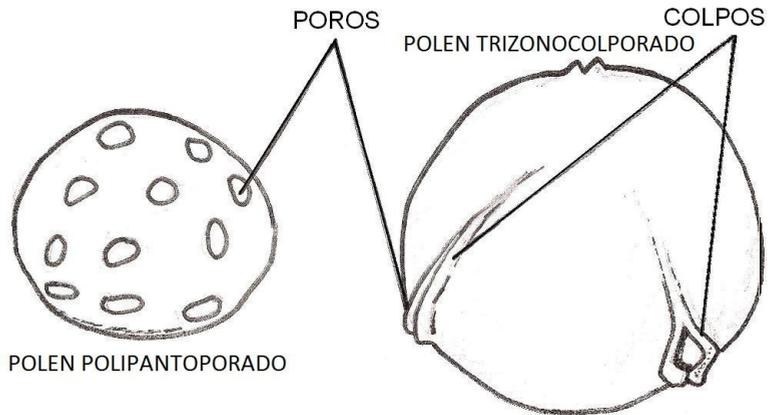


Figura 10. Esquema de tipos de polen.

Generalmente los pólenes tienen una forma esférica o elipsoide. Dentro de estos últimos, se denominan pólenes “prolados” cuando el diámetro polar es mayor que el ecuatorial lo que les confiere una *forma de melón*, y “oblados” cuando el diámetro ecuatorial es mayor que el polar adoptando una *forma de calabaza* (Figura 11).

Según el diámetro del grano, se clasifican en: pólenes muy pequeños ($< 10 \mu\text{m}$), pequeños ($10\text{-}24 \mu\text{m}$), medianos ($25\text{-}49 \mu\text{m}$), grandes ($50\text{-}99 \mu\text{m}$), muy grandes ($100\text{-}200 \mu\text{m}$) y gigantes ($> 200 \mu\text{m}$).

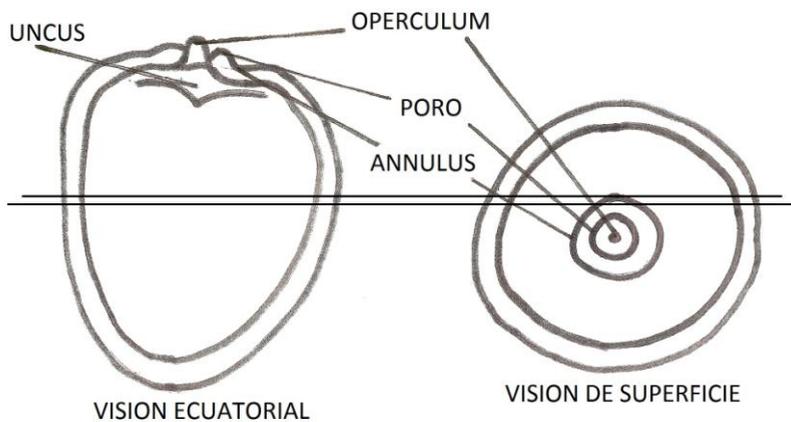


Figura 11. Esquema de un grano de polen.

3.3. Morfología de la planta

Las plantas con semillas presentan sus estructuras reproductivas en conos ó en flores. Las plantas gimnospermas son árboles y arbustos que transportan las semillas en estructuras con forma de conos. A este grupo pertenecen los pinos, abetos, cipreses y cedros entre otros. Hay conos masculinos y conos femeninos. Los conos femeninos de las pináceas se llaman piñas. Las plantas angiospermas en cambio tienen las semillas en el interior de las estructuras reproductivas de la flor. Pueden ser mono o dicotiledóneas según tengan una o dos hojas con semillas. Cada flor presenta dos cubiertas, una inferior y exterior, llamada

lema, y otra superior e interna, llamada palea. El pistilo está formado por el ovario, los estigmas con los granos de polen adheridos y el estilo que une a los dos anteriores (Figura 12). El aparato reproductor masculino está formado por los estambres, generalmente en número de tres, cada uno formado por un filamento que, en su extremo distal, presenta una antera con hendiduras longitudinales y rellena de granos de polen. Los lodículos son unos globos situados en la base del ovario que, cuando se hinchan, entreabren la lema y la palea, permitiendo que las anteras salgan al exterior, quedando colgadas del filamento. A este fenómeno se le denomina anthesis (anteras colgando fuera de las flores) e inicia el periodo de floración de los pólenes. El aire seco y cálido (en general a primeras horas de la mañana) produce una rotura y retracción de esas hendiduras de las anteras, permitiendo que el viento disemine sus pólenes de forma aleatoria. La aerovagancia o flotabilidad en el aire y la dispersión horizontal de los pólenes está condicionada por su densidad y tamaño (108). Debido a que la transferencia de polen es menor en la polinización anemófila que en la entomófila, las plantas que polinizan por aire producen gran cantidad de polen para asegurar la fertilización. Además, las flores de

estas plantas habitualmente no tienen pétalos y las anteras quedan expuestas a la acción del viento. Por lo tanto, el polen de las plantas anemófilas es más abundante en la atmósfera y por ello es el de mayor importancia en términos de exposición humana. Las plantas de polinización anemófila constituyen sobre el 10% de todas las plantas con flores (109).

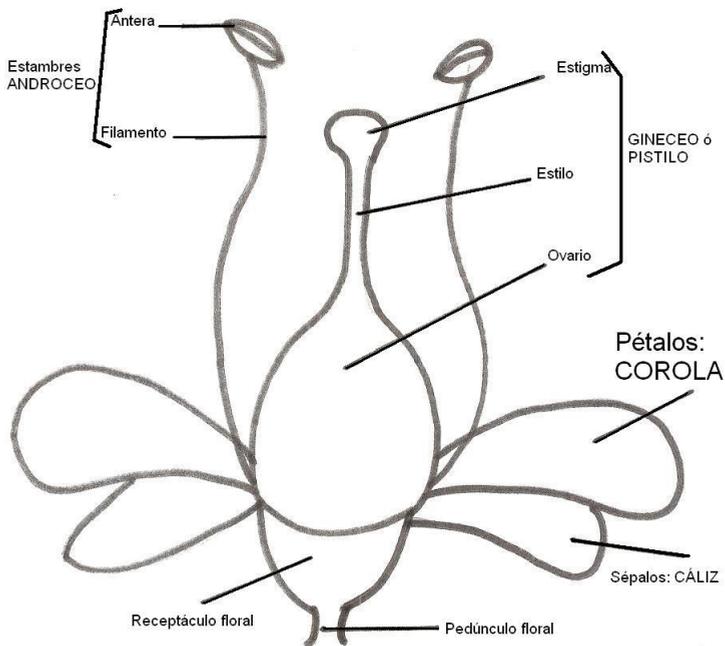


Figura 12. Esquema de las partes de una flor.

4. Alérgenos polínicos

4.1. Características generales de los alérgenos polínicos

Para que un polen tenga relevancia clínica debe cumplir una serie de características conocidas como Postulados de Thommen (110):

- El polen debe contener una sustancia capaz de producir los síntomas alérgicos.
- El polen debe ser anemófilo (polinización por aire).
- El polen debe ser producido en suficiente cantidad para que la exposición humana sea relevante.
- El polen debe ser lo suficientemente ligero para ser transportado a grandes distancias.
- La planta que produce el polen debe tener una amplia distribución.

Las especies de plantas productoras de pólenes alérgicos no están necesariamente relacionadas entre sí desde el punto de vista de la botánica. Así, el polen de olivo (*Olea europaea*) y el de abedul (*Betula verrucosa*) son ambos altamente alérgicos aunque pertenecen a distintos ordenes (*lamiales* y *fagales*,

respectivamente); por otro lado, la hierbabuena y la lavanda que también se incluyen en el orden *lamiales* no son pólenes alergénicos de forma significativa, por lo que no podemos utilizar la clasificación filogenética para predecir qué pólenes serán alergénicos y cuáles no.

Los granos del polen contienen las estructuras reproductoras masculinas (gametofitos) de las plantas que tienen semillas, y sirven para transportar estos gametos masculinos hasta el gameto femenino (111). El polen, al igual que las semillas, está sometido a la deshidratación una vez secretado y precisan de hidratación para estimular su germinación. Los granos de polen sufren una mitosis asimétrica que da lugar a una gran célula vegetativa y a otra célula generativa más pequeña. Esta última, que contiene un núcleo condensado y un pequeño citoplasma, queda rodeada de la célula vegetativa. Conforme el polen madura, las proteínas y el ácido ribonucleico (ARN) necesarios en los estadios iniciales de la germinación del polen son depositados en el citoplasma de la célula vegetativa (112). Tras la rehidratación del polen se desencadenan una serie de procesos celulares que conducen a la profusión del tubo polínico en el estigma o a la liberación de los alérgenos en el interior del individuo.

Los granos de polen están formados por dos o tres células derivadas de la división en la antera que se encapsulan en la exina, resistente a agresiones externas, químicas y mecánicas. Normalmente, los antígenos de los granos de polen están asociados a tres lugares, a saber: la intina, especialmente las aberturas o poros; las cavidades de la exina, ligeramente selladas por una capa de grasa, y el material superficial derivado del revestimiento de la antera (113).

Los granos de polen contienen gran cantidad de proteínas. Por ejemplo, un 25% el polen de gramíneas y un 30% el polen de olivo. Sin embargo es difícil determinar qué proteínas son las más abundantes en el polen, las alérgicas o las no-alérgicas. En cualquier caso, las proteínas alérgicas están presentes en gran cantidad y son necesarias para la germinación del polen y el crecimiento de la planta. Los niveles de expresión de los alérgenos en el grano de polen pueden verse influidos por factores ambientales como el dióxido de carbono, un clima con altas temperaturas o humedades y ciertas características intrínsecas de ciertas especies como la resistencia a la sequía y su grado de maduración (13, 114). Se ha observado que la exposición a la polución ambiental

produce un aumento dosis-dependiente de la liberación de gránulos citoplasmáticos de polen de gramíneas en muestras expuestas a contaminantes ambientales así como en ambientes con niveles bajos de ozono (115). Las propiedades bioquímicas de los granos de polen contribuyen a su alergenicidad. Los mecanismos de defensa del pulmón evitan la llegada a los alveolos de las partículas de polen de más de 3 μm . Sin embargo, se han visto granos completos de polen, de más de 3 μm de tamaño, en vías respiratorias inferiores y se postula que así como el grano completo es necesario para el desarrollo de rinitis alérgica, no lo es tanto para la aparición de asma, siendo suficiente la presencia de partículas de este grano de polen de un tamaño que les permita llegar a las vías respiratorias más pequeñas (116).

Debido a que el grano de polen se halla sujeto a una situación competitiva extrema con otros granos de polen por alcanzar el gameto femenino, no es sorprendente que el tubo polínico sea una estructura con gran velocidad de crecimiento, de modo que un leve defecto en este proceso da lugar a una pérdida de la competitividad. Se ha intentado mediante ingeniería genética reducir o eliminar la alergenicidad del polen pero sin que esto afecte a las funciones biológicas del

mismo, que son necesarias para la supervivencia y crecimiento de las plantas, y para el mantenimiento de la biodiversidad natural (8).

Los alérgenos de polen son proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular, entre 5 y 90 kDa, que se liberan rápidamente tras el contacto con soluciones acuosas. Las actividades biológicas de estas proteínas alergénicas son muy diversas: actúan en el reconocimiento celular y tienen funciones enzimáticas, defensivas, estructurales, transportadoras y reguladoras entre otras. El papel funcional de la mayoría de alérgenos polínicos no se ha establecido claramente en la actualidad (117). Sin embargo, en la última década, se han producido importantes avances en la secuenciación y conocimiento de la estructura tridimensional de una gran parte de los alérgenos de exterior más relevantes. Esta información ha contribuido en gran medida al conocimiento de las funciones de los alérgenos en sus fuentes de origen, y de su capacidad para producir rinoconjuntivitis, asma, edema, urticaria y anafilaxia.

Los alérgenos polínicos de las plantas pertenecen únicamente a un reducido número de familias de proteínas. Solamente 29 de 7868 familias de proteínas incluyen proteínas alergénicas entre sus miembros

(118). Las principales familias de alérgenos polínicos son las profilinas, expansinas, prolaminas, proteínas con dominios *EF-hand* y proteínas Bet v 1-like (119).

La Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) incluye un alérgeno en la clasificación de proteínas alergénicas cuando éste está presente en al menos 5 pacientes y en el 5% de la población estudiada. Los alérgenos se clasifican en mayores y menores según estén presentes en más o menos del 50% de los pacientes sensibilizados. Los nombres de los alérgenos se expresan en abreviatura de forma que en primer lugar se escribe el género con tres letras a continuación la especie con una letra y finalmente un número arábigo que generalmente se asigna según el orden de su descubrimiento. Los tres grupos gráficos están separados con un espacio. Por ejemplo, Phl p 1 es un alérgeno mayor de *Phleum pratense* (120). En ocasiones este sistema debe ser modificado de modo que incluya una letra adicional para la designación exacta del género o especie.

4.2. Panalérgenos

Hay proteínas alergénicas que muestran un cierto grado de homología estructural en la secuencia de aminoácidos dando lugar a que exista entre ellos lo que se denomina reactividad cruzada. Entre los alérgenos mayores de las especies de un mismo género existe un alto grado de homología estructural que llega a ser del 90% en algunos casos (121). Los panalérgenos, considerados en general alérgenos menores, se definen como proteínas con homología estructural entre ellas, pertenecientes a fuentes biológicas diferentes, que son capaces de inducir la producción de anticuerpos de clase IgE que presentan reactividad cruzada entre especies no relacionadas evolutivamente.

Entre los panalérgenos que tienen interés clínico en la alergia a pólenes destacamos las profilinas, las polcalcinas, los alérgenos homólogos a Bet v 1 (Bet v 1-*like*) y las proteínas transferidoras de lípidos.

4.2.1. *Proteínas estructurales. Profilinas*

Las profilinas son proteínas de pequeño tamaño (12-15 kDa) presentes en la totalidad de especies animales y vegetales. Su ubicuidad se explica por la función

esencial que tienen en la regulación del ensamblaje de los filamentos de actina para la formación del citoesqueleto de organismos eucariotas como plantas y animales. A diferencia de los alérgenos de origen vegetal ligantes de calcio (familia de las polcalcinas), presentes sobre todo en pólenes, las profilinas forman parte de tejidos de almacenamiento de la planta tales como frutos, nueces, especias y látex y, por tanto, son también responsables de la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos (122) e incluso entre pólenes y látex. La estructura tridimensional de estas proteínas muestra un alto grado de conservación en la evolución, lo que explica las reacciones cruzadas entre pólenes, y entre pólenes y alimentos, que las contienen (123). Las profilinas están implicadas en reacciones alimentarias sobre todo de tipo *síndrome de alergia oral*, y menos frecuentemente, en reacciones anafilácticas. La primera profilina alérgica fue descrita en polen de abedul y se designó como Bet v 2 (124). Al igual que otros panalérgenos, las profilinas de las distintas fuentes alérgicas poseen secuencias muy conservadas, con una homología estructural entre el 70 y 85% (Bet v 2 y Ole e 2). El 20% de los pacientes alérgicos a pólenes está sensibilizado a profilinas (125), aunque en un estudio de profilina del polen del

quenopodio (Che a 2) se observó una prevalencia del 55% (126). El alérgeno Phl p 12 se considera un marcador de profilinas, por lo que, cuando se detecta IgE sérica frente a Phl p 12 en un paciente, puede decirse que es alérgico a la familia de las profilinas. La reactividad cruzada entre las profilinas de artemisa Art v 4 y de alimentos como apio (Api g 4), zanahoria Dau c 4 y especias ha dado lugar al llamado síndrome artemisa-apio-especias (127). Lo mismo ocurre con las profilinas de ambrosía Amb a 8, melón Cuc m 2 y plátano Mus xp 1 en este caso conocido como síndrome ambrosía-melón-banana (128).

4.2.2. *Proteínas de defensa (pathogenesis-related proteins o proteínas PR)*

El sistema de defensa de las plantas hace uso de un amplio espectro de compuestos y proteínas resistentes al estrés biótico y abiótico. Un considerable porcentaje de alérgenos identificados de plantas pueden ser clasificados en alguna de las 14 familias de proteínas de defensa (*pathogenesis-related proteins o proteínas PR*) que tienen como característica común el que su inducción se produce, en primera instancia, como respuesta a la infección por patógenos (hongos, virus o bacterias), pero también en situaciones de estrés para

la planta, como congelación, sequía y cambios de temperatura (129). Aunque *a priori* las proteínas de defensa se han considerado proteínas inducibles, también existen proteínas PR que se expresan de modo constitutivo o durante etapas del desarrollo de la planta. Estas proteínas se caracterizan por ser de bajo peso molecular, estables a pH bajo y resistentes a proteasas (130). Tienen un alto grado de homología estructural entre sí dando lugar a reactividades cruzadas. Muchos pacientes alérgicos a una proteína polínica también presentan síntomas alérgicos tras la ingesta de algunos alimentos como frutas, vegetales y/o frutos secos (131). Así, la IgE específica producida por sensibilización a un alérgeno en particular puede reconocer epítomos presentes en la superficie de otras proteínas de plantas idénticos a epítomos del alérgeno sensibilizante, de modo que cuando el paciente se expone a dichas proteínas alergénicas polínicas que presentan un cierto grado de homología con el alérgeno presenta también sintomatología alérgica (132).

Existen 17 familias de proteínas PR (PR1 a PR17) (133). Entre los alérgenos que pertenecen a esta superfamilia, caben destacar los alérgenos que

presentan un alto grado de homología entre sí con función ribonucleasa, como Bet v 1 en el abedul (134) y sus homólogos en el avellano (Cor a 1) (135), la manzana (Mal d 1) (136) y la zanahoria (Dau c 1) (137), que pertenecen a la familia PR-10 y se conocen como alérgenos Bet v 1-like u homólogos a Bet v 1. Todos ellos tienen un peso molecular de 17-18 kDa, son resistentes a proteasas y se localizan en el citosol de la célula (138). La manifestación clínica más frecuente relacionada con estas proteínas se debe a su reactividad cruzada y se conoce como el Síndrome de alergia oral a frutas, frutos secos y vegetales en pacientes con polinosis, principalmente por polen de abedul (139). Las proteínas alergénicas del grupo de proteínas de defensa representan los alérgenos mayores en el polen de árboles *Fagales* incluyendo las familias *Betulaceae* y *Fagaceae*, y pueden ser detectadas en alimentos de distintas familias botánicas: la familia *Rosaceae* incluye proteínas PR-10 en su estructura que tienen un 50-60% de identidad con Bet v 1 y se encuentran en el albaricoque Pru ar 1, ciruela Pru c 1, melocotón Pru p 1, cereza Pru av 1, manzana Mal d 1, pera Pyr c 1; la familia *Betulaceae* (avellana Cor a 1) y la familia *Apiaceae* tienen proteínas PR-10 que presentan un 40-50% de identidad con Bet v 1,

presentes en la zanahoria Dau c 1 y el apio Api g 1) (140).

En otro grupo de PR se encuentra la proteína transportadora de lípidos (*lipid transfer protein* o LTP). La LTP está implicada en reacciones alimentarias de tipo anafiláctico y pertenece al grupo PR-14. Además de en alimentos, se encuentra en diversos pólenes, como *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris* y *Platanus acerifolia*, y en el látex (141). Las proteínas transportadoras de lípidos ó LTP de plantas son una familia de polipéptidos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y perteneciente al grupo 14 de las proteínas de defensa con propiedades antifúngicas y antibacterianas no específicas de la planta (142). Están constituidas por una cadena polipeptídica de entre 91 y 95 aminoácidos, con un peso molecular de 9-10 kDa con gran estabilidad estructural lo que las convierte en candidatas a provocar reacciones anafilácticas por su resistencia al calor y a la digestión péptica (143).

La primera proteína alergénica LTP descrita, Pru p 3, se encuentra en las plantas rosáceas y es la principal representante de este grupo. Constituye el alérgeno mayor del melocotón, siendo la reactividad cruzada entre las frutas rosáceas la norma, debido a la gran homología estructural que presentan las LTP de las

diferentes rosáceas entre sí, tal y como ocurre con Mal d 3 (LTP de manzana) (144), Pru ar 3 (LTP de albaricoque) (145), y con Pru av 3 (LTP de cereza) (146) y Pru d 3 (LTP de ciruela) (147). A diferencia de lo que sucede en el norte de Europa, en nuestro país la alergia a melocotón no se relaciona con la polinosis habitualmente (148) y la vía de sensibilización a este alimento no es inhalada (alergia alimentaria clase 2) sino gastrointestinal (alergia alimentaria clase 1), contrariamente a lo que ocurre con la reacción cruzada entre rosáceas y polen de abedul (149) que se produce por sensibilización a Bet v 1. La alergia a melocotón es la causa más frecuente de reacciones alérgicas en el área mediterránea (150) siendo Pru p 3 la responsable en más del 90% de casos (151).

La estabilidad de la estructura tridimensional de la LTP se debe a la presencia de 4 hélices α (hidrófobas), un extremo C-terminal desestructurado y 4 puentes disulfuro entre 8 residuos de cisteína conservados (Figura 13). En el interior de la molécula queda una cavidad hidrofóbica que aloja los componentes lipídicos.

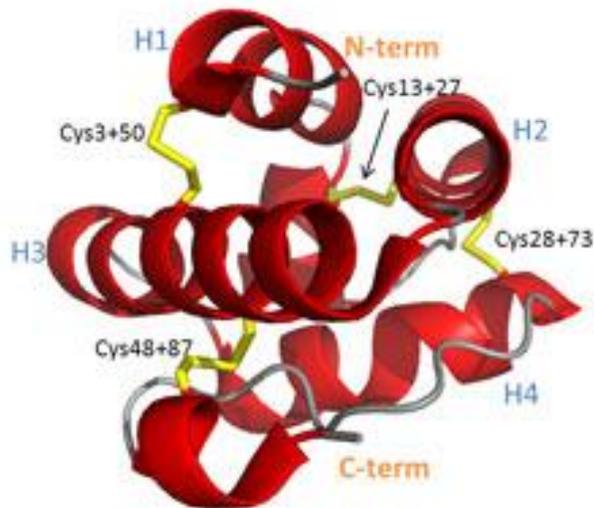


Figura 13. Estructura molecular de Pru p 3 (LTP). Fuente: Dr. Fötisch, Paul-Ehrlich-Institut.

La presencia de la proteína LTP en la piel de la fruta se debe a que esta se encuentra en asociación con polímeros de naturaleza lipídica en tejidos extracelulares de la planta que es donde cumple sus funciones defensivas. Así, es menos frecuente en la pulpa del vegetal y muchos pacientes toleran la ingesta del fruto pelado. Por ejemplo, aproximadamente un 40% de pacientes alérgicos a manzana y pera toleran la fruta pelada lo que no ocurre con tanta frecuencia en el caso de pacientes alérgicos a melocotón (152). Igualmente se encontraron diferencias en la exploración cuando se utilizaban extractos con pulpa con o sin piel para *prick test*. La LTP es un alérgeno

muy relevante en el área mediterránea que no se asocia a polinosis a diferencia de otros panalérgenos como profilina y Bet v 1. La variabilidad en la secuencia de aminoácidos de la LTP en alimentos y pólenes oscila entre 20 y 90% por lo que la reactividad cruzada no es muy fuerte entre ambas. Algunos pacientes reaccionaron frente a una fuente de LTP mientras que otros lo harán frente a muchas de ellas.

