



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

TESIS DOCTORAL:

**APLICACIÓN Y UTILIDAD DEL
DIAGNÓSTICO BASADO EN
COMPONENTES MOLECULARES EN
PACIENTES ALERGICOS A POLEN DE
CUPRESACEAS**

**Presentada por DR. PEDRO CARRETERO
ANIBARRO para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid**

**Dirigida por:
Dra. Dña. ALICIA ARMENTIA MEDINA
Dr. D. JOSE MARIA TREJO GABRIEL Y GALAN.**

A mi mujer Pilar y a mis hijas, Clara y Marina, por su apoyo y el tiempo que les he
robado para este proyecto.

A mis padres Pedro y Avelina, seguro que a el le hubiera hecho mucha ilusión ver este
trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis, la Dra. Alicia Armentia y Jose Maria Trejo, el interés y apoyo que han mostrado en la elaboración de este trabajo.

Aunque ahora son mis compañeros en su día fueron mis maestros: Sonsoles y Juan, que marcaron el inicio de mi camino profesional. A Mar, otra de mis maestras, que fue la que me inculco la curiosidad en la Aerobiología. Un recuerdo a Ignacio Moneo con el que aprendimos la inmunología y a María Luisa con la que seguimos trabajando.

A Ana Tabar por confiar en mi cuando acabe la residencia.

A mis compañeros, los que están y los que cambiaron de ciudad, porque me han ayudado en este tiempo y a la grata relación que tenemos.

A Fernando de la Torre, que ha hecho mucho por que este proyecto saliera: desde su estructura así como conseguir los medios para que se hiciera. Muchas gracias

A todos aquellos amigos y compañeros que no me caben en la dedicatoria. Vosotros sabéis quienes sois.

INDICE

INDICE	5
ABREVIATURAS	17
1INTRODUCCIÓN	19
1.1 ALERGIA AL POLEN	20
1.1.1 La reacción alérgica	20
1.1.2 Polinosis	23
1.1.3 Polinosis en Burgos	26
1.1.4 Alérgenos de los pólenes	28
1.1.4.1 Localización de los alérgenos	28
1.1.4.2 Contaminación y cambio climático	31
1.1.4.3 Funciones bioquímicas de los alérgenos de los pólenes	32
1.1.4.3.1 Alérgenos de polen de gramíneas	33
1.1.4.3.2 Alérgenos de pólenes de árboles	33
1.1.4.3.3 Alérgenos de pólenes de malezas	34
1.1.5 Alérgenos de reactividad cruzada	36
1.1.5.1 Definición de reactividad cruzada	36
1.1.5.2 Reactividad cruzada entre pólenes	37

1.1.5.2.1	<i>Profilinas</i>	40
1.1.5.2.2	<i>Polcalcinas</i>	40
1.1.5.2.3	<i>Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas. PR-10</i>	41
1.1.5.2.4	<i>Determinantes de los carbohidratos de reactividad cruzada (CCD)</i>	41
1.1.5.2.5	<i>Proteínas transportadoras de lípidos - LTP</i>	43
1.1.5.2.6	<i>Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas. Taumatinas</i>	44
1.1.5.3	Reactividad cruzada entre pólenes y alimentos	45
1.2	DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS	46
1.2.1	Evolución histórica	46
1.2.1.1	Historia clínica	46
1.2.1.2	Pruebas cutáneas	46
1.2.1.3	Determinación de la IgE específica	47
1.2.1.4	Limitaciones actuales de los extractos	48
1.2.1.5	Evolución de los métodos diagnósticos	49
1.2.2	Diagnóstico por componentes moleculares	50
1.3	RECUENTOS DE POLEN	56