4.2.3. *Proteínas que unen calcio*

Las proteínas ligantes de calcio constituyen una superfamilia de proteínas que están presentes en especies vegetales y animales. Se caracterizan por poseer entre dos y ocho puntos de unión de calcio *EF-hand* o manos de calcio que son dominios formados por dos alfa-hélices denominadas E y F, y al menos un punto de unión (126) , que es donde se unen habitualmente los iones de calcio. Cuando estas proteínas tienen dos puntos de unión se les denomina polcalcinas. La parvalbúmina de bacalao es el primer alérgeno descrito que une calcio (153). Tiene tres *EF-hand*. No existe reactividad cruzada entre las proteínas ligadoras de calcio con distinto número de *EF-hand*. Por ejemplo, entre parvalbúminas y polcalcinas. La función de estas proteínas es de gran relevancia para

la planta debido al papel esencial del calcio en la germinación del polen. De hecho, el uso de agentes quelantes del calcio o mutaciones de los puntos de unión del calcio afectan a la integridad estructural de la planta (154). El ion calcio posee una gran capacidad quimiotáctica, y atrae a proteínas hacia la zona apical del tubo polínico en su proceso de crecimiento. Las proteínas que unen calcio se liberan inmediatamente desde el interior del polen tras el proceso de rehidratación. Aparecen en la mayoría de pólenes, en particular en gramíneas, árboles y malezas) siendo Ole e 3, Che a 3, Bet v 4, Jun o 4, Art v 5, Phl p 7 y Bet v 4 algunos ejemplos (155). Se considera Phl p 7 como marcador de polcalcinas. Este grupo de alérgenos polínicos constituyen una familia de proteínas con estructura primaria muy conservada, con un grado de identidad medio entre sí superior al 75%, pero cuyos principales epítomos para la IgE se encuentran en la porción menos conservada de la proteína (155). Las polcalcinas son proteínas de bajo peso molecular (7-9 kDa). En un estudio realizado por Rossi *et al* se observó que su incidencia en un grupo de pacientes alérgicos al polen de gramíneas es del 10 al 30% (156), aunque puede ser mayor en algunas regiones y para ciertos alérgenos, como en el caso de Che a 3 de

Chenopodium, cuya prevalencia alcanza casi un 50% (157). No existe reactividad cruzada entre polcalcinas y alérgenos de alimentos.

4.2.4. *Reactividad cruzada*

En relación a la capacidad alérgica de una determinada molécula hay que considerar dos aspectos: la inmunogenicidad y la alergenidad. Inmunogenicidad es la capacidad de un antígeno de inducir una respuesta inmunitaria y antigenicidad es la propiedad de un antígeno de unirse a un anticuerpo, o a un receptor de antígeno, específico. En el caso de la alergia nos referimos a la capacidad de un alérgeno de inducir una respuesta mediada por IgE y de la propiedad del alérgeno de unirse específicamente a la IgE formada. Entonces el término antigenicidad puede sustituirse por el de alergenidad. Cuando la IgE se une específicamente a una proteína distinta al alérgeno que indujo su síntesis en la fase de sensibilización, porque esta proteína comparte epítomos con la proteína alérgica inicial, se habla de reactividad cruzada entre ambas. Este fenómeno se basa en la homología de secuencia que pueden presentar dos proteínas diferentes. Un grado de homología en la secuencia de aminoácidos no superior al 25% puede ser suficiente

para que dos proteínas se plieguen de modo equivalente y compartan una estructura terciaria común. Sin embargo, es necesario un mayor grado de identidad en general superior al 70% para que dos proteínas compartan aminoácidos expuestos en la superficie molecular y epítomos reconocidos por la IgE y, por tanto, para que la reactividad cruzada tenga lugar. Por otra parte, algunos estudios han determinado que la reactividad cruzada IgE mediada puede ser el resultado de la función de linfocitos T *helper* específicos de un panalérgeno que participan en los procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos (158).

Los determinantes de carbohidratos con reactividad cruzada (*Cross-reactive Carbohydrate Determinants* o CCDs) son residuos carbohidratados de glicoproteínas, que inducen la producción de IgE específica y que tienen gran capacidad de reactividad cruzada (159). Aproximadamente un 20% de los pacientes con alergias a múltiples pólenes tienen anticuerpos IgE específicos de alérgenos polínicos con peso molecular mayor de 30 kDa y gran parte de su capacidad de unión a la IgE depende de los CCDs. La mayoría de alérgenos son glicoproteínas de modo que el proceso de glicosilación está involucrado, en ocasiones, en la

alergenicidad de la molécula. Existen dos tipos de glicosilación, O y N-glicosilación, según se una el hidrato de carbono a un radical hidroxilo de un aminoácido, serina, hidroxiprolina o treonina (O-glicosilación), o a un radical amino (N-glicosilación) de asparragina, siendo el último el más estudiado en pólenes (Figura 14).

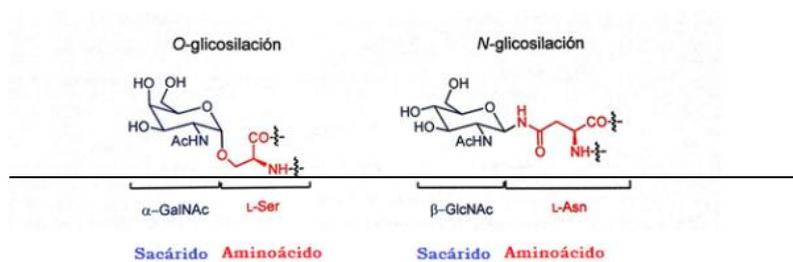


Figura 14. Tipos de glicosilación. Fuente:
<https://elementosanonimos.files.wordpress.com/2012/02/o-y-n.png>

Los N-glicanos se dividen en 3 tipos (Figura 15) según el contenido de manosa: alto, híbrido y complejo (160).

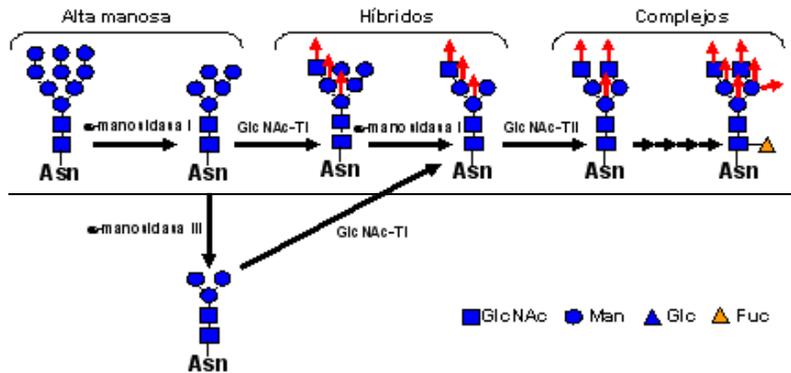


Figura 15. Tipos de N-glicanos (161).

Los N-glicanos de plantas contienen estructuras que no están presentes en mamíferos como son $\beta(1,2)$ -xilosa unida al núcleo de manosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa unida al extremo proximal de N-acetilglucosamina, con propiedades inmunogénicas y capacidad para unir anticuerpos IgE (162). En la estructura de un N-glicano, el residuo xilosa (Xil) se encuentra unido al núcleo de manosa (Man), y el residuo fucosa (Fuc) al extremo proximal N-acetilglucosamina (GlcNAc) que es por donde se une el N-glicano al aminoácido asparagina (Asn) contenido en la proteína. Algunas glicoproteínas contienen ambos residuos, y otras solamente uno de ellos (Figura 16).

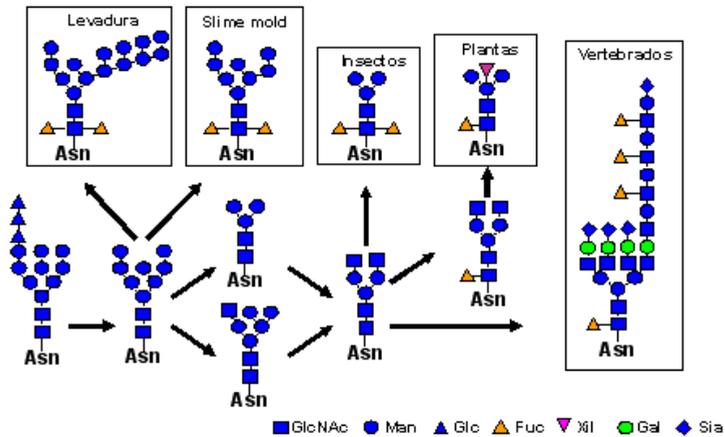


Figura 16. Estructura N-glicanos (161).

La relevancia clínica de los anticuerpos IgE frente a CCD no ha sido claramente establecida y su papel en la sensibilización alérgica queda aún por explorar (163).

4.3. Factores que favorecen la alergia al polen

Los alérgenos unidos a partículas atmosféricas como las partículas *diesel* que poseen propiedades adyuvantes, inducen una reacción inmunitaria Th2 favoreciendo de este modo la sensibilización alérgica (164). Además, las proteínas alérgicas y otras micropartículas ambientales salen rápidamente del grano de polen tras el contacto con la mucosa respiratoria dando lugar a la aparición de síntomas asmáticos (165).

El clima produce variaciones diurnas en la exposición a los pólenes. Factores meteorológicos -como la temperatura, la velocidad del viento, la humedad, la lluvia, las tormentas- y variaciones climatológicas - temperaturas frías o templadas, períodos más fríos o húmedos- influyen en la distribución polínica. Las actividades humanas aumentan las emisiones de dióxido de carbono e inducen cambios en el clima del planeta influyendo de este modo en la sensibilización alérgica (166).

4.4. Clasificación botánica y distribución geográfica de las plantas con pólenes alérgicos

Las especies vegetales cuyos pólenes tienen capacidad alérgica son las gramíneas, los árboles y las malezas. Sus pólenes son anemófilos, es decir distribuidos por el viento, por lo general ya que los pólenes entomófilos o diseminados por insectos, raramente causan reacciones alérgicas, aunque existen excepciones como el polen de las plantas compuestas o asteráceas. Los pólenes implicados en la patología alérgica respiratoria varían de una región a otra. Las gramíneas tienen una distribución mundial y son las más abundantes. En Europa podemos distinguir

4 áreas en cuanto a la distribución diferencial de pólenes alergénicos: la zona del ártico a la que pertenecen los países del norte y en la que se encuentra frecuentemente alergia al abedul y a polen de gramíneas. Las costas mediterráneas con polen de olivo, ciprés, gramíneas y parietaria, y el este de Europa donde es frecuente la artemisia, gramíneas, abedul y ambrosía (167). La sensibilización a abedul también aparece en países del centro de Europa junto a la alergia a polen de gramíneas, de predominio estas últimas en las zonas montañosas.

Los pólenes más importantes causantes de alergia en España son el polen de ciprés que poliniza de enero a marzo, el polen de abedul en el mes de abril y que es prácticamente exclusivo de Galicia, el polen de *Platanus hispanica* que poliniza de marzo a abril, los pólenes de gramíneas y de olivo que polinizan de abril a junio, el polen de *Parietaria judaica* que está presente de febrero a octubre, y el de quenopodio de julio a septiembre (168). En España los pacientes alérgicos que viven en áreas donde predominan las gramíneas están habitualmente monosensibilizados como ocurre en la costa atlántica del noroeste donde el 80% están sensibilizados exclusivamente a polen de gramíneas. En cambio, en el área mediterránea los pacientes están

principalmente sensibilizados a diversos pólenes. Esta polisensibilización comprende tanto alérgenos mayores como panalérgeno (169).

4.4.1. Pólenes de gramíneas

Las gramíneas son una extensa familia con más de 600 géneros y aproximadamente 10.000 especies repartidas por todo el mundo, de las cuales más de 400 plantas anemófilas se encuentran en Europa (170). Estas plantas suponen un 25-35% de la vegetación terrestre (171). Sus granos de polen son producidos por gramíneas tanto cultivadas como silvestres. Aunque únicamente unas pocas especies constituyen una fuente alérgica, globalmente las gramíneas son la causa más importante de polinosis en Europa y en el mundo (172), debido a la alergenidad de sus pólenes, a la abundancia de los mismos y a su extensa distribución vegetal. Sus pólenes se liberan fundamentalmente en los meses de abril a agosto en el área mediterránea si bien se ha detectado polen en otros meses del año. Pertenecen a la clase Liliopsida, orden *Poales*, familia *Poaceae* (173). La subfamilia de gramíneas silvestres *Pooideae* (*Phleum pratense*-hierba timotea, *Dactylis glomerata*-dáctilo, *Lolium perenne*-ballico, *Trisetum paniceum*-trisetos, *Festuca*

pratensis-cañuela, *Poa pratensis*-poa, *Anthoxanthum odoratum*-grama de olor, *Holcus lanatus*-holco, *Agrostis capillaris*-agróstide y *Alopecurus pratensis*-alopeкуро) contiene la mayoría de los géneros importantes que pueden producir polinosis. Los miembros de esta subfamilia presentan una alta homología y reactividad cruzada entre ellos, por lo que el estudio de un género es suficiente para diagnosticar y tratar a todos los pacientes. Dentro de la subfamilia Pooideae tenemos algunas gramíneas cultivadas como *Hordeum vulgare*-cebada, *Secale cereale*-centeno y *Triticum aestivum*-trigo. La subfamilia *Chloridoideae* (*Cynodon dactylon*-grama mayor), correspondiente a gramíneas subtropicales, tiene alérgenos propios y es preciso incluirlo en los estudios de gramíneas en las áreas en que es prevalente (174). En la tabla 6 se recoge la familia *Poaceae* de polen de gramíneas. Las gramíneas subtropicales son filogenéticamente y ecológicamente distintas de las gramíneas de zonas templadas pero su distribución ha aumentado con el proceso de calentamiento global de la Tierra (175).

Subfamilia	Tribu	Especie	Nom.
Pooideae	<i>Poeae</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Phl p</i>
		<i>Lolium perenne</i>	<i>Lol p</i>
		<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Dac g</i>
		<i>Poa pratensis</i>	<i>Poa p</i>
		<i>Festuca pratensis</i>	<i>Fes p</i>
		<i>Anthoxanthum odoratum</i>	<i>Ant o</i>
		<i>Holcus lanatus</i>	<i>Hol l</i>
		<i>Agrostis capillaris</i>	<i>Agr c</i>
	<i>Triticeae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Hor v</i>
		<i>Secale Cereale</i>	<i>Sec c</i>
		<i>Triticum aestivum</i>	<i>Tri a</i>
Chloridoideae	<i>Cynodonteae</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Cyn d</i>

Tabla 6. Familia *Poaceae* de gramíneas

Se ha estandarizado el contenido alergénico de los extractos de gramíneas de las zonas templadas del planeta (176) para su uso en inmunoterapia específica. En cuanto a los pólenes de gramíneas subtropicales únicamente se han estandarizado los extractos de *Cynodon dactylon* (177).

Los alérgenos identificados en una especie de gramíneas tienen homólogos en otras especies y presentan todos ellos propiedades fisicoquímicas e inmunológicas similares. En base a ello se han clasificado los alérgenos procedentes de diferentes especies pero con propiedades similares en distintos

grupos. Actualmente se han identificado y se han descrito 11 grupos de alérgenos (178) en polen de gramíneas.

La presencia de anticuerpos IgE específicos en el suero de un paciente alérgico frente a los alérgenos recombinantes rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y/o rPhl p 6 se considera biomarcador de sensibilización genuina a polen de gramíneas (179, 180), es decir, que estos alérgenos no tienen reactividad cruzada con alérgenos de otras especies que no sean gramíneas. Los alérgenos mayores corresponden a los alérgenos de los grupos 1 y 5 de las distintas especies de gramíneas de la familia *Poaceae* (por ejemplo Phl p 1 y Phl p 5 de *Phleum pratense*). Además, el polen de gramíneas contiene alérgenos menores responsables de reactividad cruzada con otros polenes como son Phl p12 (profilina) y Phl p 7 (polcalcina) (181).

Phl p 1 pertenece al grupo 1 de los alérgenos de polen de gramíneas. Los alérgenos del grupo 1 son glicoproteínas ácidas de 31-35 kDa presente en todas las especies de la familia *Poaceae*. Pertenecen a una subfamilia de proteínas estructuralmente relacionadas entre sí denominadas beta-expansinas. Más del 90-95% de los pacientes alérgicos a polen de gramíneas tienen anticuerpos IgE específicos frente al grupo 1 de

alérgenos de polen de gramíneas. Phl p 1 y Cyn d 1 presentan reactividad cruzada aunque baja, ya que Phl p 1 no es específica de la subfamilia *Pooideae* y presenta reactividad cruzada con las gramíneas de otras subfamilias como *Chloridoideae* a la que pertenece *Cynodon Dactylon* (182).

Phl p 5 es un alérgeno mayor de polen de hierba timotea con un peso molecular de 27-35 kDa. Entre un 65-90% de pacientes alérgicos a polen de gramíneas en las zonas templadas del planeta están sensibilizados frente al grupo 5 de alérgenos de polen de gramíneas. Se considera marcador específico de sensibilización a los pólenes de la subfamilia *Pooideae* con escasa reactividad cruzada con gramíneas de otras subfamilias.

Otros dos biomarcadores específicos de la subfamilia *Pooideae* son la presencia de IgE específica frente a Phl p 2 y frente a Phl p 6. Los alérgenos del grupo 2 son proteínas ácidas a las cuales están sensibilizados el 35-50% de los pacientes alérgicos a polen de gramíneas. Los alérgenos del grupo 6 se han detectado únicamente en hierba timotea (*Phleum pratense*) (183). En cambio, la detección en un paciente de IgE específica de Cyn d 1 es un biomarcador específico de sensibilización a la subfamilia *Chloridoideae* (184). Cyn

d 1 es el alérgeno mayor y más abundante en el polen de *Cynodon* y el 76%-100% de pacientes alérgicos a *Cynodon* tienen IgE específica frente a él. Pertenece al grupo 1 de alérgenos de gramíneas con alta reactividad cruzada con los alérgenos del grupo 1 de otras especies de la subfamilia *Chloridoideae*.

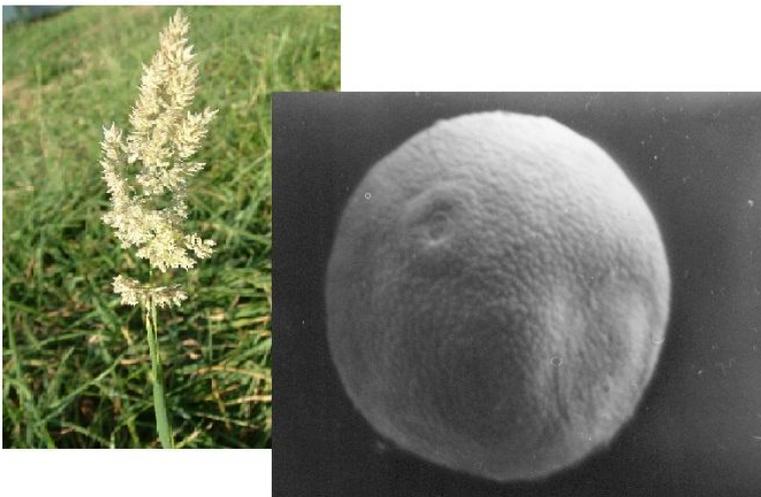


Figura 17. Gramíneas silvestres.

Son pocos los árboles anemófilos que producen polen alérgico. Entre sus especies hay una clara relación filogenia-reactividad cruzada debido a la presencia de alérgenos homólogos. Cuanto más cercana es la relación filogenética mayor suele ser la similitud entre dichas moléculas. Los árboles pueden ser plantas gimnospermas y angiospermas. Las gimnospermas se componen de dos órdenes: coniferales y ginkgoales.

Cabe destacar las familias *Cupressaceae/Taxodiaceae*, a la que pertenecen el ciprés, el cedro y el enebro, y la familia *Pinaceae*, uno de cuyos miembros es el pino, pertenecientes al orden Coniferales. Dentro de las *Cupressaceae*, el polen del género *Cupressus* (ciprés) es una causa importante del aumento de polinosis en los países mediterráneos (185), como consecuencia de su utilización en reforestación y como barrera de sonido y viento en jardines y parques. Las especies más comunes son *C. sempervirens* y *C. arizonica*. Su polinización, con una variabilidad de hasta un mes, se produce en los meses de febrero y marzo fundamentalmente (170) aunque puede extenderse de octubre a abril. El alérgeno mayor de *Cupressus arizonica* es Cup a 1, una glicoproteína de 43 kDa (186). El pino por lo general tiene escasa relevancia clínica excepto en zonas donde su presencia es importante.

Entre las angiospermas, o plantas con flores, existe un grupo de familias muy relacionadas entre sí del orden *fagales*: las *Betulaceae* (*Betula verrucosa*-abedul, *Alnus glutinosa*-aliso), *Corylaceae* (*Corylus avellana*-avellano) y *Fagaceae* (*Quercus robur*-roble y *Quercus castanea*-castaño), que poseen una distribución común en el Norte y Centro de Europa, Noroeste de África,

ciertas zonas de Australia, este de Asia y desde Norteamérica a los Andes estando su presencia muy localizada en España, en la zona norte, sobre todo en Galicia. De estas, la especie más alergénica es el abedul, siguiéndole en importancia el aliso, el avellano, el castaño y el roble.

La polinización de abedul se produce desde el inicio de marzo hasta mayo, mientras que la del castaño se produce en junio y julio. Bet v 1 de 17 kDa es el alérgeno mayor del polen de abedul y pertenece al grupo 10 de las proteínas PR (pathogenesis-related proteins) también conocido como Bet v 1-*like*. Se considera un sensibilizador aéreo primario que genera una alergia alimentaria secundaria dando lugar al *Síndrome polen-frutas* (130). Bet v 2, de 14 kDa, es un alérgeno menor identificado como una profilina (187), y Bet v 4, de 9,3 kDa, es una proteína ligadora de calcio, de la clase de las polcalcinas, con reactividad cruzada con polcalcinas de otros pólenes como Cyn d7 (cynodon), Phl p 7 (hierba timotea), Ole e 3 (olivo) y Aln g 4 (aliso) (188). El alérgeno mayor de *Quercus alba* (roble blanco) Que a 1 pertenece al grupo Bet v 1-*like* así como Aln g 1, alérgeno mayor del aliso. El avellano tiene además la profilina Cor a 2, y Cor a 8 que es una

proteína transferidora de lípidos (LTP). Igualmente, el castaño tiene un alérgeno LTP (Cas s 8).

Del orden *scrophulariales*, las especies de la familia *Oleaceae* (olivo, fresno, aligustre y lilo) constituyen una fuente alérgica importante, sobre todo el olivo (*Olea europaea*), considerado una de las principales causas de alergia respiratoria, tanto rinoconjuntivitis como asma, en el área mediterránea (47) con polinización en los meses de mayo a junio. Su alérgeno mayor, Ole e 1, es una proteína ácida de 17-19 kDa que además es la proteína más abundante en los extractos de polen de olivo (164). Hasta un 80% de los pacientes alérgicos a polen de olivo tienen IgE específica frente a Ole e 1 (189). Otros alérgenos son Ole e 2 (profilina), Ole e 3 (polcalcina), Ole e 7 (LTP) y Ole e 9 (β -glucanasa) (190). Ole e 2 presenta similitudes con pólenes de otras fuentes como abedul, gramíneas y fresno (191). La prevalencia de este alérgeno se ha estimado entre 24-27% en pacientes alérgicos a olivo (192). Ole e 3 es una polcalcina de peso molecular 9.3 kDa con una prevalencia de 20-50% en pacientes alérgicos a polen de olivo (193). Ole e 7 tiene similitudes con las proteínas LTP de plantas (194). Su prevalencia se ha estimado en un 47% entre los pacientes alérgicos a polen de olivo (195) y se ha relacionado con un mayor

riesgo de presentar anafilaxia por alimentos. Ole e 9 es un alérgeno de alto peso molecular (46.4 kDa) correspondiente a una proteínas glicosilada β -1,3-glucanasa perteneciente al grupo 2 de las *pathogenesis-related proteins* (PR-2) (196). Su prevalencia oscila entre 10 y 65% en pacientes con polinosis por olivo (197).

Otras oleáceas como fresno (*Fraxinus excelsior*) y Aligustre (*Ligustrum vulgare*) raramente producen síntomas respiratorios alérgicos (198, 199), aunque hay que tenerlos en cuenta cuando un paciente alérgico a polen de olea en el área mediterránea viaja a países del norte de Europa (200).

Otra especie de importancia en España es *Platanus acerifolia* de la familia *Platanaceae*(13), que en Madrid puede alcanzar una prevalencia de sensibilización del 56% (201). Su época de polinización, finales de marzo-inicio de abril, es corta pero intensa. Igualmente, de poca duración e intensa, es la sintomatología que produce. Tiene dos alérgenos mayores, Pla a 1 y Pla a 2, de 18 y 43 kDa respectivamente. Además, se identificado como Pla a 3 una proteína LTP.



Figura 18. Abedul.

4.4.2. Pólenes de malezas

Las malezas más importantes desde un punto de vista alérgico son las familias *Asteraceae* o *Compositae* (ambrosía, artemisia), *Amaranthaceae* (quenopodio y salsola), *Urticaceae* (*Parietaria judaica*), *Euphorbiaceae* (*Mercurialis*) y *Plantaginaceae* (*Plantago*). Su época de polinización es distinta. Así, el quenopodio y la salsola suelen polinizar en verano (202) mientras que el período de polinización del polen de parietaria es más amplio (de febrero a octubre), dando lugar a síntomas de forma multiepisódica.

La familia *Asteraceae* o *Compositae* es una de las más grandes de las plantas gimnospermas, con 1100 géneros y 20000 especies, pero solamente un pequeño porcentaje de ellas tiene importancia alérgica (203). La detección de artemisia dependerá tanto de la especie estudiada como de la región donde se realicen las mediciones siendo lo habitual la presencia en Europa de *Artemisia vulgaris* y *Artemisia campestris* en los meses de agosto y septiembre, y, en la región de Murcia además, de *Artemisia barrelieri* de noviembre a febrero (204). *Artemisia vulgaris* produce síntomas alérgicos en el 10-14% de pacientes con polinosis en Europa (205). Los pacientes alérgicos a Artemisia frecuentemente presentan reacciones alérgicas con alimentos y especias como consecuencia de reactividad cruzada (127). Hasta un 95% de los pacientes alérgicos a artemisia están sensibilizados frente a Art v 1, el alérgeno mayor de este polen y marcador de sensibilización genuina al mismo (206). Art v 3 pertenece a la familia de las LTP englobadas dentro de las proteínas PR-14. La prevalencia de sensibilización a este alérgeno entre los alérgicos a artemisia es del 70% (207). Art v 4 es una profilina presente en el 34-36% de los pacientes alérgicos a artemisia (208). Por último, entre los alérgenos más

relevantes de artemisia se encuentra Art v 6 que presenta cierta homología estructural con Amb a 1 de ambrosía (209).

La familia *Amaranthaceae* está compuesta de alrededor de 180 géneros y 2500 especies. En España, comprende fundamentalmente dos malezas alergénicas: *Chenopodium album* y *Salsola kali* (210). Son malezas ampliamente distribuidas por las zonas templadas del sur de Europa y el oeste de Estados Unidos que florecen entre Junio y Octubre. Che a 1, una glicoproteína de 17 kDa, es el alérgeno mayor de *Chenopodium album* que es reconocido por el 71% de los pacientes alérgicos a esta maleza (211). Además presenta una identidad estructural del 30% con Ole e 1 por lo que se engloba dentro de las proteínas homólogas a Ole e 1 (*Ole e 1-like*) (211). Che a 2 es una profilina de 14-16 kDa y Che a 3 es una polcalcina de 10 kDa (212). En cuanto a *Salsola kali*, aparece en las costas de Europa, Norte de África, Estados Unidos y Australia, en zonas semidesiertas. El alérgeno mayor es Sal k 1, una proteína de 43 kDa (213), Sal k 4 es una profilina, y Sal k 5 es otra proteína perteneciente al grupo *Ole e 1-like*. A diferencia de los pacientes sensibilizados a *Chenopodium álbum*, la mayoría de

los cuales están polisensibilizados, la monosensibilización a *Salsola kali* es más común (214). Dentro de la familia *Urticaceae* el polen de parietaria, conocido como hierba de muro, es uno de los pólenes alergénicos más importantes en el área mediterránea y hasta el 50% de los pacientes monosensibilizados a este polen presentan síntomas de asma junto con la rinoconjuntivitis (215). Los extractos de polen de *Parietaria judaica* y *Parietaria officinalis* presentan un alto grado de homología entre sí. Mientras que *Parietaria judaica* crece fundamentalmente en el área mediterránea de Europa, Asia y África, *Parietaria officinalis* lo hace en el norte de Italia, centro de Francia y en Europa Central y del Este (216). Los alérgenos mayores de *Parietaria judaica* son Par j 1 y Par j 2 con una homología del 45% (217). Ambas pertenecen a la familia de las proteínas transferidoras de lípidos no específicas (nsLTP). Par j 2 tiene un peso molecular de 11,3 kDa, reconocida por el 82% de los pacientes alérgicos a este polen mientras que Par j 1 tiene un peso molecular de 10 kDa y es reconocida por el 95% de los pacientes alérgicos a polen de parietaria (218, 219). Se ha establecido Par j 2 como marcador diagnóstico genuino de paciente sensibilizado a *Parietaria judaica* y candidato a inmunoterapia con

extracto de este polen (220). De menor importancia son Par j 3 que pertenece a la familia de las profilinas y Par j 4 que es una polcalcina.



Figura 19. Parietaria judaica.

De la familia *Plantaginaceae*, el género *Plantago* comprende 250 especies. Crece en humedales y bordes de caminos rurales, polinizando de mayo a octubre. Es una causa importante de polinosis en las zonas templadas de Norteamérica, Australia y Europa. Aunque un 20-40% de pacientes con polinosis presentan sensibilización a *Plantago lanceolata*, este polen no se ha tenido en cuenta debido a que es rara la monosensibilización al mismo y frecuentemente existe

reactividad cruzada con el grupo 5 de gramíneas. Pla a 1 es el alérgeno mayor de *Plantago lanceolata* y pertenece a las proteínas Ole e 1-like (221). Existe en forma glicosilada y no-glicosilada, de 17 y 20 kDa respectivamente.

4.4.3. Características del árbol de la morera

La morera *Morus alba* es un árbol perteneciente al género *Morus*, familia *moraceae*, orden rosales, clase *Magnolopsida*, división *Magnoliophyta*. El género morus en nuestra región de estudio consta únicamente de dos especies, ninguna de ellas autóctona, *Morus alba*, originaria de centro y este de Asia (China, Manchuria, Corea) y *Morus nigra* originaria del Sudoeste de Asia (222). Las moreras, en la actualidad, se emplean profusamente como árboles ornamentales, no obstante se introdujeron como un cultivo, ya que las hojas de estas especies son la base de la alimentación del gusano de seda, sobre todo *M. alba*. El abandono de este tipo de actividad ha llevado a que en la actualidad las encontremos en determinadas zonas como plantas subespontáneas.

De rápido crecimiento cuando son jóvenes, pero más lento a medida que alcanzan la madurez, las moreras no suelen sobrepasar los 12-15 metros midiendo

habitualmente de 8 a 10 metros de altura. La corteza es pardo-blanquecina y resquebrajada longitudinalmente en los ejemplares añosos (223). La copa es densa y muy ramificada. Las hojas son caducas, largamente pecioladas y ovaladas con margen dentado y cordadas en base (Figura 20).



Figura 20. Hoja de *Morus alba*.

Las flores del árbol de la morera son dioicas y se encuentran en número muy reducido, y agrupadas en inflorescencias glomerulares, densas y ovoides. Tienen perianto con cuatro tépalos, cuatro estambres en las masculinas y un ovario súpero con dos estigmas en las femeninas. El fruto es una infrutescencia globosa de tipo sorosis denominada mora, que en el caso de *M. alba* suele ser blanquecina o rosada.

El nombre genérico *Morus* fue dado por los romanos, y deriva del griego *Moron*, derivado a su vez del celta *Mor*, que significa negro, en alusión quizás al color de los frutos de las moreras. El específico *alba* (blanco), hace referencia al color característico de los frutos de esta especie. Como hemos comentado, tanto el árbol como la seda proceden de Asia y eran desconocidos en Occidente hasta que, en el siglo VI, los monjes nestorianos establecieron la ruta de la seda. Aparte de su uso como árboles de cultivo se utilizan como ornamentales en jardines, paseos y calles. Soportan bien la sequía, el frío y las atmósferas contaminadas.



Figura 21. *Morus alba*.

La época de floración de estos árboles comienza a finales de febrero y se prolonga hasta principios de abril, siendo la primera quincena de marzo el momento en el cual se recogen las mayores cantidades. El contenido de polen de *Morus* en la atmósfera varía con los años, ya que estos árboles suelen podarse para que no produzcan flores, que se transformarían en

frutos y podrían manchar posteriormente las calles (224).

El registro de este polen, mediante captador volumétrico tipo Hirst modelo *Burkard seven day volumetric spore-trap*, con una media anual de 600 granos, constituye aproximadamente el 2% del total de registros anuales en la ciudad de Valencia. La concentración polínica disminuye rápidamente conforme nos alejamos de los árboles productores. En las figuras 23 a 27 se expresan los niveles anuales y el promedio de polen de *Morus alba* de los últimos años obtenidos mediante un captador situado en la ciudad de Valencia según datos facilitados por AVAIC (Asociación Valenciana de Alergología e Inmunología Clínica).

El polen de *Morus alba* presenta las siguientes características:

- a. Forma: esferoidal.
- b. Polaridad: isopolar.
- c. Tamaño: 16-28 μm .
- d. Aberturas: bizonoporado, raramente trizonoporado. Los poros alcanzan 4 μm de diámetro con opérculos de 2 μm .

- e. Exina: fina (inferior a $1\ \mu\text{m}$, de superficie ligeramente granular.
- f. Intina: gruesa con uncus grandes.

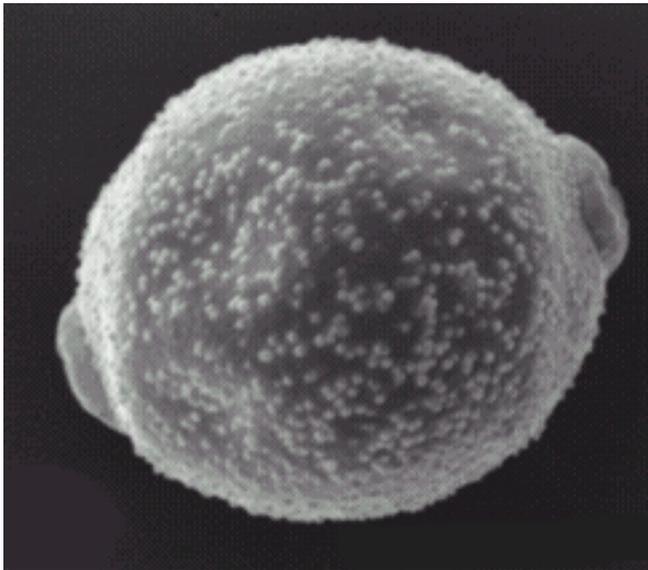


Figura 22. Grano de polen de *Morus alba*.

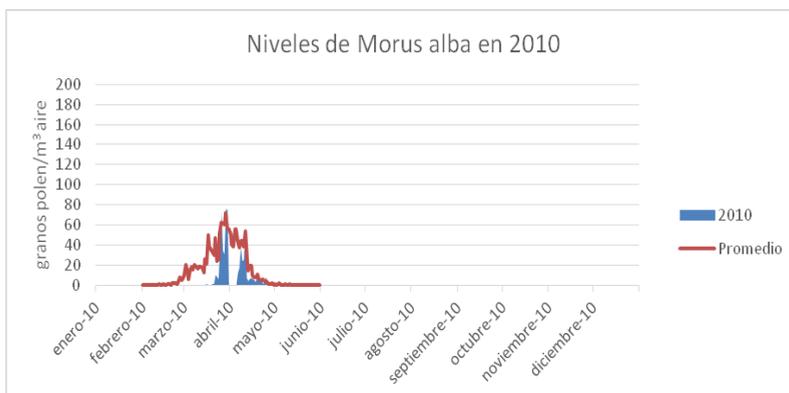


Figura 23. Niveles de polen de *Morus alba* en el año 2010. Fuente: AVAIC.

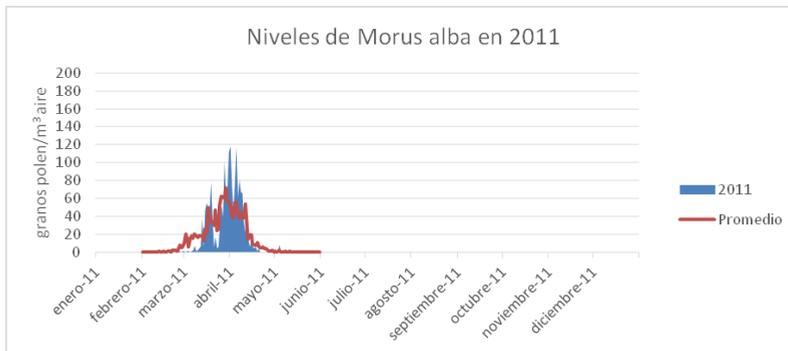


Figura 24. Niveles de polen de Morus alba en el año 2011. Fuente: AVAIC.



Figura 25. Niveles de polen de Morus alba en el año 2012. Fuente: AVAIC.

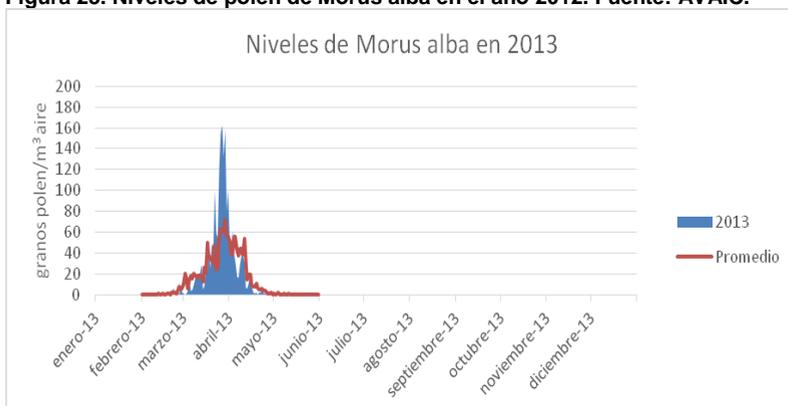


Figura 26. Niveles de polen de Morus alba en el año 2013. Fuente: AVAIC.

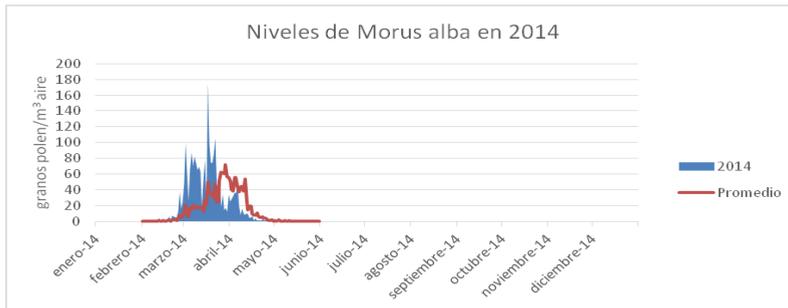


Figura 27. Niveles de polen de Morus alba en el año 2014. Fuente: AVAIC.

A pesar de la presencia de este polen en el aire de la ciudad de Valencia detectado mediante un captador de pólenes y de la existencia de pacientes sensibilizados que presentan *prick test* positivo y/o IgE específica sérica a polen de morera (*Morus alba*) se desconoce la relevancia clínica de dichas sensibilizaciones actualmente. En estos pacientes coexisten por lo general sensibilizaciones a otros pólenes desconociéndose si se deben a reactividad cruzada entre polen de morera y el resto de pólenes, o si son cosensibilizaciones. Es conocida la reactividad cruzada entre las diferentes especies *Morus*, incluso entre la familia de las moráceas incluyendo la morera del papel (*Broussonetia papyrifera*), el árbol del pan (*Artocarpus altilis*), *Ficus spp* (por ejemplo *Ficus elástica*), y el árbol del jack (*Artocarpus heterophyllus*) (225).

Hasta la fecha se han descrito dos alérgenos de *Morus alba*: Mor a4 (profilina) y Mor 17 kDa (Bet v 1-like). Dado que en nuestra región no se detecta polen de abedul (*Betula verrucosa*), ni por lo tanto su alérgeno mayor Bet v 1, la reactividad cruzada podría deberse a sensibilización a profilina y/u otros alérgenos aún no descritos.

5. Hipótesis y objetivos

El polen de *Morus alba* se encuentra en la atmósfera de nuestra área geográfica, como demuestra su presencia en los captadores de polen de la Comunidad Valenciana, sin embargo no existen estudios acerca de la sensibilización y relevancia clínica de este polen en nuestro medio, por lo que la posible existencia de alergia al polen de la morera pasaría desapercibida. Actualmente han sido descritas únicamente dos proteínas alergénicas en polen de *Morus alba* y ambas son panalérgenos -alérgenos compartidos con otros pólenes.

Teniendo en cuenta estos hechos se plantea la hipótesis de que el polen de la morera está implicado en la sintomatología de los pacientes alérgicos a pólenes y además puede presentar reactividad cruzada con otros pólenes de la región de estudio.

El objetivo general del presente estudio es investigar la relevancia clínica de la sensibilización a polen de morera, y comprobar la existencia de reactividad cruzada del polen de morera con otros pólenes.

Para cumplir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Confirmar la presencia de pacientes sensibilizados a polen de morera en nuestra área de estudio mediante la prueba cutánea de *prick test*.
- 2) Determinar la presencia de una respuesta positiva en la prueba de provocación conjuntival en pacientes sensibilizados a polen de morera mediante prueba cutánea con *prick test*.
- 3) Realizar inmunodetección de proteínas utilizando sueros de pacientes sensibilizados a polen de morera y extracto de polen de *Morus alba*.
- 4) Verificar la existencia de reactividad cruzada entre polen de *Morus alba* y otros pólenes de nuestra área de estudio.
- 5) Identificar, si fuese el caso, nuevas proteínas alergénicas no caracterizadas a fecha del estudio mediante espectrometría de masas.

6. Plan de trabajo

En nuestro trabajo se estudiarán pacientes que acuden a una consulta de alergia por presentar clínica rinoconjuntival. Se consideran criterios de exclusión tener menos de 18 años, no firmar el consentimiento informado, estar en tratamiento con inmunoterapia específica, tener patología ocular y/o sufrir alguna patología o llevar tratamiento, que contraindique el uso de adrenalina. Se determinará en estos pacientes la presencia de sensibilización a polen de morera (*Morus alba*) y otros aeroalérgenos. Para determinar la sensibilización cutánea se realizarán pruebas alérgicas mediante *prick test*, prueba cutánea mediante punción con una lanceta a través de una gota de extracto de alérgeno, con una batería estándar de alérgenos así como la medición de IgE específica sérica de polen de morera mediante fluoroenzimoinmunoanálisis. Se realizará una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) del extracto de polen de morera utilizado para las pruebas de *prick test* para detectar las proteínas que contiene el extracto de polen de morera.

Con las muestras séricas de los pacientes sensibilizados a polen de morera se llevará a cabo una

técnica de inmunotransferencia mediante *western-blotting* con las proteínas detectadas en el SDS-PAGE para determinar las proteínas alergénicas del extracto de polen de morera. Finalmente, se hará una técnica de *western-blotting inhibición* con el polen de morera y otras proteínas alergénicas, si las hubiere, a las que se encuentren sensibilizados los pacientes, para determinar la presencia de reactividad cruzada entre ellos. En el caso de detectar proteínas alergénicas no identificadas, se procederá a su identificación mediante espectrometría de masas.

Con este planteamiento pretendemos alcanzar los objetivos descritos anteriormente.

MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Pacientes

El estudio se realizó sobre una muestra poblacional de individuos que residían cerca de Aldaia, pueblo situado en la zona oeste del área metropolitana de Valencia. Los pacientes estudiados fueron incluidos prospectiva y consecutivamente a medida que eran visitados en la Consulta de Alergología de un centro clínico situado en Aldaia, por presentar síntomas de rinitis y conjuntivitis, durante el período comprendido entre el 16 de mayo del 2011 y el 20 de diciembre del 2014. Los criterios de inclusión fueron:

- Tener más de 18 años de edad.
- Presentar síntomas de rinitis y conjuntivitis.
- Haber firmado el consentimiento informado para participar en el presente estudio.

Se consideraron criterios de exclusión:

- Estar en tratamiento con inmunoterapia específica.
- Tener patología ocular.
- Padecer alguna patología o llevar tratamiento, que contraindique el uso de adrenalina.

Para comprobar que el extracto de polen de *Morus alba* no producía ninguna reacción inespecífica, se realizó pruebas cutáneas mediante *prick* test y prueba de provocación conjuntival en 5 personas no atópicas.

1.2. Aparatos

- Balanza de precisión (Gram Precision SV-3100i, Barcelona, España).
- Vitrina extractora de gases (Burdinola V21-space ST 1500, Amoroto, España).
- Agitador magnético (Selecta, AgimaticE, Barcelona, España).
- Centrífuga (Sigma 4K15, St Louis, EEUU).
- Espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpec™ 3000, Hercules, EEUU).
- Centrífuga (Nahita 2600, Beriain, España).
- Embudo Buchner de placa filtrante.

- Kit Sistema UniCAP (Phadia, Uppsala, Suecia).
- Fuente de alimentación para electroforesis (Consort EV231, Turnhout, Belgium).
- Equipo de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, EEUU).
- Software analizador de imagen (GS-710 Bio-Rad, Hercules, EEUU).
- Analizador para Western Blot (Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System, Hercules, EEUU).
- Digestor automatico de proteínas (Ettan Digester GE Healthcare, Milwaukee, EEUU).
- Equipo de concentrador de vacío (Speedvac Thermo Scientific, Waltham, EEUU).
- Placa de espectrómetro (384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI, Applied Biosystems, Foster City, EEUU).
- Espectrómetro de masas (4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, EEUU).
- Programa informático para análisis de datos de masas (4000 Series Explorer version 3.5.3., Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

- Paquete informático GPS Explorer Software v. 3.6. (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).
- Software buscador en bases de datos (Mascot v.2.2., Matrix Science, Londres, Reino Unido).
- Material para punción y extracción sanguínea.
- Lancetas de metal (Stallergenes, Anthony, Francia).
- Discos de celulosa (Hycor Biomedical, Kassel, Alemania).
- Sistema de agua Milli-Q (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Extractor Soxhlet (Quickfit, St Louis, EEUU).
- Software estadístico (SPSS Inc, Chicago, EEUU).

1.3. Reactivos y material fungible

- Polen de morera (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Profilina de polen de *Olea europaea* (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).