1.3.1 Utilidad clínica de los recuentos de pólenes.....	57
1.3.2 Factores que pueden interferir en la correlación recuentos-síntomas.....	59
1.3.3 Interpretación de los Resultados.....	63
1.4 LAS CUPRESÁCEAS O CUPRESSACEAE COMO FUENTE DE ALÉRGENOS.....	64
1.4.1 Introducción.....	64
1.4.2 Taxonomía de las cupresáceas.....	64
1.4.3 Características botánicas, distribución, usos y etnografía.....	66
1.4.3.1 <i>Cupressus</i>	67
1.4.3.2 <i>Juniperus</i>	69
1.4.3.2.1 Enebros.....	69
1.4.3.2.2 Sabinas.....	70
1.4.3.3 Otras especies.....	72
1.4.4 Morfología del polen de Cupressaceae.....	73
1.4.5 Aerobiología del polen de Cupressaceae.....	74
1.4.6 Polinosis de de las cupresáceas.....	77
1.4.6.1 Referencias.....	77
1.4.6.2 Prevalencia de la polinosis por cupresáceas.....	77
1.4.6.3 Características de la polinosis por cupresáceas.....	81

1.4.6.3.1	<i>Alergenicidad del polen de cupresáceas</i>	81
1.4.6.3.2	<i>Aspectos clínicos</i>	83
1.4.6.3.3	<i>Historia natural</i>	85
1.4.6.3.4	<i>Diagnostico</i>	87
1.4.7	Componentes moleculares alergénicos de las cupresáceas	89
1.4.7.1	Grupo 1: Pectatoliasas	91
1.4.7.2	Grupo 2: Poligalacturonasas	92
1.4.7.3	Grupo 3: Proteínas relacionadas con la patogénesis	92
1.4.7.4	Grupo 4: Proteínas de unión al calcio	93
1.4.7.5	Otros alérgenos	94
1.4.8	Reactividad cruzada del polen de cupresáceas	96
1.4.8.1	Reactivida cruzada polen-polen	96
1.4.8.1	Reactivida cruzada polen-alimentos	97
2	HIPÓTESIS	99
3	OBJETIVOS	102
3.1	Objetivos principales	103

3.2	Objetivos secundarios.....	103
3.3	Objetivos exploratorios.....	103
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	104
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	105
4.2	SELECCIÓN DE PACIENTES.....	105
4.2.1	Ámbito del estudio.....	105
4.2.2	Criterios de inclusión.....	106
4.2.3	Criterios de exclusión.....	106
4.2.4	Pérdida de pacientes.....	107
4.2.5	Procedimiento de confidencialidad.....	107
4.2.6	Características clínicas.....	107
4.3	PRUEBAS CUTÁNEAS (PRICK-TEST O PRUEBAS INTRAEPIDÉRMICAS).....	108
4.4	DETERMINACIONES DE LA IgE ESPECIFICA.....	110
4.4.1	IgE específica frente a extractos totales y frente a componentes moleculares.....	110
4.5	DATOS AEROBIOLÓGICOS.....	111

4.5.1	Técnica de recolección.....	111
4.5.2	Estación polínica: cálculo de los periodos principales de polinización.....	115
4.5.3	Graficas de polinización.....	116
4.6	PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	117
4.6.1	Análisis descriptivos.....	117
4.6.2	Análisis bivariante.....	117
4.6.3	Concordancia entre marcadores (Positivo/Negativo).....	117
4.6.4	Estimación y comparación curvas ROC.....	117
5	RESULTADOS.....	119
5.1	DATOS AEROBIOLÓGICOS.....	120
5.1.1	Datos aerobiológicos del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae en la atmósfera de Burgos en el periodo 2000-2016.....	120
5.1.1.1	Recuentos de Cupressaceae/Taxodiaceae.....	120
5.1.1.2	Periodo Principal de Polinización Cupressaceae/Taxaceae.....	123
5.1.2	Datos aerobiológicos del taxón Poaceae (Gramíneas) en la atmósfera de Burgos en el periodo 2000-2016.....	124
5.1.2.1	Recuentos del taxón Poaceae.....	124

5.1.2.2	Periodo Principal de Polinización.....	125
5.1.3	Recuentos de los taxones <i>Plantago</i> , <i>Olea</i> , <i>Fraxinus</i> y <i>Platanus</i> de los años 2001-2016.....	126
5.1.3.1	<i>Plantago</i>	126
5.1.3.2	Familia Oleaceae.....	127
5.1.3.3	<i>Platanus</i>	129
5.2	DATOS DESCRIPTIVOS.....	130
5.2.1	Datos socio-demográficos.....	130
5.2.2	Datos clínicos.....	131
5.2.3	Diagnóstico alergológico.....	131
5.2.3.1	Pruebas cutáneas - Prick test (SPT).....	131
5.2.3.2	Determinaciones de IgE específica y componentes moleculares.....	134
5.2.3.3	Determinaciones de IgE específica a Determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada (CCD).....	135
5.3	COMPARACIÓN ENTRE DATOS ANALÍTICOS. RELACIÓN ENTRE IgE Y LAS PRUEBAS CUTÁNEAS (SPT).....	136
5.4	MEDIDAS DE CORRELACIÓN. COMPARATIVA ENTRE LAS PRUEBAS DE CUPRESÁCEAS.....	137