- Profilina de polen de *Artemisia vulgaris* (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Profilina de polen de *Phoenix dactilifera* (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Alérgeno Pru p 3 (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Tampón fosfato: fosfato monosódico 10 mM; fosfato disódico 40 mM; NaCl 65 mM; pH 7,5.
- Éter dietílico (Merck).
- Cartucho de extracción de celulosa (Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido).
- Membrana Visking de 7.000 Da (Medicell).
- Seroalbúmina bovina (BSA) (Merck).
- Reactivo Bradford para determinación de proteínas (Bio-Rad).
- Alcohol de 70° (Aposan).
- Extractos para pruebas cutáneas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitelio de perro, epitelio de gato, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Olea europaea*, mezcla de gramíneas, *Platanus acerifolia*, *Parietaria judaica*, *Cupressus arizonica*,

Plantago lanceolata y *Pinus pinea*.

(Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).

- Clorhidrato de histamina 10 mg/ml.
(Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Suero fisiológico al 0.9% (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España).
- Bromuro de cianógeno (BrCN, Sigma).
- Discos de papel Whatman nº 52 (Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido).
- NaOH 1 M (Merck).
- NaHCO₃ 0,005 mM (Merck).
- Agua ultrapura (Merck).
- Tampón acetato: ácido acético 3,0 g/l, acetato sódico 4,1 g/l 1 M pH 4,5 (Merck).
- Tampón de incubación: NaCl 9,0 g/l; Na₂HPO₄·2H₂O 7,2 g/l; NaH₂PO₄·H₂O 1,3 g/l, albúmina humana 20% (p/v); 5 ml, azida sódica 0,5 g/l (Merck).
- Acetona (Panreac).
- Kit de inmunoensayo (Hytec, Hycor Biomedical Inc.; Irvine, California, EEUU).
- Solución de lavado (NaCl 9 g/l; Triton X-100 0,2% (v/v); azida sódica 0,2 g/l (Merck).
- *p*-nitrofenil fosfato (Merck).
- Solución de parada (NaOH 1M) (Merck).

- Tampón de muestra: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (Merck); glicerol 10% (v/v) (Merck); azul de bromofenol 0,0125% (p/v) (Fluka); β -mercaptoetanol 5% (v/v) (Merck).
- Tampón de electroforesis pH 8,7-8,8: Tris base 0,025 M (Merck); glicina 0,19 M (Merck); SDS 0,1% (p/v) (Bio-Rad).
- Patrón de masas moleculares (Low Molecular Weight Marker, GE Healthcare, Amersham, Reino Unido).
- Solución acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1 (Bio-Rad).
- Persulfato amónico (22,5% p/v) y TEMED (0,2% v/v) (Bio-Rad).
- Azul de Coomassie R-250, 1 g/litro de solución de colorante (Thermo Scientific).
- Metanol/acético/agua destilada 4:1:5 (v/v/v) (Scharlau).
- Ácido acético al 7% (v/v) (Scharlau).
- Solución acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1 (Bio-Rad).
- Solución de acrilamida del 4% (p/v) (Bio-Rad).
- Tampón de transferencia (sistema de tampón continuo): glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM,

SDS 0,0375% (p/v), metanol 20% (v/v) (Bio-Rad).

- Colorante Negro Amido: negro Amido 10B 0,5% (p/v) en metanol 45% (v/v), acético 10% (v/v) y agua destilada 45% (v/v) (Bio-Rad).
- Membrana inmovilizante (Hybond-P, PVDF, difluoruro de polivinilideno, GE Healthcare, Amersham, Reino Unido).
- Tampón de lavado (TL): PBS-Tween 0,1 % (fosfato monosódico 19 mM; fosfato disódico 81 mM; NaCl 100 mM pH 7,5; Tween 0,1%) (Bio-Rad).
- Tampón de bloqueo: leche de vaca desnatada al 5% en TL (Millac).
- Anticuerpo monoclonal IgG de ratón Anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (Southern Biotech).
- Kit ECL Prime (GE Healthcare. Amersham, Reino Unido).
- Solución de revelado Kodak GBX Developer (Kodak, Rochester, EEUU).
- Solución de fijado Kodak GBX Fixer and Replenisher (Kodak, Rochester, EEUU)
- Bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50% (Merck).

- Acetonitrilo 70% (Merck).
- Suero de conejo anti-profilina (Sigma-Aldrich).
- Par j1 y Par j2 recombinantes (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España)
- Pru p 3 natural (Laboratorio BIAL-Aristegui, Bilbao, España)
- Tripsina porcina modificada (Promega).
- Acetonitrilo 60% (Merck).
- Ác. Fórmico 0.1% (Merck).
- Ácido α -diano-4-hidroxicinámico (Sigma).
- Acetonitrilo acuoso 30% (Merck).
- 2-propanol 15% (Merck).
- Ácido trifluoroacético 0.1% (Merck).

2. Métodos

2.1. Obtención de extracto de polen de morera y cuantificación de su contenido proteico

Para la obtención del extracto de polen de morera se pesó el polen y se introdujo en un cartucho de extracción de celulosa. Posteriormente fue desengrasado en dispositivo Soxhlet por arrastre con éter dietílico evaporado y condensado, durante un tiempo mínimo de cuatro horas (226). A continuación fue secado el polen bajo campana extractora a temperatura ambiente, durante un mínimo de 12 horas. Más tarde, fue realizada extracción hidrosoluble en tampón fosfato (15 ml/g polen), por agitación magnética suave (1.000 rpm) durante dos horas a 4°C ajustando el pH a 7,5. Tras centrifugar a 5.000 rpm durante 30 minutos se conservó el sobrenadante a 4°C. Este proceso se repitió de nuevo una vez para optimizar la cantidad de extracto. Tras desechar el sedimento, el total de sobrenadante fue filtrado y dializado en membrana Visking de celulosa de 7.000 Da frente a agua ultrapura durante 48 horas y con un mínimo de tres cambios de agua. Por último, se filtró a través de filtros de 0,22 µm, liofilizado y conservado a -20°C.

El contenido proteico del extracto fue cuantificado mediante el método de Bradford (227) fundamentado en el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm cuando se une a las proteínas. Se preparó una recta patrón utilizando una sustancia cuyo contenido proteico es conocido como es la seroalbúmina bovina (BSA). Se mezclaron 100 μ l de BSA a 1,5 mg/ml con 650 μ l de agua ultrapura dando lugar a una preparación de 200 μ g /ml. Para preparar la recta patrón se utilizaron las diluciones de BSA a 200 μ g/ml utilizando agua ultrapura según aparece en la tabla 7.

μ g/ml proteína	μ g proteína	μ l BSA 200 μ g/ml	Agua ultrapura μ l	Reactivo Bradford μ l
0	0	0	800	200
2,5	2	10	790	200
5	4	20	780	200
10	8	40	760	200
15	12	60	740	200
20	16	80	720	200
25	20	100	700	200

Tabla 7. Concentraciones de la recta patrón para el cálculo de la concentración proteica.

El tubo de la muestra del extracto de polen de *Morus alba* fue preparado mezclando 40 μ l de una muestra

del extracto a 1 mg/ml con 760 μ l de agua ultrapura y 200 μ l reactivo de Bradford. Posteriormente se agitaron bien todos los tubos y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó lectura de absorción a 595 nm en el espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec, representando absorción *versus* concentración proteica.

2.2. Pruebas cutáneas con aeroalérgenos

Para las pruebas cutáneas se utilizaron lancetas de metal (Stallergenes), algodón, alcohol de 70° y un rotulador. El extracto de polen de morera, los extractos de otros aeroalérgenos y los reactivos utilizados como controles positivo y negativo fueron aportados por el Laboratorio Bial-Aristegui. Los extractos de aeroalérgenos utilizados contenían los principales determinantes alérgicos y estaban estandarizados excepto en el caso del polen de morera. Todos ellos se han almacenado siguiendo las normas de caducidad y almacenaje adecuadas (a 4-8°C). Los extractos para las pruebas cutáneas vienen preparados en solución salina fisiológica fenolada al 0,5% y glicerizada al 50%. Las pruebas cutáneas mediante *prick* test se realizaron según la guía práctica de GA²LEN y ARIA (228). Se

comprobó que los pacientes no siguieran ningún tratamiento que interfiriera en la prueba. Los otros extractos de aeroalérgenos testados eran: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitelio de perro, epitelio de gato, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Olea europaea*, mezcla de gramíneas, *Platanus acerifolia*, *Parietaria judaica*, *Cupressus arizonica*, *Plantago lanceolata* y profilina. Como reactivo para el control negativo se utilizó suero salino al 0,9%, y para el control positivo se empleó clorhidrato de histamina a 10 mg/ml. Un resultado positivo en el control negativo indica dermatografismo y anulaba la prueba. Un resultado negativo en el control positivo indica una menor reactividad cutánea a la histamina, lo que también anulaba la prueba. Tras dibujar un punto con rotulador para cada sustancia a testar, con una separación de 3 cm y en dos columnas (Figura 28), utilizando los puntos como referencia, se depositó una gota de extracto de cada aeroalérgeno y ambos controles, positivo y negativo, en la piel sana de la superficie volar de un antebrazo, entre unos 5 cm por encima de la muñeca y unos 3 cm por debajo del codo.



Figura 28. Pruebas cutáneas mediante prick test.

Posteriormente utilizando una lanceta de metal con 1 mm de profundidad y topes laterales para evitar mayor penetración, se puncionó a través de cada gota la piel con un ángulo de 90° con respecto al plano cutáneo. La lectura de la prueba cutánea se realizó a los 15 minutos. Los resultados se compararon con el suero salino (control negativo) considerándose la prueba positiva si tenía un diámetro de pápula mayor o igual a la producida por el control positivo que debía ser de al menos 3 mm.

2.3. Prueba de provocación conjuntival con polen de morera

La prueba de provocación conjuntival se llevó a cabo utilizando el extracto liofilizado de polen de morera referido en el epígrafe 2.1, que no contenía conservantes; el extracto se diluyó inmediatamente antes de su empleo en solución fisiológica salina. La concentración de proteína en el polen de *Morus alba* era del 13% (peso/peso). Tras la preparación de la solución inicial a 5 mg/ml se realizaron diluciones a 1/10, 1/100 y 1/1000.

La prueba se realizó fuera de la época de polinización del polen de morera estando los pacientes asintomáticos y habiendo suspendido con la suficiente antelación los fármacos que podían interferir en la prueba. Se comenzó aplicando una gota de la concentración menor del alérgeno en el fondo de saco conjuntival inferior de un ojo. En el otro ojo, que se empleó como control, se administró una gota de la solución salina. La prueba continuó con la administración de las siguientes dosis cada 15 minutos hasta que se obtuvo una respuesta positiva o hasta que se llegó a la dosis de mayor concentración del alérgeno. Se consideraba una reacción positiva cuando, en ausencia de reacción en el ojo control, el

paciente presentaba en el ojo donde se administraba el alérgeno los siguientes síntomas: picor, lagrimeo, hiperemia y edema conjuntival. En los pacientes en los que la prueba fue positiva, y para atenuar los síntomas, se emplearon antihistamínicos orales (loratadina 10mg) quedando el paciente en observación durante dos horas. Se consideró negativa aquella en la que la conjuntiva no cambiaba de color ni el paciente presentaba ningún tipo de molestia (85).

2.4. Extracción sanguínea y obtención del suero plasmático

Se obtuvieron las muestras de sangre venosa mediante flebotomía convencional. Una vez se había formado el coágulo sanguíneo se centrifugó durante cinco minutos. Mediante una pipeta, se pasó el suero obtenido al tubo seco previamente etiquetado y se conservó en el congelador a -20°C.

2.5. Cuantificación de IgE específica

La medición de IgE específica de polen de *Morus alba* se realizó mediante un enzimoimmunoensayo en fase sólida sobre discos de celulosa (EAST- *Enzyme Allergo Sorbent Test*). Las proteínas del extracto de polen de

M. alba fueron acopladas a discos de celulosa (Hycor Biomedical, Kassel, Alemania) activados con bromuro de cianógeno (BrCN, Sigma) tal y como describen Ceska *et al* (229). Para la activación de los discos de celulosa se emplearon discos de papel Whatman nº 52 (Whatman International Ltd.). Se disolvió BrCN en agua bidestilada (25 g/l) y se añadió solución de BrCN a los discos manteniendo la agitación. Tras llevar el pH a 10,5 con NaOH 1 M, se mantuvo el pH constante durante todo el tiempo de incubación (30 min), mediante adición continua de NaOH 1 M. Posteriormente se lavaron los discos en embudo Buchner de placa filtrante, sucesivamente según se describe en la siguiente tabla:

500 ml de NaHCO ₃ 0,005 mM	12 veces
500 ml de agua ultrapura	2 veces
500 ml acetona 25% (v/v)	2 veces
500 ml acetona 50% (v/v)	2 veces
500 ml acetona 75% (v/v)	2 veces
500 ml acetona 100% (v/v)	2 veces
500 ml acetona 100% (v/v)	2 veces

Tabla 8. Soluciones de lavado de los discos de papel.

A continuación se secaron los discos a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Una vez se ha realizado la activación de los discos de papel con bromuro de cianógeno (BrCN), se procedió al acoplamiento de proteínas de polen a discos de celulosa activados con BrCN utilizando también el método de Ceska *et al.* Para ello se preparó la solución de proteína de polen en NaHCO₃ 0,1 M (10 mg/ml de extracto liofilizado) y se incubó con los discos de papel activados a 4°C con agitación suave, hasta su utilización. Tras lavar con NaHCO₃ 0,1 M (3 veces), se incubaron tres horas a temperatura ambiente y en agitación con 1 ml/disco de etanolamina 0,05 M en NaHCO₃ 0,1 M. Se secaron bien los discos al vacío y se lavaron con NaHCO₃ 0,1 M y con cantidades iguales a las del paso anterior de tampón acetato 0,1 M, pH 4,5 (3 veces). Posteriormente, tras lavar con tampón de incubación (2 veces) se almacenaron los discos a –20°C con una pequeña cantidad del tampón.

El EAST-directo se realizó según método basado en el descrito por Wide *et al* (230), utilizando el Kit Hytec. Por cada suero a ensayar se colocó un disco activado con proteínas antigénicas (disco de antígeno) en un tubo. Para preparar la curva de referencia se utilizaron cinco discos y sueros de referencia que incluye el Kit

Hytec, y se pusieron cada uno en un tubo. Se añadieron 50 μ l de suero de paciente sobre cada disco de antígeno y 50 μ l de cada uno de los sueros de referencia (100 UI/ml, 17,5 UI/ml, 3,5 UI/ml, 0,7 UI/ml, 0,35 UI/ml) sobre cada uno de los discos de referencia. Posteriormente se incubaron 1 h a 37°C. Luego se realizaron lavados 3 veces con la solución de lavado (NaCl 9 g/l; Triton X-100 0,2% (v/v); ácido sódica 0,2 g/l) y finalmente se añadieron 50 μ l de conjugado (IgG de ratón anti-IgE marcada con fosfatasa alcalina) sobre cada uno de los discos. Se taparon los tubos y se incubaron 30 min a 37°C. De nuevo se realizaron lavados 3 veces al igual que en el paso anterior, y se añadieron 200 μ l de solución de desarrollo *p*-nitrofenil fosfato (pNPP). Se colocaron 200 μ l de solución de desarrollo, en un tubo aparte, sin discos ni suero, para realizar los blancos de lectura. Tras tapar los tubos e incubar exactamente dos horas a 37°C, se añadieron a cada tubo 400 μ l de solución de parada (NaOH 1M). Finalmente se leyeron los resultados en un espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec 3000 a 405 nm, ajustando a cero con los blancos de lectura. El color fue estable durante 24 horas. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de IgE específica en la muestra estudiada (Figura 29).

Los resultados se valoran en Unidades Internacionales/ml (UI/ml), en base a la curva de referencia. Dichos valores se dividen en clases como podemos observar en la tabla 9.

UI/ml	Clase	Nivel IgE específica
100	5	Muy alto
17,5	4	Muy alto
3,5	3	Alto
0,7	2	Moderado
0,35	1	Bajo
	0	No detectable

Tabla 9. Clases según nivel de IgE específica sérica



Figura 29. Método EAST para cuantificación de IgE específica.

La medición de IgE específica de profilina (Phl p 12), Par j 2 y polcalcina (Phl p 7) se ha realizado mediante Sistema UniCAP (Phadia, Sweden). Se trata de un fluoroenzimoinmunoensayo, con el alérgeno fijado a fase sólida (disco). La IgG anti-IgE está marcada con la enzima beta-galactosidasa que hidroliza la 4-metilumbeliferil-beta-D-galactosa (solución de desarrollo), liberando el producto fluorescente, la 4-metil-

umbeliferona, de modo que podemos medir la intensidad de la fluorescencia mediante el espectrofotómetro (231). A continuación se resume el procedimiento en la figura 30:

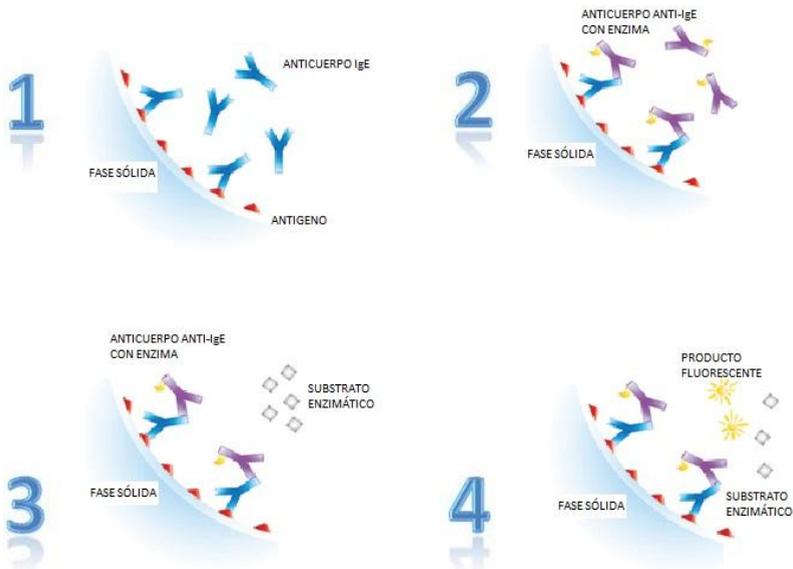


Figura 30. Medición de IgE específica mediante Sistema UniCAP. Fuente: modificado de www.phadia.com. El alérgeno unido a la fase sólida se une con los anticuerpos IgE específicos en suero del paciente (Fig.30-1). Después de eliminar la IgE no unida, se añaden los anticuerpos anti-IgE marcados con una enzima (Fig.30-2). Tras eliminar los anticuerpos anti-IgE no unidos, se añade la solución de desarrollo como sustrato enzimático (Fig.30-3). Se mide la fluorescencia del producto final. Cuanto más elevada sea la fluorescencia, más IgE específica habrá en la muestra (Fig.30-4).

2.6. Determinación de masas moleculares de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas contenidas en el extracto de polen de morera se llevó a cabo una técnica de SDS-PAGE utilizando el equipo Mini-Protean II de Bio-Rad. Se trabajó en condiciones reductoras de electroforesis y con un sistema discontinuo (gel preparador sobre gel separador), según el método de Laemmli modificado (232). El SDS actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa. Se precisa una molécula de SDS por cada dos residuos aminoácidos, correspondiendo a 1,4 g de SDS/g de proteína. Ello proporciona a todas las proteínas carga negativa. De este modo, la proteína se desplaza por el gel hacia el polo positivo y la velocidad de desplazamiento depende de su peso molecular.

Se montan las placas siguiendo las instrucciones del catálogo de *Mini-Protean II dual slab cell*. En la parte superior de la placa se deposita el gel apilador o preparador que tiene como función concentrar la muestra en una banda estrecha, y ocupando la mayor parte de la placa, un gel separador en el que tiene lugar la separación de los componentes. El gel separador se

preparó con una proporción de acrilamida del 12,5 % (p/v) a partir de una solución acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1. Se recomienda que tenga una altura de 5 cm. Mientras que para el gel apilador o preparador se utilizó un porcentaje de acrilamida del 4% (p/v). Se recomienda que tenga una altura de 1 cm. A cada gel se les añadieron los catalizadores: persulfato amónico (22,5% p/v) y Temed (0,2% v/v). Posteriormente, se aplicó el extracto de polen de morera en los pocillos de la parte superior de gel apilador (Figura 31), y por último, se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 150 V durante 60 minutos (Figura 32 y 33). El azul de bromofenol es un compuesto orgánico que se desplaza muy rápidamente por el gel separador de modo que la electroforesis finaliza cuando aparece una banda azulada al final del gel separador lo que indica que el azul de bromofenol ha alcanzado el final del gel separador.

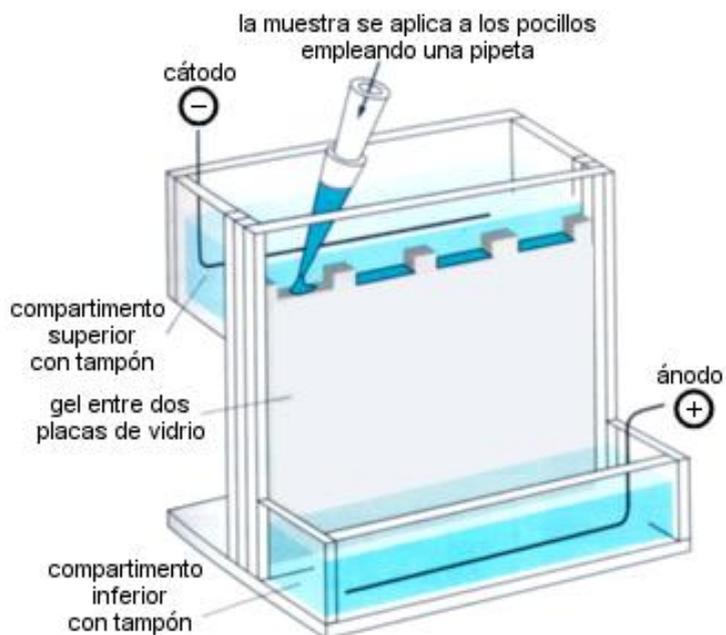


Figura 31. Aplicación de extracto de polen de morera. Fuente: <http://biomodel.uah.es>

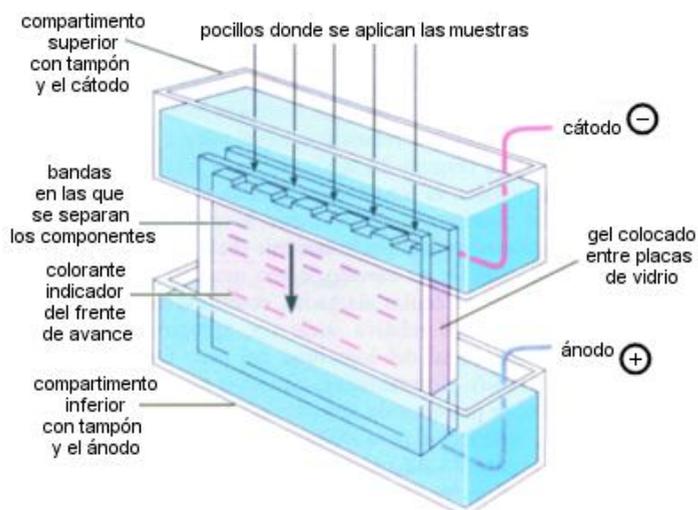


Figura 32. Cubeta con gel de poliacrilamida. Fuente: <http://biomodel.uah.es>



Figura 33. Material para SDS-PAGE.

La determinación de los pesos moleculares se llevó a cabo por el método de Weber y Osborn (233), construyendo una recta de calibrado, representando la movilidad (en mm) manifestada por una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular ya conocido. La movilidad se mide desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda. Las proteínas utilizadas como patrones de peso molecular fueron las del kit de Patrón de masas moleculares *Low Molecular Weight Marker* (Tabla 10).

Proteína	Peso molecular (Da)
Fosforilasa B	97.000
Seroalbúmina bovina	66.000
Ovoalbúmina	45.000
Anhidrasa carbónica	30.000
Inhibidor de tripsina	20.100
α -Lactoalbúmina	14.400

Tabla 10. Patrón de pesos moleculares utilizado en SDS-PAGE.

Posteriormente se procedió a la tinción de los geles. Para ello, se añadió la solución colorante que contiene azul de Coomassie R-250 (1 g/litro de solución de colorante), metanol al 10% y ácido acético al 7%, y se mantuvo durante dos horas a temperatura ambiente. La decoloración se realizó con metanol/ácido acético/agua destilada 4:1:5 (v/v/v). La decoloración se paró con ácido acético al 7% (v/v) (234). Una vez teñidos los geles de la electroforesis, fueron analizados en un analizador de imagen GS-710.

2.7. Determinación de las proteínas alergénicas mediante *western-blotting*

Para el estudio de *western-blotting*, tras separar proteínas del extracto de polen de *Morus alba*, se transfirieron a una membrana absorbente electroforéticamente. Para ello se empleó un sistema de transferencia horizontal y “semi-seco” mediante el método descrito por Towbin *et al* en 1979 (235) utilizando el equipo Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System (Figura 34). Para la transferencia se empleó una membrana inmovilizante de PVDF y durante el proceso, se mantuvo una intensidad constante a razón de 2,1 mA/cm² del gel durante 45 minutos. Posteriormente se realizó tinción de proteínas sobre las membranas como control de la transferencia, utilizando colorante Negro amido y como decolorante una solución de metanol al 10% y ácido acético al 7%.

Para evitar que los anticuerpos y otras proteínas se unan inespecíficamente a la membrana se llevó a cabo el bloqueo de la misma. Para ello, una vez realizada la tinción con el colorante negro amido, se bloquearon las membranas con 20 ml de tampón de bloqueo/membrana durante una hora a temperatura ambiente y en agitación.



Figura 34. Analizador para Western Trans-Blot Turbo Transfer System.

Por último se llevó a cabo la inmunodetección de proteínas alergénicas transferidas a membranas utilizando un método quimioluminiscente. Para ello se incubaron las membranas con los sueros de los pacientes durante una hora a 4°C. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón de lavado, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y con agitación, con un anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-IgE humana conjugado con peroxidasa. Tras

lavar de nuevo con tampón de lavado 3 veces se llevó a cabo el revelado siguiendo las instrucciones del kit ECL Prime utilizando como substrato enzimático el luminol. Tras escurrir el exceso de reactivo y envolver la membrana en plástico, se expuso la membrana (en oscuridad) a una película Hyperfilm ECL en el interior de un cassette fotográfico durante tiempos que oscilan entre 15 segundos y una hora. En nuestro caso el tiempo fue de cinco minutos. El tiempo de exposición depende de la intensidad de fijación de los anticuerpos IgE a las bandas proteicas que se detectan en el *blotting*; si la intensidad de fijación es muy alta, con poco tiempo se revelarán las bandas proteicas alergénicas; si la intensidad de fijación es baja, se necesitará más tiempo de exposición. A continuación se reveló la placa por inmersión en la solución de revelado durante unos segundos (Kodak GBX Developer diluido 1/ 4,5 en agua), después en acético al 7% (v/v) y en solución de fijado (Kodak GBX Fixer and Replenisher diluido 1/ 4,5 en agua). Finalmente, tras lavar la película con agua, se dejó secar.

2.8. Estudio mediante *western-blotting* inhibición con proteínas de polen de *Morus alba* y otras proteínas

Para analizar la naturaleza de las proteínas alergénicas detectadas en el estudio mediante *western-blotting*, se llevó a cabo una técnica de *western-blotting* inhibición. Para ello, se preparó un pool de varios sueros de pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* y se distribuyó la mezcla en varias alícuotas. Estas alícuotas se incubaron con sendas proteínas inhibidoras (profilina, Par j 2 y Pru p 3), durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con respectivas membranas portadoras de las proteínas transferidas de *Morus alba* siguiendo el mismo procedimiento que en el ensayo de inmunotransferencia ya explicado en el epígrafe 2.7. Se utilizó como control positivo el propio extracto de polen de *Morus alba* a 1 mg/ml, como control inhibidor negativo BSA a 75 µg/ml. Como proteínas inhibidoras se utilizaron varias profilinas: profilina de *Olea europaea* (olivo) a 75 µg/ml, profilina de polen *Artemisia vulgaris* a 75 µg/ml y profilina de polen de *Phoenix dactilifera* (palmera) a 75 µg/ml; Par j 2 a 75 µg/ml, alérgeno mayor de *Parietaria judaica* y Pru p 3 a 75 µg/ml, proteína transferidora de lípidos (LTP) de melocotón.

2.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Todas las identificaciones por espectrometría de masas fueron realizadas en la Unidad de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid perteneciente al Parque Científico de Madrid. Para la identificación de proteínas mediante la espectrofotometría de masas, las bandas proteicas, obtenidas en gel en las anteriores técnicas de inmunotransferencia, fueron digeridas automáticamente empleando el aparato Ettan Digester que está diseñado para descomponer proteínas enteras en unidades de gel de poliacrilamida y, luego, extraer los péptidos resultantes antes de realizar el análisis de espectrometría de masas basada en el método *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF). El protocolo de digestión empleado fue el de Shevchenko *et al* (236) con mínimas variaciones: los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50% y acetonitrilo 70% y se secaron en un Speedvac. A continuación, se añadió tripsina porcina modificada para llevar a cabo la digestión a 37°C durante una noche. La extracción de los péptidos se realizó empleando acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.1%. Se mezcló una alícuota de la

solución de digestión con otra de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo acuoso 30%, 2-propanol 15% y ácido trifluoroacético 0,1%. Esta mezcla se depositó en una placa 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI empleando el método de la capa gruesa y dejando que se seque a temperatura ambiente. Los espectros de masas MS y tándem MS/MS se obtuvieron en un equipo 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Figura 35).

El espectrómetro fue calibrado a la masa teórica de ± 50 ppm. Los espectros obtenidos se analizaron informáticamente para la identificación de las distintas proteínas. Cuando era necesario, se identificaron las proteínas mediante la fragmentación de los péptidos internos de las mismas, utilizando un electrospray como fuente de ionización y un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS).



Figura 35. Espectrómetro de masas Mass Spectrometer-4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer.

Para el análisis automático de los datos de masa obtenidos se empleó el paquete informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3. Los datos de MS y MS/MS (*Tandem mass spectrometry*) fueron combinados gracias al paquete informático GPS

Explorer Software versión 3.6, y de esta manera se realizó una búsqueda frente a una base de datos de proteína no redundante del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI nr o Swiss-Prot) empleando Mascot versión 2.2, con una tolerancia de masa para los fragmentos de 50 ppm y permitiendo la presencia máxima de un único punto de corte fallido. Los espectros de MS y MS/MS y los resultados de las búsquedas fueron inspeccionados en detalle manualmente empleando los paquetes informáticos antes comentados.

2.10. Análisis estadístico

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la fórmula

$$n = \frac{t^2 \times p \times (1-p)}{m^2} \quad (237)$$
 donde t es el nivel de confianza, p

la prevalencia y m el margen de error.

Los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa informático SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) versión 15. Utilizando este software se ha estimado el intervalo de confianza del porcentaje de pacientes con prueba de provocación conjuntival positiva, y se ha calculado la correlación entre la dilución a la que los pacientes presentaban prueba de provocación conjuntival positiva y la clase de IgE específica sérica de *Morus alba* mediante la Tau b de Kendall al ser la dilución una variable no paramétrica ordinal.

Se han seguido los principios éticos que sirven para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos recogidos en las normas de Helsinki (238) y, asimismo, este estudio tiene la autorización del Comité Ético de la Universitat de Valencia. A todos los participantes se les presentó el

documento de consentimiento informado (Anexo A) que aceptaron para ser introducidos en el estudio.

RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral, al no haber datos previos de prevalencia de sensibilización a polen de morera en nuestra área de estudio, se realizaron previamente pruebas cutáneas a 30 pacientes que padecían rinitis alérgica por pólenes obteniéndose una prevalencia de sensibilización a polen de morera del 20%. Este dato era acorde con los obtenidos por Huertas *et al* que encontraron una prevalencia del 18,42% entre los polínicos que estudiaron (239) en la región de Cartagena. Utilizando la fórmula para el cálculo del tamaño muestral $n = \frac{t^2 \times p \times (1-p)}{m^2}$ siendo t el nivel de confianza del 95% (1,96), p la prevalencia observada (20%) y m el margen de error (8%) se obtuvo un tamaño muestral de n= 101 una vez añadido un 5% de pacientes para compensar las pérdidas a lo largo del estudio.

Los 101 pacientes seleccionados tenían una edad media de $33,72 \pm 13,42$ años, siendo un 67,42% mujeres (n=60) y el resto hombres (n=41).

2. Pruebas cutáneas con extractos de aeroalérgenos

Tras la realización de pruebas cutáneas no se han detectado pacientes únicamente sensibilizados a polen de morera. Los 101 pacientes del estudio, todos ellos sensibilizados a polen de morera, también lo estaban a otros pólenes (Tabla 11), con un porcentaje que oscilaba entre 88,64% de pacientes sensibilizados a polen de olivo y a polen de parietaria, y un 25% con sensibilización a polen de ciprés, el 25%. Las pruebas cutáneas realizadas en 5 pacientes no atópicos que sirvieron como controles fueron negativas.

Polen	% pacientes
Olivo	88,64
Parietaria	88,64
Gramíneas	84,09
Artemisa	75
Chenopodium	79,55
Plátano de la sombra	70,45
Plantago	65,91
Taraxacum	54,55
Ciprés	25

Tabla 11. Porcentaje de pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* con sensibilización cutánea a otros pólenes.

3. Prueba de provocación conjuntival con extracto de polen de *Morus alba*

Nuestros resultados muestran que de los 101 pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* incluidos en el estudio, el $44,55\% \pm 9,7$ con un intervalo de confianza del 95% (n=45) presentaron positividad a la prueba de provocación conjuntival con extracto de polen de morera según el método descrito en el epígrafe 2.3 de métodos. De estos 45 pacientes, el 33,33% presentaban positividad a la dilución más baja (1:1), mientras que sólo un 11% presentaban positividad con la dilución más alta (1:1000). Las pruebas de provocación ocular llevadas a cabo en 5 pacientes no atópicos que sirvieron como controles fueron negativas. En la tabla 12 se exponen todos los resultados de la prueba de provocación conjuntival según la dilución a la que presentaban reacción los pacientes.

Dilución	N	%
1:10	19	42,22
1:1	15	33,33
1:100	6	13,33
1:1000	5	11,11
Total	45	100

Tabla 12. Resultados de la prueba de provocación conjuntival positiva según dilución del extracto de *Morus alba*, realizadas a partir de una solución a 5 mg/ml.

4. Cuantificación de IgE específica sérica

En los pacientes que presentaban prueba de provocación conjuntival positiva se cuantificó IgE específica sérica de polen de *Morus alba* y de panalérgenos. De los 45 pacientes con prueba de provocación conjuntival positiva, únicamente en 7 (15,55%) no se detectó IgE específica sérica de polen de morera. En cambio, el 22,22% (n=10) presentaban niveles de IgE específica sérica de polen de morera por encima de 3,5 kU/L. El 64,45% restante de pacientes tenían un valor de IgE específica de polen de *Morus alba* entre 0.35 y 3.5 kU/ml. En la tabla 13 se recogen todos los valores de IgE específica sérica de polen de morera. Así pues, el 66,66% (n=30) de los pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* tenían clases 2- 3 de IgE específica sérica.

Se realizó cuantificación de IgE específica mediante sistema UNICAP (Phadia, Sweden) de profilina (Phl p 12), Par j 2 y polcalcina (Phl p 7) en los sueros de los 45 pacientes con prueba de provocación conjuntival positiva con polen de morera. Los resultados muestran que un 35,55% de los pacientes estaban sensibilizados a polcalcina, un 33,33% lo estaban a profilina, y un 44,44% lo estaban a Par j 2 (Tabla 14).

Nº	kU/L	CLASE	Nº	kU/L	CLASE	Nº	kU/L	CLASE
1	17,2	3	16	1,4	2	31	3,1	2
2	3	2	17	2,9	2	32	1,2	2
3	<0,3 5	0-1	18	1,2	2	33	0,4	1
4	<0,3 5	0	19	0,7	2	34	0,7	1
5	1	2	20	8,9	3	35	<0,35	0-1
6	0,4	1	21	2,5	2	36	1,1	2
7	10,1	3	22	0,6	1	37	3,9	3
8	9,7	3	23	4,5	3	38	<0,35	0-1
9	0,5	1	24	2,2	2	39	1,4	2
10	3,3	2	25	<0,35	0-1	40	3	2
11	85	4	26	2,4	2	41	4,6	3
12	1,2	2	27	0,5	1	42	1	2
13	1,4	2	28	0,8	2	43	<0,35	0-1
14	14	3	29	0,7	2	44	2,4	2
15	7,5	3	30	0,35	1	45	<0,35	0-1

Tabla 13. Resultados de IgE específica sérica de polen de *Morus alba* en pacientes con prueba de provocación conjuntival positiva con polen de *Morus alba*.

	N	%
Profilina	16	35,55
Polcalcina	15	33,33
Par j 2	20	44,44

Tabla 14. Pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* con sensibilización a panalérgenos.

El análisis de correlación mediante el test Tau b de Kendall no ha podido establecer una correlación positiva ($p= 0,092$) entre la dilución a la que el paciente

dio positivo en la prueba de provocación conjuntival y la clase de IgE específica sérica de *Morus alba* en el suero del paciente.

5. Determinación de masas moleculares de proteínas del extracto de polen de *Morus alba*

Con el extracto de polen de *Morus alba* se realizó estudio de determinación de masas moleculares mediante SDS-PAGE.

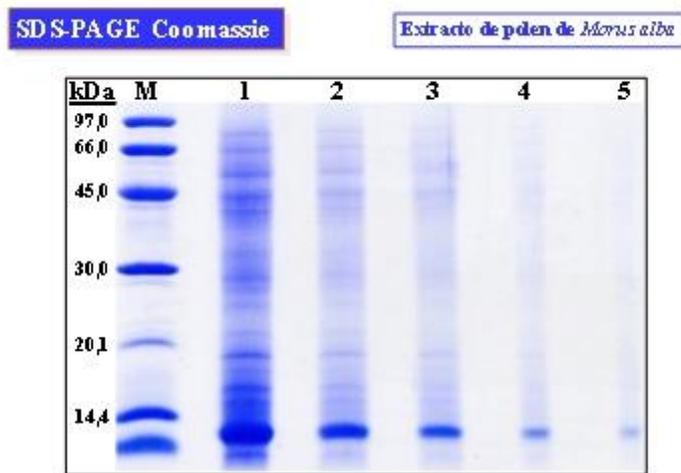


Figura 36. SDS-PAGE de extracto de polen de *Morus alba*. Calles 1- 5 con extracto de polen de *Morus alba* a distintas concentraciones. M: Patrón de masas moleculares.

Como se puede ver en la figura 36, en el estudio de electroforesis del extracto de polen de morera destacan bandas proteicas de 8-10, 14-15, 17, 25-30, 45, 55, 66 y 80 kDa.

6. Determinación de las proteínas alergénicas mediante *western-blotting*

Posteriormente se llevó a cabo el estudio de las proteínas separadas electroforéticamente mediante *western-blotting* con los sueros de los pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* y con positividad en la prueba de provocación conjuntival con dicho polen, para determinar qué proteínas son fijadas por el suero de los pacientes, y por lo tanto son alergénicas. Podemos ver los resultados en las figuras 37 a 39. Se analizaron los sueros de 32 pacientes de los 45 previstos, ya que a la vista de los primeros resultados obtenidos, haber analizado todos los sueros no habría supuesto una diferencia sustancial en los resultados.

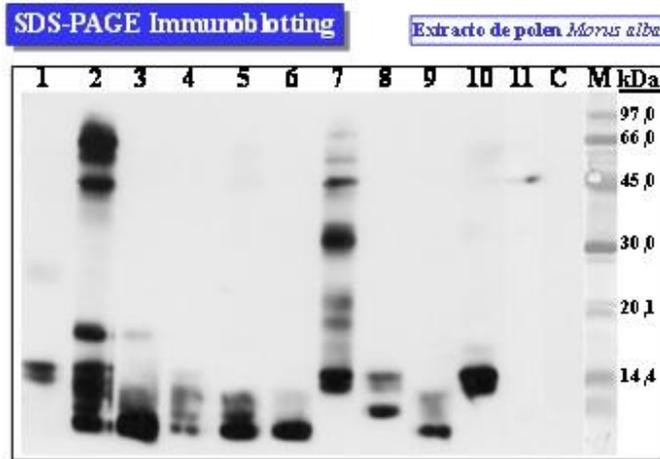


Figura 37. *Western-blotting* con suero de pacientes sensibilizados a *Morus alba* utilizando extracto de *Morus alba*. Sueros 13 a 23. Calle 1: Suero del paciente 13. Calle 2: Suero del paciente 14. Calle 3: Suero del paciente 15. Calle 4: Suero del paciente 16. Calle 5: Suero del paciente 17. Calle 6: Suero del paciente 18. Calle 7: Suero del paciente 19. Calle 8: Suero del paciente 20. Calle 9: Suero del paciente 21. Calle 10: Suero del paciente 22. Calle 11: Suero del paciente 23. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). M: Patrón de masas moleculares.

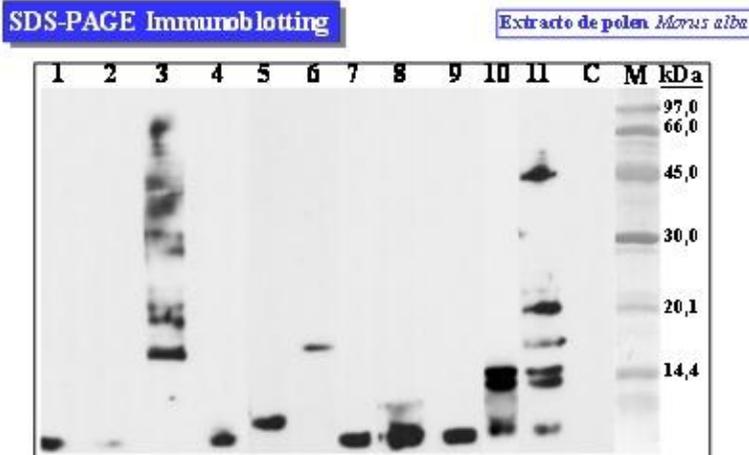


Figura 38. *Western-blotting* con suero de pacientes sensibilizados a *Morus alba* utilizando extracto de *Morus alba*. Sueros 24 a 34. Calle 1: Suero del paciente 24. Calle 2: Suero del paciente 25. Calle 3: Suero del paciente 26. Calle 4: Suero del paciente 27. Calle 5: Suero del paciente 28. Calle 6: Suero del paciente 29. Calle 7: Suero del paciente 30. Calle 8: Suero del paciente 31. Calle 9: Suero del paciente 32. Calle 10: Suero del paciente 33. Calle 11: Suero del paciente 34. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). M: Patrón de masas moleculares.

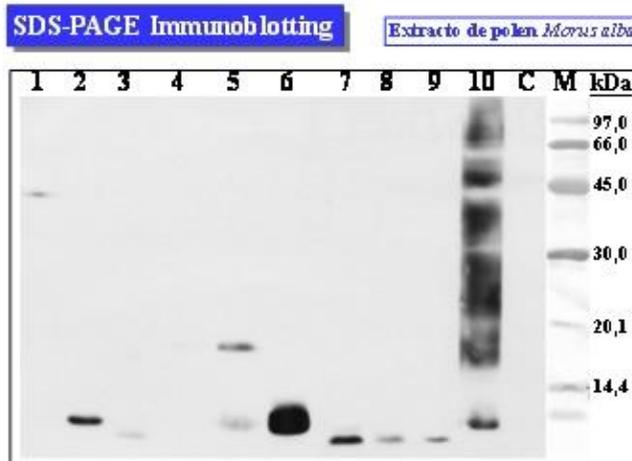


Figura 39. *Western-blotting* con suero de pacientes sensibilizados a *Morus alba* utilizando extracto de *Morus alba*. Sueros 35 a 44. Calle 1: Suero del paciente 35. Calle 2: Suero del paciente 36. Calle 3: Suero del paciente 37. Calle 4: Suero del paciente 38. Calle 5: Suero del paciente 39. Calle 6: Suero del paciente 40. Calle 7: Suero del paciente 41. Calle 8: Suero del paciente 42. Calle 9: Suero del paciente 43. Calle 10: Suero del paciente 44. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). M: Patrón de masas moleculares.

En las imágenes de *western-blotting* destacan sobre todo, en frecuencia e intensidad de fijación, un bandeo en la zona de masas moleculares aparentemente pequeñas: dos bandas de aprox. 14 y 15 kDa, dos bandas de aprox. 8 y 10 kDa, y luego con mucha menor frecuencia bandas de aprox. 45 kDa, 20 kDa y 17 kDa. Destacan especialmente las bandas de baja masa molecular: 14 y 15 kDa (aparecen en el 21,8 % de los sueros); la de aprox. 8 kDa aparecen en 50 %

de los sueros, y la de 10 kDa en el 37,5 % de los sueros (Tabla 15).

Peso molecular (kDa)	Número de sueros reactivos (N=32)
8	16 (50%)
10	12 (37,5%)
14-15	7 (21,8%)
17	6 (18,75%)
20	3 (9,3%)
30	3 (9,3%)
45	7 (21,8%)

Tabla 15. Perfil de reconocimiento de bandas proteicas de los pacientes sensibilizados a polen de morera.

7. Estudio mediante *western-blotting* inhibición de las proteínas alergénicas de polen de *Morus alba* y otras proteínas

Para estudiar las bandas proteicas detectadas previamente, se realizó un estudio mediante *western-blotting* inhibición con profilina de pólenes y *blotting* directo con suero de conejo anti-profilina con objeto de verificar que las bandas de aprox. 14,5 y 15 kDa que aparecen al enfrentar el extracto de polen de *M alba* con los sueros 23 y 38 son dos isoformas de profilina del polen, como se puede observar en las figuras 40 y 41. En las calles en las que incubó el suero previamente con profilina, la banda proteica de 14 kDa no se fija. Esto se debe a que ya no queda IgE específica de profilina en el suero del paciente al unirse ésta a la profilina de polen que se ha utilizado como inhibidora) (Figura 40: calles 2 a 4 y Figura 41: calles 2 y 3).