5.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES.....	143
5.6	COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS A CIPRÉS Y PACIENTES SENSIBILIZADOS A CIPRÉS Y GRAMÍNEAS.....	145
6	DISCUSIÓN.....	153
6.1	INTRODUCCIÓN.....	154
6.2	INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS AEROBIOLÓGICOS.....	156
	6.2.1 Taxón <i>Cupressaceae/Taxodiaceae</i>	156
	6.2.1.1 Recuentos.....	156
	6.2.1.2 Periodo Principal de Polinización de cupresáceas: Periodo de máxima producción de polen <i>Cupressaceae/ Taxodiaceae</i>	157
	6.2.2 Recuentos del taxón <i>Poaceae</i> (gramíneas). Periodo Principal de Polinización.....	157
	6.2.3 Comparativa de los Periodos Principales de Polinización de cupresáceas y gramíneas.....	158
	6.2.4 Recuentos de los taxones <i>Plantago</i> , <i>Oleácea</i> y <i>Platanus</i> de los años 2001-2016.....	158
	6.2.4.1 <i>Plantago</i>	158

6.2.4.2	<i>Familia Oleaceae</i>	159
6.2.4.3	<i>Platanus</i>	159
6.2.5	Interpretación de la Polisensibilizaciones.....	160
6.3	VALORACIÓN DE LA APORTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR COMPONENTES MOLECULARES EN LA PRECISIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA AL POLEN DE CUPRESÁCEAS. nCup a 1 COMO MARCADOR DE SENSIBILIZACIÓN GENUINA A CUPRESÁCEAS.....	161
6.4	RELACIÓN ENTRE PRUEBA CUTÁNEA a <i>C arizonica</i>, <i>C sempervirens</i>, sIgE a <i>C arizonica</i> e IgE a nCup a 1.....	162
6.5	PUNTOS ÓPTIMOS DE CORTE EN EL DIAGNÓSTICO TRADICIONAL.....	163
6.5.1	Puntos de corte IgE a SPT de <i>C arizonica</i>	163
6.5.2	Puntos de corte IgE a SPT de <i>C sempervirens</i>	163
6.5.3	Puntos de corte sIgE a extracto de <i>C arizonica</i>	163
6.6	FENOTIPO DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A CUPRESÁCEAS EN NUESTRA ÁREA.....	163
6.6.1	Datos sociodemográficos.....	163
6.6.2	Características clínicas.....	164
6.6.3	Resultados de SPT.....	164

6.7 DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS (UNA ÚNICA SENSIBILIZACIÓN ALERGÉNICA)/POLISENSIBILIZADOS A OTROS PÓLENES Y CUALES SON	165
6.7.1 Identificación de las sensibilizaciones según los resultados de SPT	165
6.7.2 Monosensibilización y cosensibilización según nCup a 1/ Phl p1-5	165
6.7.3 Caracterización de los pacientes.	166
6.8 EVALUACIÓN LA SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA.	166
6.8.1 Comparativa en las pruebas diagnósticas según los dos fenotipos.	166
6.8.1.1 Comparativa de las SPT	166
6.8.1.2 Comparativa de las IgE específica	166
6.8.2 Valoración de los resultados de la sensibilización a alérgenos de reactividad cruzada	167
6.8.2.1 Profilina	167
6.8.2.2 Polcalcina	167
6.8.2.3 LTP	167
6.8.2.4 Determinantes de los carbohidratos de reactividad cruzada (CCD)	168

7	CONCLUSIONES	171
8	INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	175
	8.1 RELACION DE LAS TABLAS RESEÑADAS EN EL TEXTO	
	8.1 RELACION DE LAS FIGURAS RESEÑADAS EN EL TEXTO	
9	ANEXOS	182
9.1	HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE	183
9.2	CONSENTIMIENTO INFORMADO	185
9.3	CONSENTIMIENTO INFORMADO SUBROGADO A MENORES	186
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ..	187

ABREVIATURAS

Alergológica: Estudio de factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España. Años 2015, 2005 y 1992 realizado por la SEAIC.