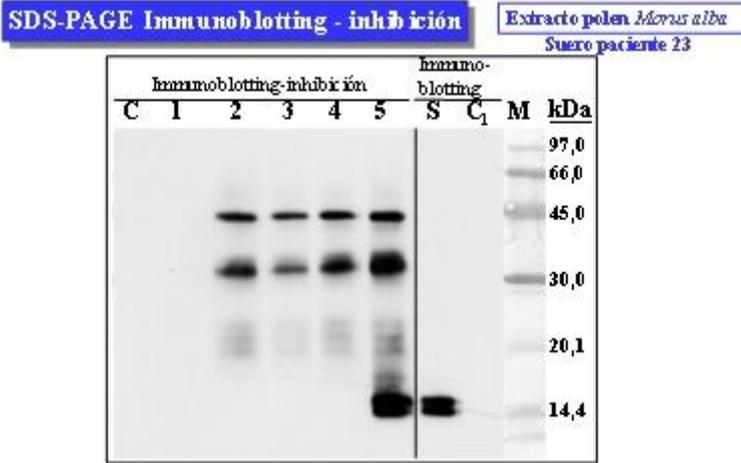


Figura 40. *Western-blotting* inhibición de banda proteica de 14 kDa con profilina en suero 23. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). Calle 1: Suero del paciente 23 preincubado con extracto de polen de *Morus alba* (1 mg/ml) (inhibición homóloga. Control positivo de inhibición). Calle 2: Suero del paciente 23 preincubado con profilina de polen *Olea europaea* (75 µg/ml). Calle 3: Suero del paciente 23 preincubado con profilina de polen *Artemisia vulgaris* (75 µg/ml). Calle 4: Suero del paciente 23 preincubado con profilina de polen palmera *Phoenix dactylifera* (75 µg/ml). Calle 5: Suero del paciente preincubado con BSA (75 µg/ml). Calle S: Suero conejo anti-profilina. Calle C₁: Suero de conejo sin inmunizar (control negativo de conejo). M: Patrón de masas moleculares.

SD S-PAGE Immunoblotting - inhibición

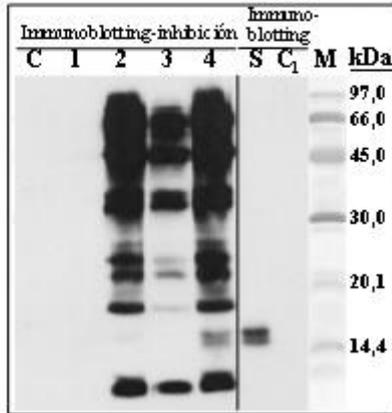
Extracto polen *Morus alba*
Suero paciente 38

Figura 41. *Western-blotting* inhibición de banda proteica de 14 kDa con profilina en suero 38. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). Calle 1: Suero del paciente 38 preincubado con extracto de polen de *Morus alba* (0,8 mg/ml) (inhibición homóloga. Control positivo de inhibición). Calle 2: Suero del paciente 38 preincubado con profilina de polen de *Artemisia vulgaris* (50 µg/ml). Calle 3: Suero del paciente 38 preincubado con profilina de polen palmera *Phoenix dactylifera* (50 µg/ml). Calle 4: Suero del paciente 38 preincubado con BSA (50 µg/ml). Calle S: Suero conejo anti-profilina. Calle C₁: Suero de conejo sin inmunizar (control negativo de conejo). M: Patrón de masas moleculares.

8. Identificación de proteínas

Tras observar la presencia de una banda proteica de 8 kDa y otra de 10 kDa en un 50% de los estudios de *western-blotting* con los sueros de los pacientes y polen de morera, se llevó a cabo un estudio de identificación de proteínas que determinó que la banda proteica de 8 kDa correspondía a una proteína de la familia de las LTP observándose péptidos coincidentes con la LTP de *Morus notabilis* tras cotejar los datos obtenidos en la base de datos de proteína no redundante NCBI nr SwissProt empleando Mascot versión 2.2 (Matrix Science). Con la banda proteica de 10 kDa no se observaron coincidencias con otras proteínas ya registradas en la base de datos.

9. Estudio mediante *western-blotting* inhibición con LTP

Para verificar que estas proteínas de 8 y 10 kDa correspondían a proteínas transferidoras de lípidos (LTP), se ha realizado estudio de *western-blotting* inhibición utilizando Par j 1+Par j 2 a 100 µg/ml, alérgenos mayores de *Parietaria judaica*, que pertenecen a la familia de las LTP, y podrían inhibir la fijación de dichas proteínas de 8 y 10 kDa. Los resultados muestran que en este estudio con el suero 24 se produjo dicha inhibición con ambas bandas como se puede observar en la figura 42 calle 4. Sin embargo, con el suero 22 no se obtuvo el mismo resultado a pesar de que el estudio de identificación proteica identificaba la banda de 8 kDa como una proteína LTP (Figura 43 calle 8). Además, no se ha observado inhibición de ninguna de las dos proteínas (8 y 10 kDa) con Pru p 3 a 100 µg/ml (LTP de melocotón) en los estudios de *western-blotting* inhibición realizados con los sueros 22 y 24 (Figura 42-calle 5 y figura 43-calle 9).

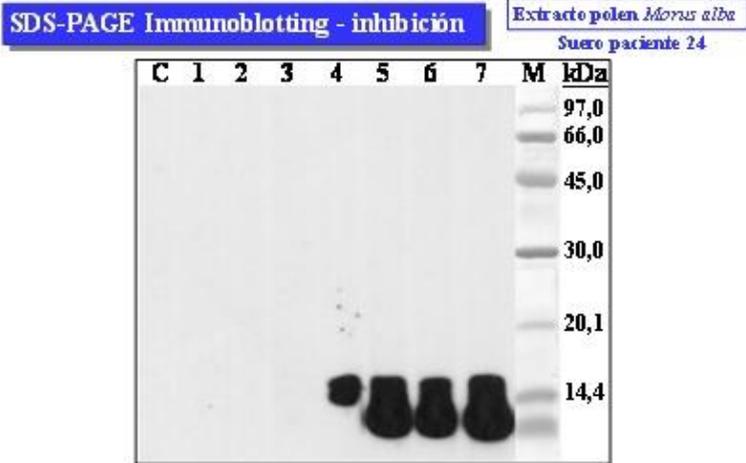


Figura 42. *Western-blotting* inhibición de banda proteica de 8 y 10 kDa con Par j1-Par j2, Pru p3 y otros pólenes. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). Calle 1: Suero del paciente 24 preincubado con extracto de polen *Morus alba* (1mg/ml)(inhibición homóloga. Control positivo de inhibición). Calle 2: Suero del paciente preincubado con extracto de polen *Parietaria judaica* (1 mg/ml). Calle 3: Suero del paciente preincubado con extracto de polen *Olea europaea* (1mg/ml). Calle 4: Suero del paciente preincubado con Par j 1+2 (75 µg/ml). Calle 5: Suero del paciente preincubado con LTP Pru p3 (100 µg/ml). Calle 6: Suero del paciente preincubado con extracto de cordero (1 mg/ml). Calle 7: Suero del paciente preincubado con BSA (75 µg/ml). M: Patrón de masas moleculares.

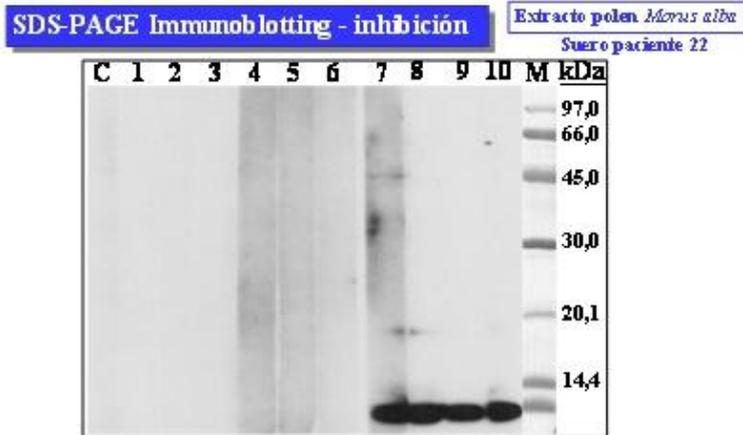


Figura 43. Western-blotting inhibición de banda proteica de 8 kDa con Par j1-Par j2 y otros pólenes. Calle C: Suero control (mezcla de sueros de personas no atópicas). Calle 1: Suero del paciente 22 preincubado con extracto polen *Morus alba* (1 mg/ml) (inhibición homóloga. Control positivo de inhibición). Calle 2: Suero del paciente preincubado con extracto polen *Parietaria judaica* (1 mg/ml). Calle 3: Suero del paciente preincubado con extracto polen *Olea europaea* (1 mg/ml). Calle 4: Suero del paciente preincubado con extracto polen *Artemisia vulgaris* (1 mg/ml). Calle 5: Suero del paciente preincubado con extracto polen *Phleum pratense* (1 mg/ml). Calle 6: Suero del paciente preincubado con extracto polen *Platanus acerifolia* (1 mg/ml). Calle 7: Suero del paciente preincubado con extracto de cordero (1 mg/ml). Calle 8: Suero del paciente preincubado con Par j 1+2 recomb (100 µg/ml). Calle 9: Suero del paciente preincubado con LTP Pru p3 (100 µg/ml). Calle 10: Suero del paciente preincubado con BSA (100 µg/ml). M: Patrón de masas moleculares.

DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

Aerobiología de Morus alba

La época de floración del árbol de la morera comienza a finales de febrero y se prolonga hasta principios de abril, siendo la primera quincena de marzo el momento en el cual se recogen las mayores cantidades de polen en los captadores de polen de la zona de Valencia, con picos que pueden alcanzar los 160 granos de polen/m³. Se ha detectado polen de morera en la misma época del año en Sevilla, Salamanca, Toledo y Madrid (185, 240-242). Sin embargo, Erkara *et al*, en un estudio realizado en Turquía, detectaron polen de morera en el mes mayo (243). Existen otros estudio aerobiológicos tanto dentro como fuera de España en los que se ha detectado polen de morera, sin concretar la época del año. Son estudios cuya finalidad es ver qué pólenes se detectan mediante uso de captadores en diferentes núcleos urbanos. Uno se realizó en la India (244), y el otro en España (245).

El grupo de pólenes que se incluye en las pruebas mediante *prick test* para el diagnóstico de la sensibilización a alérgenos incluye pólenes que tras detectarlos en el aire ambiental, se ha demostrado su

implicación en una enfermedad respiratoria estacional. El polen de morera no se incluye de forma rutinaria en estas pruebas por no haberse comprobado su relevancia clínica, probablemente por no haber estudios que la avalen. En general, se utilizan los mismos grupos de pólenes en la mayoría de Servicios de Alergia para el diagnóstico, aunque puede haber variaciones en función del área geográfica y puede aumentarse el número con la inclusión de pólenes nuevos. Marcos *et al* estudiaron la sensibilización a polen de *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* (246), que no se incluía previamente de forma rutinaria en las pruebas de *prick test*, en los pacientes alérgicos que acudieron para estudio por presentar síntomas respiratorios entre los años 1995 y 1999. Diez de estos pacientes estaban sensibilizados a polen de pino, y seis estaban sensibilizados solamente a este polen, todos ellos presentaban clínica rinoconjuntival coincidente con la época de polinización del pino. El hecho de que estuvieran sensibilizados únicamente al polen de *Pinus sylvestris* o *Pinus radiata* puso de manifiesto la implicación del mismo en la rinoconjuntivitis que presentaban los pacientes.

Existen pocos estudios sobre prevalencia de sensibilización a polen de *Morus alba*. En un estudio realizado en la región de Murcia, la prevalencia de sensibilización cutánea a *Morus alba* fue del 8,7% (224). En los resultados en nuestra muestra el porcentaje de pacientes con polinosis que presenta sensibilización a polen de *Morus alba* alcanza el 20%. No hemos detectado la existencia de pacientes monosensibilizados a polen de morera. Este mismo hecho tampoco se observó en el estudio de Huertas *et al* en Cartagena (239). En dicho estudio, la mayoría de pacientes sensibilizados a *Morus alba* presentaban también sensibilización frente a *Salsola* y a *Plantago* (91,4%), a *Chenopodium* (88,6%), y a palmera (85,7%).

Prueba de provocación conjuntival con polen de Morus alba

La mayoría de trabajos sobre la prevalencia de alergia a pólenes utilizan el prick test y/o la determinación de IgE específica sérica para determinar la sensibilización a estos alérgenos. Sin embargo, Leonardi *et al* observaron que en pacientes con conjuntivitis alérgica, la conjuntiva puede ser el único órgano en el que podemos detectar sensibilización alérgica, lo que explicaría la poca correlación entre sensibilización

sérica y local ocular (247). Estos autores sugieren que la determinación de IgE específica local en lágrimas y la prueba de provocación ocular con polen pueden ser útiles en el diagnóstico de la conjuntivitis alérgica. De hecho, muestran que en aproximadamente un 30% de pacientes con esta patología alérgica ocular solamente es posible demostrar la sensibilización alérgica mediante una prueba de provocación conjuntival. Hoffmann-Sommergruber *et al* (248) observaron la existencia de una correlación positiva entre los síntomas oculares y la presencia de IgE específica en lágrimas de pacientes con conjuntivitis alérgica ($p < 0.0001$), mientras que no había una correlación significativa entre IgE específica sérica y las manifestaciones de la alergia ocular ($p = 0.73$). En nuestro trabajo no se han medido niveles de IgE específica en lágrimas, pero observamos que no existe correlación entre los niveles de IgE-específica sérica de polen de morera y la dilución a la que el paciente presenta positividad en la prueba de provocación ocular, es decir, no hemos detectado una correlación entre sensibilización sistémica y local. En cambio, en un trabajo realizado por Abelson *et al* en pacientes con conjuntivitis alérgica por polen de *Poa pratensis*, *Ambrosia artemisiaefolia* y/o gato, el 80% de los

pacientes con una prueba cutánea positiva a uno de estos alérgenos, presentaban una prueba de provocación ocular positiva con dicho alérgeno (86). Otro estudio observó una correlación del 71% entre pruebas cutáneas mediante *prick test* e IgE específica sérica, y el test de provocación conjuntival (249). De estos estudios podemos concluir que existe una buena correlación entre pruebas cutáneas y prueba de provocación ocular. Sin embargo, en nuestro caso la correlación fue del 45%. Esto podría deberse a que el polen de morera podría tener menos capacidad de producir clínica ocular. Las divergencias de nuestros resultados con los estudios de correlación anteriormente citados podrían deberse a que estudiamos alérgenos distintos.

En las pruebas de provocación nasal o conjuntival, se utilizan concentraciones de alérgeno progresivamente crecientes. Si no se reproducen síntomas alérgicos tras la exposición en conjuntiva o mucosa nasal a la concentración más alta de alérgeno, concluimos que la prueba es negativa. Según algunos autores no existe correlación entre la concentración a la que es positiva la prueba de provocación nasal y la severidad de los síntomas durante la polinización (250). En cambio otros observan que cuanto mayor es la dilución del extracto

de polen utilizado con la que el paciente presenta positividad en la prueba de provocación conjuntival, antes aparecen los síntomas cuando llega la polinización del polen al que el paciente está sensibilizado (251). En nuestro caso, debido a que todos los pacientes estaban sensibilizados a otros pólenes, además de *Morus alba*, coincidentes en la época de polinización, no ha sido posible realizar un estudio de correlación entre los niveles de polen de morera en el ambiente y la intensidad de los síntomas.

Pólenes que coinciden con el polen de morera en la época de polinización.

El polen de *Morus alba* poliniza desde finales de febrero hasta principios de abril. Existen otros pólenes que también polinizan de forma importante en estos meses del año como son el pino (*Pinus radiata*), el fresno (*Fraxinus excelsior*) y el plátano de la sombra (*Platanus acerifolia*). La coincidencia en la época de polinización de estos pólenes con otros y su co-sensibilización ha sido analizada en algunos trabajos. No obstante, el polen de la morera no ha sido incluido en ellos y no existen prácticamente datos sobre la sensibilización simultánea a *Morus alba* y a otros pólenes.

Gastaminza *et al* publicaron en 2009 un estudio sobre la alergenicidad y reactividad cruzada del polen de pino (252). Sin embargo únicamente se estudió la reactividad cruzada con gramíneas. No se realizó prueba cutánea con extracto de morera. Estos autores observaron un alto grado de reactividad cruzada entre las diferentes especies de pino. Esta reactividad cruzada fue baja entre polen de pino y polen de gramíneas.

El fresno (*Fraxinus excelsior*), perteneciente a la familia de las oleáceas, poliniza en el mes de marzo. Existen pocos casos de pacientes monosensibilizados a polen de fresno el cual presenta reactividad cruzada con otros pólenes debido a la presencia en su composición de panalérgenos como Bet v1-*like*, profilina y polcalcina (253). *Morus alba* contiene también los panalérgenos profilina y Bet v1-*like*. Hemmer *et al* observaron que únicamente un 20% de las sensibilizaciones cutáneas a polen de fresno se debían a la reactividad cruzada de sus panalérgenos, siendo el resto debido a sensibilizaciones primarias (198).

El polen de plátano de la sombra (*Platanus acerifolia*) poliniza a finales de marzo y principios de abril coincidiendo con el polen de morera. En un estudio de Varela et al (254) en pacientes con síntomas de rinoconjuntivitis en esta época del año, se detectó sensibilización a plátano de la sombra mediante prueba cutánea en el 74% de los pacientes mientras que un 39% estaban sensibilizados a polen de morera (*Morus alba*). Durante los dos meses de polinización, un 59% del polen recolectado correspondía a plátano de la sombra mientras que un 7% era polen de morera. El hecho de que hubiera un alto porcentaje de sensibilizados a polen de morera con tan poca presencia de este polen en las muestras de polen recogidas, podría indicar que el polen de morera tiene una capacidad sensibilizante muy alta.

Nuestros resultados muestran que en un 70% de los pacientes con prueba cutánea positiva a polen de morera estaban también sensibilizados a plátano de la sombra. Teniendo en cuenta que Pla a 8 es un alérgeno de plátano de la sombra que pertenece a la familia de las profilinas, es posible que la positividad del *prick test* a polen de plátano de sombra que presentan los pacientes sensibilizados a polen de la morera se deba a un alérgeno común que podría ser la profilina.

Sin embargo, en nuestros pacientes sensibilizados a polen de morera y plátano de la sombra, la sensibilización a profilina es solamente del 35.4%. La diferencia podría deberse a compartir otro panalérgeno como es la LTP que en plátano de la sombra corresponde a Pla a 3.

Reactividad cruzada de los alérgenos de Morus alba

Recientemente se han descrito dos alérgenos en *Morus alba*: Mor a 17 kDa y Mor a 4 (255). Mor a 17 kDa es un alérgeno Bet v 1-like detectado en el fruto de la morera (256). Bet v 1 corresponde al alérgeno mayor del polen de abedul (*Betula verrucosa*). En la figura 30 se muestra el patrón de reactividad cruzada de este alérgeno. Observamos que de los pólenes que contienen alérgenos que presentan reactividad cruzada con Bet v 1, ninguno está presente en nuestra área geográfica de estudio. Sin embargo nuestros resultados muestran en el análisis por *Western Blot* que el 19% de los sueros de los pacientes sensibilizados a polen de morera fijan una proteína de 17 kDa cuando se utiliza *Morus alba* como antígeno. Es posible que estos pacientes estén sensibilizados a Bet v 1 como consecuencia de reactividad cruzada con el alérgeno Mor a 17 kDa.

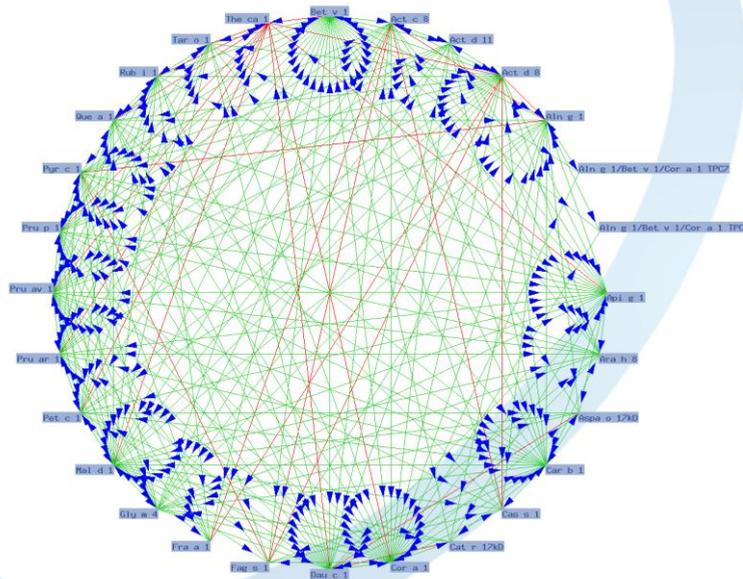


Figura 44. Reactividad cruzada de Bet v 1. Fuente: www.allergome.org.

El otro alérgeno descrito en polen de *Morus alba* es Mor a 4 de 14 kDa, que pertenece a la familia de las profilinas. En nuestro estudio mediante *blotting*-inhibición y *blotting* directo con el suero de nuestros pacientes, comprobamos que la banda de 14 kDa detectada mediante la técnica de *Western Blot*, correspondía a una profilina. Ruiz-García *et al* realizaron un estudio en 28 pacientes alérgicos a

profilina para demostrar su relevancia como aeroalérgeno y como causante de clínica respiratoria mediante la realización de test de provocaciones bronquiales y nasales utilizando extracto de Pho d 2, profilina de palmera (*Phoenix dactylifera*) (257). Un 77% de los pacientes presentaron una prueba de provocación bronquial específica positiva y un 9% tuvieron respuesta positiva a la prueba de provocación nasal específica. Así pues, un panalérgeno como la profilina puede ser causa de rinitis y asma en pacientes sensibilizados a pólenes que la contengan, como es el caso del polen de morera. En nuestro estudio, de los pacientes con prueba de provocación ocular positiva, un 35,55% estaban sensibilizados a profilina. Dado que la prueba de provocación conjuntival se ha realizado con extracto de polen de morera y no únicamente con profilina, no podemos concluir que la positividad de la prueba sea debida siempre a la profilina.

En 1990 se publicó un estudio de reactividad cruzada entre *Parietaria judaica* y *Morus alba*. La *parietaria judaica* es una hierba perenne muy frecuente en el área mediterránea donde existe una alta prevalencia de sensibilización al polen de esta planta en pacientes alérgicos. Nuestros resultados muestran que un 88% de los pacientes sensibilizados a polen de morera

presentaban una prueba cutánea positiva a polen de parietaria. Estos datos son concordantes con los obtenidos por Ayuso et en un trabajo en el que estudiaron la reactividad cruzada entre *Parietaria judaica* y *Morus alba* en 28 pacientes sensibilizados a polen de parietaria (258). De estos 28 pacientes, el 89% tenían prueba cutánea positiva a polen de morera, y un 78% presentaban IgE específica de este polen. Así pues, los pacientes sensibilizados a uno de estos pólenes presentan con frecuencia sensibilización al otro polen. En el estudio de Ayuso, observaron que al incubar los sueros de los pacientes sensibilizados a polen de parietaria con discos en los que se había fijado *Morus alba* utilizando como inhibidor un extracto de polen de parietaria, la inhibición era importante. La cantidad de proteína necesaria para producir una inhibición del 50% fue 1.3 μg para el extracto de *Parietaria judaica*, mientras que cuando utilizaron un extracto de polen de morera como inhibidor, se precisaron 19 μg . Por lo tanto, fue necesaria mayor cantidad de polen de morera para producir la misma inhibición que con polen de parietaria, lo que podría deberse a que el polen de morera contiene en menor cantidad las mismas proteínas alergénicas que polen de parietaria. En cambio, cuando se utilizaron discos

con polen de parietaria fijado, el extracto de *Morus alba* no presentó capacidad inhibitoria de la unión de la IgE específica en el suero del paciente al polen de parietaria fijado en el disco. Este hecho indica que algunos pacientes estaban sensibilizados a alérgenos de polen de parietaria que no están presentes en el polen de morera. Los autores concluyen que ambos pólenes, polen de parietaria y polen de la morera, comparten alérgenos que deben ser minoritarios en polen de parietaria, y que los alérgenos específicos de polen de morera no están presentes en el polen de parietaria. En nuestra opinión la primera aseveración no parece ser cierta ya que hemos detectado una proteína que en el estudio de *Western- Blotting* muestra inhibición por Par j 2, alérgeno principal de polen de parietaria. La segunda aseveración de estos autores no puede ser confirmada actualmente ya que no se han detectado hasta el momento alérgenos específicos de *Morus alba* y únicamente se han detectado panalérgenos.

El análisis por SDS-PAGE del contenido proteico de extracto de polen de morera que hemos realizado revela varias bandas de proteínas de 8-10, 14-15, 17, 25-30, 45, 55, 66 y 80 kDa. Resultados similares han sido obtenidos por Ayuso et al (258) que detectaron

proteínas de 9, 80, 66, 54, 45 y 8 kDa. Estos autores indicaron que las bandas proteicas de menor tamaño (8 y 9 kDa) únicamente aparecieron cuando se utilizaron los sueros de los pacientes con mayor cantidad de IgE específica de polen de morera observándose con más frecuencia las bandas proteicas de alto peso molecular (45, 54 y 66 KDa). En cambio, en nuestro estudio las bandas fijadoras más frecuentes corresponden a proteínas de 8,10, 14-15 y 45 kDa. En el citado trabajo de Ayuso *et al* no pudieron identificar la banda proteica de 9 kDa del extracto de polen de morera. Recientemente, Micheal *et al* han estudiado la sensibilización a polen de morera de papel (*Morus papyrifera*) en Pakistán (259). Se seleccionaron 29 pacientes con sensibilización cutánea a morera del papel, de los cuales 23 tenían también sensibilización cutánea a polen de *Morus alba*. Esto indica una alta reactividad cruzada entre ambas moráceas. En el suero de 23 pacientes se reconocía una proteína de 10 kDa mediante inmunoblotting. Esta proteína no se correspondía con ninguna proteína en la base datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI). Asimismo, los estudios de inhibición entre esta banda proteica de 10 kDa con Bet v 1 y con LTP fueron negativos, por lo que los autores concluyen que esta

banda de 10 kDa corresponde a un alérgeno aún no descrito. Por lo tanto, ha sido detectada una nueva proteína de 9-10 kDa en polen de morera por dos equipos diferentes paralelamente y que no han podido identificar. En nuestro trabajo, tras realizar el estudio de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas, se ha visto que la banda de 8 kDa corresponde a una LTP por homología de secuencia con la LTP de *Morus notabilis*. Existen varios pólenes que contienen una LTP como alérgeno, como por ejemplo, en polen de olivo Ole e 7, en polen de artemisa Art v 3, en polen de parietaria Par j 1 y Par j 2, y en polen de plátano de la sombra Pla a 3 (260). No fue posible la identificación proteica de la banda de 10 kDa pero observamos con la técnica de inmunoblotting-inhibición, la desaparición de dicha banda proteica utilizando extracto de Par j 1+Par j 2. Esto nos hace pensar que esta proteína de 10 kDa probablemente sea también una LTP.

Recientemente se ha detectado la presencia de LTP en el fruto de *Morus nigra* correspondiente al alérgeno Mor n 3 (261). Esta LTP presenta reactividad cruzada importante con Art v 3 (polen de artemisa), Cor a 8 (avellana), y Pru p 3 (melocotón). La LTP de parietaria (Par j 1 y Par j 2), ambrosia (Amb a 6) y olivo (Ole e 7) no parecen tener reactividad cruzada con

alimentos(195, 262, 263) tal vez por la menor homología estructural (menos de un 35%) que el polen de artemisia. En nuestro estudio, cuando se ha realizado un análisis mediante *blotting*-inhibición de las bandas proteicas de 8 y 10 kDa de polen de morera utilizando Pru p 3, el resultado ha sido negativo. Esto no es extraño si tenemos en cuenta que la mayor homología de los péptidos de la LTP de *Morus alba* se ha detectado con Par j 2, y que no se ha descrito reactividad cruzada entre polen de parietaria y LTP de alimentos. Por lo tanto, la LTP descrita en polen de morera no parece tener reactividad cruzada con LTP de alimentos. Aunque la LTP de polen de *Morus alba* no tiene reactividad cruzada con la LTP de alimentos como melocotón, consideramos importante señalar que en un estudio realizado en pacientes de Madrid y Murcia, se observaron importantes diferencias en cuanto a perfiles clínicos. La existencia de polinosis específicas asociadas a LTP en Murcia (264), principalmente Artemisia y Parietaria, hizo pensar a los autores en el posible papel de la sensibilización inhalatoria a LTP de pólenes como factor de riesgo en sensibilización alimentaria múltiple. Además, el polen de morera puede producir urticaria de contacto (265) así como síndrome de alergia oral por reactividad

cruzada entre la proteína Bet v 1-like contenida en polen de morera y frutas rosáceas (266), en este caso, por sensibilización inicial a estas últimas. En nuestro estudio, de todos los pacientes sensibilizados a polen de morera, solamente 6 pacientes (13,3%) presentaban alergia alimentaria, fundamentalmente a alimentos de la familia de las rosáceas. En estos pacientes, un estudio más amplio determinó la presencia de sensibilización a LTP de melocotón (Pru p 3) en 4 de ellos, y a profilina en dos. Estos datos corroboran la escasa reactividad cruzada entre la LTP de morera/parietaria y la LTP de alimentos.

Debido a la presencia principalmente de panalérgenos en polen de morera, estos pacientes están sensibilizados a varios pólenes y el tratamiento con inmunoterapia específica no sería la opción más adecuada ya que los panalergenos no se encuentran en los extractos alergénicos de las vacunas en cantidades suficientes para generar inmunogenicidad y por lo tanto, para inducir tolerancia a la exposición al polen. Además, actualmente ninguna casa comercial fabrica vacunas alergénicas con polen de morera. Estos pacientes deberían seguir tratamiento farmacológico. Si los pacientes están sensibilizados a otros pólenes, coincidentes o no con el polen de

morera en su época de polinización, y presentan síntomas durante dicha época, podrían ser candidatos a tratamiento hiposensibilizante con estos otros pólenes. También la presencia de panalérgenos en polen de morera nos impide discernir entre sensibilización primaria a polen de morera de sensibilización a alérgenos de otras plantas con reactividad cruzada con alérgenos de polen de morera.

Nuestro estudio enfatiza la importancia de identificar los pólenes que se encuentran en el aire que respiran los pacientes alérgicos, y obtener sus mediciones a nivel regional. Esto es de gran utilidad para realizar estudios de alergia respiratoria así como para prevenir la exposición y por tanto, la aparición de síntomas graves en los pacientes alérgicos a pólenes. Así pues, nuestra investigación podría ser útil para los alergólogos de nuestra área geográfica de estudio, para establecer un diagnóstico preciso y, mejor control de los síntomas alérgicos de los pacientes.

Nuestros resultados indican que se debe incluir extracto de *Morus alba* en la realización de las pruebas cutáneas en pacientes con síntomas de rinitis alérgica en época de polinización de este polen. Esto nos permitiría detectar pacientes sensibilizados únicamente

a polen de morera e identificar alérgenos específicos de este polen.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

En función de los objetivos propuestos y de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) La existencia de pacientes con rinitis alérgica que presentan pruebas cutáneas positivas con un extracto de polen de *Morus alba* indica que en nuestro medio geográfico existe sensibilización a polen de morera en pacientes alérgicos.
- 2) Un porcentaje elevado de pacientes sensibilizados a polen de *Morus alba* presenta una prueba de exposición ocular positiva, por lo que deducimos que el polen de *Morus alba* puede producir clínica ocular en pacientes sensibilizados.
- 3) La inhibición de la banda proteica de 14 kDa, obtenida en la separación electroforética de un extracto de polen de *Morus alba*, confirma la presencia de una proteína alérgica perteneciente a la familia de las profilinas en el polen de *Morus alba*.
- 4) En el análisis mediante espectrometría de masas de las dos bandas proteicas de 8 y 10 kDa

obtenidas por *western-blotting*, se han observado péptidos coincidentes con LTP de *Morus notabilis*, por lo que estas bandas proteicas corresponden probablemente a proteínas de la familia de las LTP.

- 5) Las proteínas de polen de *Morus alba* identificadas como LTP, no presentan reactividad cruzada con LTP de melocotón y sí con LTP de *Parietaria judaica*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puc M. Characterisation of pollen allergens. *Ann Agric Environ Med.* 2003;10(2):143-9.
2. Munshi A. Gene expression in allergenic pollen. *Aerobiologia.* 2000;16:331-4.
3. Metzger H. It's spring, and thoughts turn to...allergies. *Cell.* 1999;97(3):287-90.
4. Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, et al. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13753-9.
5. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest.* 1999;103(4):535-42.
6. Helm R, Cockrell G, Herman E, Burks A, Sampson H, Bannon G. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;117(1):29-37.

7. Kariyawasam HH, Pegorier S, Barkans J, Xanthou G, Aizen M, Ying S, et al. Activin and transforming growth factor-beta signaling pathways are activated after allergen challenge in mild asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):454-62.
8. Fountain DW. Pollen and inhalant allergy. *Biologist (London).* 2002;49(1):5-9.
9. Romagnani S, Maggi E, Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP. Regulation of IgE synthesis by CD4+ human T-cell subsets. *Res Immunol.* 1991;142(1):63-7.
10. Amini A, sankian M, Assarehzadegan MA, Vahedi F, Varasteh A. Chenopodium album pollen profilin (Che a 2): homology modeling and evaluation of cross-reactivity with allergenic profilins based on predicted potential IgE epitopes and IgE reactivity analysis. *Mol Biol Rep.* 2011;38(4):2579-87.
11. Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci.* 2000;55(2):235-46.
12. Ferrer M, Brasó J. Alergenos. Extractos alergénicos. En: Brasó J, Jorro G, editores. *Manual de alergia clínica.* Barcelona: Masson; 2003. p. 43-4.

13. Pomés A, Villalba M. Alérgenos. En: Pelaez A, Davila I, editores. Tratado de alergología. Madrid: Ergon; 2007. p. 3-16.
14. Schober W, Lubitz S, Belloni B, Gebauer G, Lintelmann J, Matuschek G, et al. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance allergic inflammation by acting on human basophils. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1:151-6.
15. D'Amato G. Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy.* 2002;57 Suppl 72:30-3.
16. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2002;20(3):763-76.
17. Baraniuk JN. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(2):S763-72.
18. Bousquet PJ, Demoly P, Devillier P, Mesbah K, Bousquet J. Impact of allergic rhinitis symptoms on quality of life in primary care. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(4):393-400.

19. Arena A. Anaphylaxis to apple: is fasting a risk factor for LTP-allergic patients?. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2010;42(4):155-8.
20. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. PT with heat-processed apple peel extract to detect LTP hypersensitivity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2006;38(10):351-4.
21. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(3):419-25.
22. Anuradha B, Vijayalakshmi V, Latha GS, Priya VH, Murthy KJ. Profile of pollen allergies in patients with asthma, allergic rhinitis and urticaria in Hyderabad. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2006;48(3):221-2.
23. Oka A, Matsunaga K, Kamei T, Sakamoto Y, Hirano T, Hayata A, et al. Ongoing allergic rhinitis impairs asthma control by enhancing the lower airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(2):172-8.
24. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*108(5):S147-S334.

25. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8-160.
26. Bousquet J, Annesi-Maesano I, Carat F, Leger D, Rugina M, Pribil C, et al. Characteristics of intermittent and persistent allergic rhinitis: DREAMS study group. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(6):728-32.
27. Strachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(4):161-76.
28. Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Halonen M, Morgan W, Taussig LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics*. 1994;94(6 Pt 1):895-901.
29. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*. 2004;24(5):758-64.

30. Navarro A, Colas C, Anton E, Conde J, Davila I, Dordal MT, et al. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:7-13.
31. SEAIC, Alergia e Inmunología Abelló. *Alergológica. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España.*: Ed. Nilo. Industrias gráficas.; 1995.
32. Wang D-Y. Risk factors of allergic rhinitis: genetic or environmental? *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2005;1(2):115-23.
33. Persson CG, Andersson M, Greiff L, Svensson C, Erjefalt JS, Sundler F, et al. Airway permeability. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(9):807-14.
34. Alonso J. *Tratado de otorrinolaringología y broncoesofagología*. Madrid: Paz Montalvo; 1961.
35. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6880-4.

36. Lambrecht BN. The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(2):206-18.
37. Howarth PH, Salagean M, Dokic D. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. *Allergy*. 2000;55 Suppl 64:7-16.
38. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. Secretory activity of nasal mucosal mast cells and histamine release in hay fever. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988;87(4):349-60.
39. Greiff L, Erjefalt JS, Andersson M, Svensson C, Persson CG. Generation of clusters of free eosinophil granules (Cfegs) in seasonal allergic rhinitis. *Allergy*. 1998;53(2):200-3.
40. Howarth PH. ABC of allergies. Pathogenic mechanisms: a rational basis for treatment. *BMJ*. 1998;316(7133):758-61.
41. Winther L, Moseholm L, Reimert CM, Stahl Skov P, Kaergaard Poulsen L. Basophil histamine release, IgE, eosinophil counts, ECP, and EPX are related to the severity of symptoms in seasonal allergic rhinitis. *Allergy*. 1999;54(5):436-45.

42. Naclerio RM, Bachert C, Baraniuk JN. Pathophysiology of nasal congestion. *Int J Gen Med.* 2010;3:47-57.
43. Heppt W, Dinh QT, Cryer A, Zweng M, Noga O, Peiser C, et al. Phenotypic alteration of neuropeptide-containing nerve fibres in seasonal intermittent allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(7):1105-10.
44. Blackley C. Experimental Researches on the causes and nature of catarrhus aestivus. London: Bailliere, Tindall & Cox; 1873.
45. 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):215-22.
46. Caillaud D, Martin S, Segala C, Besancenot JP, Clot B, Thibaudon M. Effects of airborne birch pollen levels on clinical symptoms of seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;163(1):43-50.
47. Florido JF, Delgado PG, de San Pedro BS, Quiralte J, de Saavedra JM, Peralta V, et al. High levels of Olea

europaea pollen and relation with clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;119(2):133-7.

48. Ribeiro H, Oliveira M, Ribeiro N, Cruz A, Ferreira A, Machado H, et al. Pollen allergenic potential nature of some trees species: a multidisciplinary approach using aerobiological, immunochemical and hospital admissions data. *Environ Res.* 2009;109(3):328-33.

49. Frenz DA. Interpreting atmospheric pollen counts for use in clinical allergy: allergic symptomology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001;86(2):150-7.

50. Kneist W, Dungemann H, Gehrken H, Borelli S. Relationship of airborne pollens and spores to symptoms on the skin and mucous membranes of patients in the high altitude climate in Davos. *Experientia Suppl.* 1987;51:81-5.

51. Pelaez A, Morales, C. Rinitis alérgica. En: Pelaez A, Davila I, editores. *Tratado de Alergología.* Madrid: Ergon; 2007. p. 493-511.

52. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Allergy.* 1989;44 Suppl 10:1-59.

53. Liccardi G, Salzillo A, Spadaro G, Senna G, Canonica WG, D'Amato G, et al. Anaphylaxis caused by skin prick testing with aeroallergens: Case report and evaluation of the risk in Italian allergy services. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1410-2.
54. Pepys J. Skin testing. *Br J Hosp Med*. 1975;14:412-25.
55. Ma Y, Zhao J, Han ZR, Chen Y, Leung TF, Wong GW. Very low prevalence of asthma and allergies in schoolchildren from rural Beijing, China. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(8):793-9.
56. Flohr C, Weinmayr G, Weiland SK, Addo-Yobo E, Annesi-Maesano I, Bjorksten B, et al. How well do questionnaires perform compared with physical examination in detecting flexural eczema? Findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Two. *Br J Dermatol*. 2009;161(4):846-53.
57. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy,

Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1995;75(6 Pt 2):543-625.

58. Bousquet J, Lebel B, Dhivert H, Bataille Y, Martinot B, Michel FB. Nasal challenge with pollen grains, skin-prick tests and specific IgE in patients with grass pollen allergy. *Clin Allergy.* 1987;17(6):529-36.

59. Minshall EM, Cameron L, Lavigne F, Leung DY, Hamilos D, Garcia-Zepada EA, et al. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(6):683-90.

60. Eriksson NE. Allergy screening with Phadiatop and CAP Phadiatop in combination with a questionnaire in adults with asthma and rhinitis. *Allergy.* 1990;45(4):285-92.

61. Crobach MJ, Hermans J, Kaptein AA, Ridderikhoff J, Petri H, Mulder JD. The diagnosis of allergic rhinitis: how to combine the medical history with the results of radioallergosorbent tests and skin prick tests. *Scand J Prim Health Care.* 1998;16(1):30-6.

62. Dykewicz M, Corren, J. Rinitis, pólipos nasales, sinusitis y otitis media. En: Adelman DC, TB. Corren, J.,

editores. *Alergia e inmunología*. Madrid: Marban Libros; 2002. p. 56-9.

63. Droste JH, Kerhof M, de Monchy JG, Schouten JP, Rijcken B. Association of skin test reactivity, specific IgE, total IgE, and eosinophils with nasal symptoms in a community-based population study. The Dutch ECRHS Group. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(4):922-32.

64. Rondon C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, et al. Local allergic rhinitis: Concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1460-7.

65. Leonardi A, De Dominicis C, Motterle L. Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(5):429-35.

66. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1019-32.

67. Berdy GJ, Hedqvist B. Ocular allergic disorders and dry eye disease: associations, diagnostic dilemmas, and management. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*. 2000(230):32-7.

68. Bonini S, Bonini S. Studies of allergic conjunctivitis. *Int J Ophthalmol*. 2007;5:212-22.

69. Bloch-Michel E, Verin P. Ocular Allergy Observatory. National epidemiological survey of seasonal allergic keratoconjunctivitis seen in ophthalmology. *Allerg Immunol (Paris)*. 1995;27(6):182, 5-9.

70. Saraclar Y, Yigit S, Adalioglu G, Tuncer A, Tuncbilek E. Prevalence of allergic diseases and influencing factors in primary-school children in the Ankara Region of Turkey. *J Asthma*. 1997;34(1):23-30.

71. Alergológica. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedad alérgicas en España en 2005. Madrid: SEAIC, Schering-Plough; 2006.

72. Cerda i Trias M. Fisiopatogenia de la alergia ocular. En: Arrondo Murillo E, Bartra Tomas J., editores. Actualización en alergia ocular. Barcelona: Glosa; 2003.

73. Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, Depaoli M, Secchi AG, Plebani M. Tear and serum soluble

leukocyte activation markers in conjunctival allergic diseases. *Am J Ophthalmol.* 2000;129(2):151-8.

74. Butrus SI, Ochsner KI, Abelson MB, Schwartz LB. The level of tryptase in human tears. An indicator of activation of conjunctival mast cells. *Ophthalmology.* 1990;97(12):1678-83.

75. Ono SJ, Abelson MB. Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(1):118-22.

76. Aghayan-Ugurluoglu R, Ball T, Vrtala S, Schweiger C, Kraft D, Valenta R. Dissociation of allergen-specific IgE and IgA responses in sera and tears of pollen-allergic patients: a study performed with purified recombinant pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):803-13.

77. Church MK, McGill JI. Human ocular mast cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(5):419-22.

78. Uchio E, Ono SY, Ikezawa Z, Ohno S. Tear levels of interferon-gamma, interleukin (IL) -2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(1):103-9.

79. Stahl JL, Barney NP. Ocular allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(5):455-9.

80. Magone MT, Whitcup SM, Fukushima A, Chan CC, Silver PB, Rizzo LV. The role of IL-12 in the induction of late-phase cellular infiltration in a murine model of allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(2 Pt 1):299-308.

81. Sanchez-Hernandez MC, Montero J, Rondon C, Benitez del Castillo JM, Velazquez E, Herreras JM, et al. Consensus document on allergic conjunctivitis (DECA). *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2015;25(2):94-106.

82. Leonardi A. In-vivo diagnostic measurements of ocular inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(5):464-72.

83. Peshkin MM. A dry pollen ophtalmic test in pollen asthma and hayfever patients negative to cutaneous tests. *J Allergy.* 1932;3:20.

84. Friedlaender MH. Objective measurement of allergic reactions in the eye. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(5):447-53.

85. Cistero-Bahima A, Leonart Bonfill,R. Test de provocación conjuntival. En: Cistero-Bahima A, Leonart Bonfill,R., editores. Procedimientos en alergología. Barcelona: Elsevier Doyma; 2008.
86. Abelson MB, Chambers WA, Smith LM. Conjunctival allergen challenge. A clinical approach to studying allergic conjunctivitis. Arch Ophthalmol. 1990;108(1):84-8.
87. De la Torre F, Sanchez I, Matheu V, Alvarez J. Alergia ocular. En: Pelaez A, Davila I, editores. Tratado de Alergología. Madrid: Ergon; 2007. p. 562-8.
88. Arrondo Murillo E, Bartra Tomas J. Diagnostico diferencial de la alergia ocular. En: Arrondo Murillo E, Bartra Tomas J, editores. Actualizacion en alergia ocular. Barcelona: Glosa; 2003.
89. Giehl K, Valenta R, Rothkegel M, Ronsiek M, Mannherz HG, Jockusch BM. Interaction of plant profilin with mammalian actin. Eur J Biochem. 1994;226(2):681-9.
90. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position

statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813-24.

91. Quirce S. Asthma in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:14-20.

92. Navarro A, Valero A, Julia B, Quirce S. Coexistence of asthma and allergic rhinitis in adult patients attending allergy clinics: ONEAIR study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(4):233-8.

93. Weeke ER. Epidemiology of hay fever and perennial allergic rhinitis. *Monogr Allergy*. 1987;21:1-20.

94. Linneberg A, Henrik Nielsen N, Frolund L, Madsen F, Dirksen A, Jorgensen T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study. The Copenhagen Allergy Study. *Allergy*. 2002;57(11):1048-52.

95. Lombardi C, Passalacqua G, Gargioni S, Senna G, Ciprandi G, Scordamaglia A, et al. The natural history of respiratory allergy: a follow-up study of 99 patients up to 10 years. *Respir Med*. 2001;95(1):9-12.

96. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in

subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(1):52-9.

97. Darrow LA, Hess J, Rogers CA, Tolbert PE, Klein M, Sarnat SE. Ambient pollen concentrations and emergency department visits for asthma and wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):630-8 e4.

98. Antonicelli L, Micucci C, Voltolini S, Feliziani V, Senna GE, Di Blasi P, et al. Allergic rhinitis and asthma comorbidity: ARIA classification of rhinitis does not correlate with the prevalence of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(6):954-60.

99. Greisner WA, 3rd, Settipane RJ, Settipane GA. The course of asthma parallels that of allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Asthma Proc*. 2000;21(6):371-5.

100. Prieto L, Berto JM, Gutierrez V. Airway responsiveness to methacholine and risk of asthma in patients with allergic rhinitis. *Ann Allergy*. 1994;72(6):534-9.

101. Brasó J, Jorro G. Valoración de la presión antigénica ambiental. En: Brasó J, Jorro G, editores.

Manual de alergia clínica. Barcelona: Masson; 2003. p. 123-8.

102. Jones AM, Harrison RM. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. *Sci Total Environ.* 2004;326(1-3):151-80.

103. Ogden EC, Museum NYS, Service S, Commission USAE. *Manual for Sampling Airborne Pollen*: Hafner Press; 1974.

104. Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. *Annals of Applied Biology.* 1952;39(2):257-65.

105. Belmonte Soler J. Técnica para la captación e identificación de los pólenes. *Alergol Inmunol Clin.* 2003;18(Ex. 3):3.

106. Leuschner RM. Pollen. *Experientia.* 1993;49(11):931-42.

107. Accorsi C, Bandini M, Romano B. Allergenic polen: morphology and microscopic photographs. En: D'Amato G, Spieksma F, Bonini S, editores. *Allergenic pollen and pollunosis in Europe*. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 24-35.

108. Subiza FJ. Recuento de polenes. En: Pelaez A, Davila I, editores. Tratado de alergología. Madrid: Ergon; 2007. p. 415-24.
109. Solomon WR. Airborne pollen: a brief life. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(6):895-900.
110. Thommen A. Hay fever. En: Coca A, Walzer M, Thommen A, editores. *Asthma and hay fever in theory and practice.* Springfield, IL: CC Thomas; 1931. p. 487-528.
111. Neville W, Bush R, Ausdenmoore R, Lierl M. Aeroalérgenos. En: Adelman DC, TB. Corren, J., editores. *Alergia e inmunología.* Madrid: Marban Libros; 2002.
112. de Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(3):385-96.
113. Emberlin J. Aerobiología. En: Busse WW, Holgate S, editores. *Asma y rinitis Papel de los alérgenos en la vía aérea.* Barcelona: Blackwell Publishing; 2005.

114. Reid CE, Gamble JL. Aeroallergens, allergic disease, and climate change: impacts and adaptation. *Ecohealth*. 2009;6(3):458-70.

115. Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139(4):294-8.

116. Spieksma FT, Kramps JA, van der Linden AC, Nikkels BH, Plomp A, Koerten HK, et al. Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. *Clin Exp Allergy*. 1990;20(3):273-80.

117. Burge HA, Rogers CA. Outdoor allergens. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 4:653-9.

118. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):141-7.

119. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of

biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(4):847-52 e7.

120. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. *Allergy.* 1995;50(9):765-74.

121. Matthiesen F, Ipsen H, Lowenstein H. Pollen allergens. En: D'Amato G, Spiekma FthM, Bonini S, editores. *Allergenic pollen and Pollinosis in Europe.* London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 36-44.

122. van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992;98(2):97-104.

123. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure.* 1997;5(1):33-45.

124. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science.* 1991;253(5019):557-60.

125. Valenta R, Ball T, Vrtala S, Duchene M, Kraft D, Scheiner O. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(1):106-18.
126. Barber D. Gramíneas: alérgenos y reactividad cruzada. *Alergol Inmunol Clin*. 2003;18(Extra 3):12-8.
127. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*. 2006;61(4):461-76.
128. Pauli G, Metz-Favre C. Cross reactions between pollens and vegetable food allergens. *Rev Mal Respir*. 2013;30(4):328-37.
129. Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:543195.
130. Hoffmann-Sommergruber K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in

common? *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;122(3):155-66.

131. Halmepuro L, Vuontela K, Kalimo K, Bjorksten F. Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984;74(3):235-40.

132. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Wissenbach M, Spangfort MD, et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol.* 2000;165(1):331-8.

133. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1999;55(2):85-97.

134. Schenk MF, Cordewener JH, America AH, Van't Westende WP, Smulders MJ, Gilissen LJ. Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC Plant Biol.* 2009;9:24.

135. Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, Ferreira F, Sperr WR, Valent P, et al. Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90(6 Pt 1):927-36.
136. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214(2):538-51.
137. Markovic-Housley Z, Basle A, Padavattan S, Maderegger B, Schirmer T, Hoffmann-Sommergruber K. Structure of the major carrot allergen Dau c 1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2009;65(Pt 11):1206-12.
138. Somssich IE, Schmelzer E, Kawalleck P, Hahlbrock K. Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol Gen Genet.* 1988;213(1):93-8.
139. Rohac M, Birkner T, Reimitzer I, Bohle B, Steiner R, Breitenbach M, et al. The immunological relationship

of epitopes on major tree pollen allergens. *Mol Immunol.* 1991;28(8):897-906.

140. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(4):259-68.

141. Gonzalez-Rioja R, Asturias JA, Martinez A, Goni FM, Viguera AR. Par j 1 and Par j 2, the two major allergens in *Parietaria judaica*, bind preferentially to monoacylated negative lipids. *FEBS J.* 2009;276(6):1762-75.

142. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1 Pt 1):27-36.

143. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, et al. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;122(1):20-32.

144. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Ispano M, Fortunato D, Monza M, et al. Clinical role of a lipid

transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(5):1099-106.

145. Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M, et al. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(2 Pt 1):371-7.

146. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(4):900-7.

147. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, et al. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;756(1-2):95-103.

148. Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(6 Pt 1):728-33.

149. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, et al. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(3 Pt 1):520-6.

150. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy*. 1988;61(6 Pt 2):47-52.
151. Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(3 Pt 1):514-9.
152. Fernandez-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(9):1239-47.
153. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol*. 1975;4(2):203-8.
154. Verdino P, Barderas R, Villalba M, Westritschnig K, Valenta R, Rodriguez R, et al. Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *J Immunol*. 2008;180(4):2313-21.
155. Hayek B, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, Valent P, Vrtala S, et al. Molecular and immunologic characterization of a highly cross-reactive two EF-hand

calcium-binding alder pollen allergen, Aln g 4: structural basis for calcium-modulated IgE recognition. *J Immunol.* 1998;161(12):7031-9.

156. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. *Allergy.* 2001;56(12):1180-5.

157. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodriguez 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(6):1192-8.

158. Burastero SE. Pollen-cross allergenicity mediated by panallergens: a clue to the pathogenesis of multiple sensitizations. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006;5(4):203-9.

159. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(10):1442-60.

160. Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L. N-glycoprotein

biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol*. 1998;38(1-2):31-48.

161. Ball T, Vrtala S, Sperr WR, Valent P, Susani M, Kraft D, et al. Isolation of an immunodominant IgE hapten from an epitope expression cDNA library. Dissection of the allergic effector reaction. *J Biol Chem*. 1994;269(45):28323-8.

162. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1981;68(5):356-64.

163. Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*. 2001;56(6):478-90.

164. Esteve C, Montealegre C, Marina ML, Garcia MC. Analysis of olive allergens. *Talanta*. 2012;92:1-14.

165. Vrtala S, Grote M, Duchene M, van Ree R, Kraft D, Scheiner O, et al. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102(2):160-9.

166. Beggs PJ. Impacts of climate change on aeroallergens: past and future. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(10):1507-13.
167. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2007;62(9):976-90.
168. Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A. Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. En: Pelaez A, Davila I, editores. *Tratado de alergología*. Madrid: Ergon; 2007. p. 426-42.
169. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antepara I, Colas C, Davila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1764-73.
170. D'Amato G, Spieksma F, Bonini S. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. Oxford: Blackwell Science; 1991.
171. Esch RE. Grass pollen allergens. *Clin Allergy Immunol*. 2004;18:185-205.
172. Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Grant JH, Meyers DA, Marsh DG. A study of the human immune response

to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. *J Allergy Clin Immunol.* 1986;78(6):1190-201.

173. Popescu FD. Molecular biomarkers for grass pollen immunotherapy. *World J Methodol.* 2014;4(1):26-45.

174. Subiza JFB, F. Pola, J. Moral, A. Fernandez, J. Jerez, M. Ferreira, M. Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin.* 2003;13:45-58.

175. Davies JM. Grass pollen allergens globally: the contribution of subtropical grasses to burden of allergic respiratory diseases. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(6):790-801.

176. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy.* 2008;63(3):310-26.

177. Au LC, Lin ST, Peng HJ, Liang CC, Lee SS, Liao CD, et al. Molecular cloning and sequence analysis of full-length cDNAs encoding new group of Cyn d 1 isoallergens. *Allergy*. 2002;57(3):215-20.
178. Murdock KK, Robinson EM, Adams SK, Berz J, Rollock MJ. Family-school connections and internalizing problems among children living with asthma in urban, low-income neighborhoods. *J Child Health Care*. 2009;13(3):275-94.
179. Valenta R, Vrtala S, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(4):287-94.
180. Focke-Tejkl M, Campana R, Reininger R, Lupinek C, Blatt K, Valent P, et al. Dissection of the IgE and T-cell recognition of the major group 5 grass pollen allergen Phl p 5. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):836-45 e11.
181. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130(2):87-107.

182. Hrabina M, Peltre G, Van Ree R, Moingeon P. Grass pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy Reviews*. 2008;8(1):7-11.

183. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol*. 1999;163(10):5489-96.

184. Smith PM, Avjioglu A, Ward LR, Simpson RJ, Knox RB, Singh MB. Isolation and characterization of group-I isoallergens from Bermuda grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;104(1):57-64.

185. Subiza J, Jerez M, Jimenez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S, et al. Allergenic pollen pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96(1):15-23.

186. Alisi C, Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Tinghino R, Butteroni C, et al. Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen. *Allergy*. 2001;56(10):978-84.

187. López Rico R. Alergia a Betulaceas. *Alergol Inmunol Clin.* 2003;18(Extra 3):68-70.
188. Mothes N, Horak F, Valenta R. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;135(4):357-73.
189. Boluda L, Sastre J, Casanovas M, Fernandez-Caldas E. Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry. Validation by skin-prick testing. *J Immunol Methods.* 1999;223(1):17-26.
190. Lombardero M, Obispo T, Calabozo B, Lezaun A, Polo F, Barber D. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. *Allergy.* 2002;57 Suppl 71:29-34.
191. Martinez A, Asturias JA, Monteseirin J, Moreno V, Garcia-Cubillana A, Hernandez M, et al. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy.* 2002;57 Suppl 71:17-23.
192. Quiralte J, Llanes E, Barral P, Arias de Saavedra JM, Saenz de San Pedro B, Villalba M, et al. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic

restrictions in olive pollen allergy. *Allergy*. 2005;60(3):360-5.

193. Quiralte J, Sanchez-Garcia F, Torres MJ, Blanco C, Castillo R, Ortega N, et al. Association of HLA-DR11 with the anaphylactoid reaction caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(4):685-9.

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

195. Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(4 Pt 1):797-802.

196. Huecas S, Villalba M, Rodriguez R. 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*. 2001;276(30):27959-66.

197. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization

profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008;63(11):1550-8.

198. Hemmer W, Focke M, Wantke F, Gotz M, Jarisch R, Jager S. Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy*. 2000;55(10):923-30.

199. Carinanos P, Alcazar P, Galan C, Dominguez E. Privet pollen (*Ligustrum* sp.) as potential cause of pollinosis in the city of Cordoba, south-west Spain. *Allergy*. 2002;57(2):92-7.

200. D'Amato G, Mullins J, Nolard N, Spieksma FT, Wachter R. City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VII. Oleaceae (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*). *Clin Allergy*. 1988;18(6):541-7.

201. Subiza J, Cabrera M, Valdivieso R, Subiza JL, Jerez M, Jimenez JA, et al. Seasonal asthma caused by airborne *Platanus* pollen. *Clin Exp Allergy*. 1994;24(12):1123-9.

202. Spieksma FT, Charpin H, Nolard N, Stix E. City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). IV. Summer weed pollen (*Rumex*,

Plantago, Chenopodiaceae, Artemisia), 1976 and 1977. Clin Allergy. 1980;10(3):319-29.

203. Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. Biology of weed pollen allergens. Curr Allergy Asthma Rep. 2004;4(5):391-400.

204. Giner MM. Unexpected pollinosis or insufficient pollen records? Importance of regional monitoring. Int J Environ Health Res. 2002;12(2):187-92.

205. Wopfner N, Gadermaier G, Egger M, Asero R, Ebner C, Jahn-Schmid B, et al. The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen. Int Arch Allergy Immunol. 2005;138(4):337-46.

206. Asero R, Wopfner N, Gruber P, Gadermaier G, Ferreira F. Artemisia and Ambrosia hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? Clin Exp Allergy. 2006;36(5):658-65.

207. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. Curr Allergy Asthma Rep. 2010;10(5):326-35.

208. Oberhuber C, Ma Y, Wopfner N, Gadermaier G, Dedic A, Niggemann B, et al. Prevalence of IgE-binding

to Art v 1, Art v 4 and Amb a 1 in mugwort-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;145(2):94-101.

209. Jahn-Schmid B, Hauser M, Wopfner N, Briza P, Berger UE, Asero R, et al. Humoral and cellular cross-reactivity between Amb a 1, the major ragweed pollen allergen, and its mugwort homolog Art v 6. *J Immunol.* 2012;188(3):1559-67.

210. Villalba M, Barderas R, Mas S, Colas C, Batanero E, Rodriguez R. Amaranthaceae Pollens: Review of an emerging allergy in the mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(6):371-81.

211. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodriguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(1):47-54.

212. Barderas R, Villaba M, Batanero E, Pascual CY, Rodriguez R. Role of profilin and polcalcin in chenopod pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(5):1132-3.

213. Carnes J, Fernandez-Caldas E, Marina A, Alonso C, Lahoz C, Colas C, et al. Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen

extracts. Purification of the allergen Sal k 1. *Allergy*. 2003;58(11):1152-6.

214. Colas C, Monzon S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, et al. Correlation between Chenopodiacea/Amaranthacea pollen counts and allergic symptoms in *Salsola kali* monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005;15(4):254-8.

215. D'Amato G, Ruffilli A, Sacerdoti G, Bonini S. *Parietaria* pollinosis: a review. *Allergy*. 1992;47(5):443-9.

216. Colombo P, Bonura A, Costa M, Izzo V, Passantino R, Locorotondo G, et al. The allergens of *Parietaria*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130(3):173-9.

217. Duro G, Colombo P, Costa MA, Izzo V, Porcasi R, Di Fiore R, et al. cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett*. 1996;399(3):295-8.

218. Corbi AL, Carreira J. Identification and characterization of *Parietaria judaica* allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984;74(4):318-23.

219. Luengo OC, A. Polinosis por parietaria. Rev Esp Alergol Inmunol Clin. 2003;18:61-85.
220. Stumvoll S, Westritschnig K, Lidholm J, Spitzauer S, Colombo P, Duro G, et al. Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(5):974-9.
221. Calabozo B, Diaz-Perales A, Salcedo G, Barber D, Polo F. Cloning and expression of biologically active *Plantago lanceolata* pollen allergen Pla I 1 in the yeast *Pichia pastoris*. Biochem J. 2003;372(Pt 3):889-96.
222. Wyman D. Wymans' Gardening Encyclopedia. New York, N.Y.: MacMillian Publishing Co; 1977.
223. Munuera Giner M, Carrión García J, Navarro Camacho C, Orts Llopis L, Espín Gea A, Sáez Soto F, et al. Polen y alergias. Guía de las plantas de polen alergógeno de la Región de Murcia y España.: Diego Marín librero editor; 2001.
224. Pagan Aleman A, Felix Toledo R, Martínez Quesada J, García Sellés F, Ferrer Torres A, Martos Calahorro M, et al. Alérgenos. En: Negro JM, editores. Rinitis alérgica Mecanismos y tratamiento. Barcelona: Gráficas Rotativas; 2004. p. 185-6.

225. Yman L. Botanical relations and immuno-logical cross-reactions in pollen allergy. 2nd ed. Uppsala. Sweden: Pharmacia Diagnostics AB; 1982.
226. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011;66(8):989-98.
227. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
228. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012;67(1):18-24.
229. Ceska M, Lundkvist U. A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry*. 1972;9(10):1021-30.
230. Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*. 1967;2(7526):1105-7.
231. Esch RE, Hartsell CJ, Crenshaw R, Jacobson RS. Common allergenic pollens, fungi, animals, and

arthropods. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2001;21(2-3):261-92.

232. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-79.

233. Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW. Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr Biol.* 1994;4(3):215-9.

234. Philip G, van Adelsberg J, Loeys T, Liu N, Wong P, Lai E, et al. Clinical studies of the DP1 antagonist laropiprant in asthma and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):942-8 e1-9.

235. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

236. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric

characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1(6):2856-60.

237. Scheiner O, Breiteneder H, Dolocek C, Duchene M, Ebner C, Ferreira F, et al. Molecular and functional characterization of allergens: basic and practical aspects. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M. 1994(87):221-32; discussion 33-4.

238. Asociación médica mundial. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Fortaleza (Brasil)2013. Disponible desde: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>.

239. Huertas AJ MJ, García-Cervantes AM. Prevalencia de sensibilización cutánea a polen de palmera y de morera en el sureste español. Alergol Inmunol Clin. 2002;17:193-6.

240. Gonzalez Romano ML, Candau P, Gonzalez Minero FJ. Pollen calendar of Seville and its relation to allergies. J Investig Allergol Clin Immunol. 1992;2(6):323-8.

241. Hernández Prieto M, Lorente Toledano F, Romo Cortina A, Dávila González I, A Calvo Bullón ELYa. Pollen calendar of the city of Salamanca (Spain). Aeropalynological analysis for 1981-1982 and 1991-1992. *Allergol Immunopathol.* 1998;26(5):209-22.
242. García-Mozo H, Pérez-Badia R, Fernández-González F, Galán C. Airborne pollen sampling in Toledo, Central Spain. *Aerobiologia.* 2006;22(1):55-66.
243. Erkara IP, Cingi C, Ayranci U, Gurbuz KM, Pehlivan S, Tokur S. Skin prick test reactivity in allergic rhinitis patients to airborne pollens. *Environ Monit Assess.* 2009;151(1-4):401-12.
244. Singh AB, Kumar P. Aeroallergens in clinical practice of allergy in India. An overview. *Ann Agric Environ Med.* 2003;10(2):131-6.
245. Gonzalo-Garijo MA, Tormo-Molina R, Muñoz-Rodríguez AF, Silva-Palacios I. Differences in the spatial distribution of airborne pollen concentrations at different urban locations within a city. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2006;16(1):37-43.
246. Marcos C, Rodríguez FJ, Luna I, Jato V, González R. Pinus pollen aerobiology and clinical sensitization in

northwest Spain. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001;87(1):39-42.

247. Leonardi A, Battista MC, Gismondi M, Fregona IA, Secchi AG. Antigen sensitivity evaluated by tear-specific and serum-specific IgE, skin tests, and conjunctival and nasal provocation tests in patients with ocular allergic disease. *Eye (Lond).* 1993;7 (Pt 3):461-4.

248. Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira ED, Ebner C, Barisani T, Korninger L, Kraft D, et al. Detection of allergen-specific IgE in tears of grass pollen-allergic patients with allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy.* 1996;26(1):79-87.

249. Leonardi A, Fregona IA, Gismondi M, Daniotti E, Carniel G, Secchi AG. Correlation between conjunctival provocation test (CPT) and systemic allergometric tests in allergic conjunctivitis. *Eye (Lond).* 1990;4 (Pt 5):760-4.

250. Radcliffe MJ, Lewith GT, Prescott P, Church MK, Holgate ST. Do skin prick and conjunctival provocation tests predict symptom severity in seasonal allergic rhinoconjunctivitis? *Clin Exp Allergy.* 2006;36(12):1488-93.

251. Lipiec A, Rapiejko P, Samolinski B, Krzych E. Correlation between conjunctival provocation test results and conjunctival symptoms in pollinosis - preliminary report. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(1):17-20.
252. Gastaminza G, Lombardero M, Bernaola G, Antepara I, Munoz D, Gamboa PM, et al. Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(9):1438-46.
253. Niederberger V, Purohit A, Oster JP, Spitzauer S, Valenta R, Pauli G. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(6):933-41.
254. Varela S, Subiza J, Subiza JL, Rodriguez R, Garcia B, Jerez M, et al. Platanus pollen as an important cause of pollinosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(6 Pt 1):748-54.
255. Abedini S, Sankian M, Falak R, Tehrani M, Talebi F, Shirazi FG, et al. An approach for detection and quantification of fruits' natural profilin: natural melon profilin as a model. *Food Agric Immunol.* 2011;22(1):47-55.

256. Hemmer W, Focke M, Marzban G, Swoboda I, Jarisch R, Laimer M. Identification of Bet v 1-related allergens in fig and other Moraceae fruits. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):679-87.

257. Ruiz-Garcia M, Garcia Del Potro M, Fernandez-Nieto M, Barber D, Jimeno-Nogales L, Sastre J. Profilin: a relevant aeroallergen? *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(2):416-8.

258. Ayuso R, Polo F, Crimi N, Palermo B, Mistretta A, Carreira J. Cross-reactivity between *Morus alba* and *Parietaria judaica* pollen allergens. *Folia Allergol (Roma)*. 1990;37:25-33.

259. Micheal S, Wangorsch A, Wolfheimer K, Foetisch K, Minhas K. Immunoglobulin E reactivity and allergenic potency of *Morus papyrifera* (paper mulberry) pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(3):168-75.

260. Allergome. [Internet]. 2013. Disponible desde: <http://www.allergome.org>.

261. Ciardiello MA, Palazzo P, Bernardi ML, Carratore V, Giangrieco I, Longo V, et al. Biochemical, immunological and clinical characterization of a cross-

reactive nonspecific lipid transfer protein 1 from mulberry. *Allergy*. 2010;65(5):597-605.

262. Hiller KM, Lubahn BC, Klapper DG. Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. *Scand J Immunol*. 1998;48(1):26-36.

263. Ayuso R, Carreira J, Lombardero M, Duffort O, Peris A, Basomba A, et al. Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Mol Immunol*. 1993;30(15):1347-54.

264. Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, et al. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(2):115-22.

265. Munoz FJ, Delgado J, Palma JL, Gimenez MJ, Monteseirin FJ, Conde J. Airborne contact urticaria due to mulberry (*Morus alba*) pollen. *Contact Dermatitis*. 1995;32(1):61.

266. Navarro AM, Orta JC, Sanchez MC, Delgado J, Barber D, Lombardero M. Primary sensitization to *Morus alba*. *Allergy*. 1997;52(11):1144-5.

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del protocolo: SENSIBILIZACIÓN A POLEN DE MORERA Y REACTIVIDAD CRUZADA CON OTROS POLENES

Investigador principal: DAVID EL-QUTOB LÓPEZ

Sede donde se realizará el estudio: CLÍNICA ATENEA C. /XEST, 16 (ALDAIA, VALENCIA)

Nombre _____ del _____ paciente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. La alergia a polen de morera no está suficientemente investigada en el área de Valencia.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos determinar la relevancia de las pruebas positivas en piel a polen de morera y su reactividad cruzada con otros pólenes.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Los resultados del estudio servirán para determinar la conveniencia de recibir una vacuna antialérgica de polen de morera. Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas pruebas complementarias como son pruebas cutáneas, prueba de provocación ocular y extracción sanguínea.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de las siguientes fases:

La primera implica pruebas cutáneas con control positivo con histamina que produce un habón utilizado como referencia y que desaparece en minutos. En la segunda parte del estudio se le aplicarán concentraciones crecientes de polen de morera en la conjuntiva para comprobar la relevancia de la prueba cutánea positiva. Puede ocurrir excepcionalmente un edema conjuntival que en ningún caso afecta a la visión y es de carácter transitorio. Durante el estudio se realizará una extracción sanguínea y posterior a la toma de sangre se puede presentar dolor y/o se puede llegar a formar una pequeña moradura.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

6. ACLARACIONES

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.

Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.

No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.

No recibirá pago por su participación.

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dr. Antonio Alberola Aguilar

Profesor del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia

Teléfono: 963864646

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

 noviembre de 2015
Firma del participante

30 de
Fecha

He explicado al Sr(a). _____ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.
 Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

 noviembre de 2015
Firma del investigador

30 de
Fecha

8. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo: SENSIBILIZACIÓN A POLEN DE MORERA Y REACTIVIDAD CRUZADA CON OTROS POLENES

Investigador principal: DAVID EL-QUTOB LÓPEZ

Sede donde se realizará el estudio: CLÍNICA ATENEA C.
/CHESTE, 16 (ALDAIA-VALENCIA)

Nombre _____ del _____ participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este
protocolo de investigación por las siguientes razones:

**Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea
entregada toda la información que se haya recabado sobre él,
con motivo de su participación en el presente estudio.**

Firma del participante

Fecha