APC: célula presentadora de antígenos

ADN: ácido desoxirribonucleico

AUC: Area under the curve. Area bajo la curva

C arizonica: *Cupressus arizonica*

CCD: Determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada

CD4: Molécula de superficie del linfocito T cooperador

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

CRD Component resolved diagnosis: diagnóstico por componentes alérgicos

C sempervirens: *Cupressus sempervirens*

DE: Desviación estándar

DMP: Diámetro medio de pápula en el prick test

EAACI: Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica

ELISA: Enzima inmuno ensayo en fase sólida

FcεRI: receptor de alta afinidad de IgE

HPS: reacciones de hipersensibilidad

IgE: Inmunoglobulina E

IgG, IgM o IgA: Inmunoglobulina G, M o A

IL: Interleucina

ISAC: Immuno-Solid phase Allergen Chip - Chip de inmunoensayo de alérgenos en fase sólida

ITE: inmunoterapia específica

IC: Intervalo de confianza

LTP: proteínas transportadora de lípidos

MUXF3: N-glicano purificado de la bromelina

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas

RAST (Radio Allergo Sorbent Test): Prueba de radioalergoadsorción

RNC: rinoconjuntivitis

SEAIC Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

sIgE: IgE específica

SPT: Skin prick test. Técnica de puntura en las pruebas cutáneas in vivo

Th: linfocito T helper

TLP (Thaumatococcus like proteins) Taumatinas

1 INTRODUCCION

1.1 ALERGIA AL POLEN

1.1.1 La reacción alérgica

El término alergia es un apócope del griego *αλλος* (allos = otro), *εργον* (ergon = acción, trabajo) y el sufijo *-ια*, (acción, cualidad). Su semántica se refiere a una sobreexcitación biológica del cuerpo al encontrarse con alguna sustancia que es tolerable para la gente "normal" (mayoría). Fue acuñado en 1906 por el Dr. Clemens Von Pirquet para definir un tipo especial de respuesta inmunológica o defensiva frente a sustancias que normalmente no inducen reacciones en la mayoría de las personas (Pirquet C, 1906).

La alergia es una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos.

Gell y Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad (HPS) en cuatro tipos:

- HPS-I o inmediata: mediada por anticuerpos IgE
- HPS-II o citotóxica: mediada por anticuerpos IgG, IgM o IgA
- HPS-III: mediada por complejos inmunes
- HPS-IV o retardada: mediada por células.

La alergia puede ser mediada por anticuerpos o células (HPS-I o IV). En la mayoría de los casos, el anticuerpo responsable característico de una reacción alérgica pertenece al isotipo IgE, pudiendo decirse que estos pacientes padecen una alergia mediada por IgE.

Todo agente susceptible de ser reconocido por un anticuerpo o un receptor del linfocito T y dar lugar a una respuesta inmune se denomina antígeno. Cuando el antígeno estimula una reacción alérgica se llama alérgeno.

Existe una predisposición individual para ser alérgico, que frecuentemente es hereditaria, que se llama atopia (atopos significa 'inhabitual' o 'raro'), propuesto por el Dr. Arthur Fernández-Coca en 1922. La atopia se define como la propensión de ciertos sujetos a producir anticuerpos del isotipo IgE frente a sustancias presentes en el ambiente y a sufrir reacciones de HPS-I o inmediata que se manifiestan en forma de rinoconjuntivitis, asma u otros síntomas de anafilaxia. La dermatitis atópica también está encuadrada en este grupo de patologías.

La inmunoglobulina E (IgE) es un tipo de anticuerpo presente en todas las personas. Al igual que otras inmunoglobulinas, interviene en la respuesta inmune específica al reconocer un agente extraño potencialmente peligroso sobre el que actúan nuestras defensas.

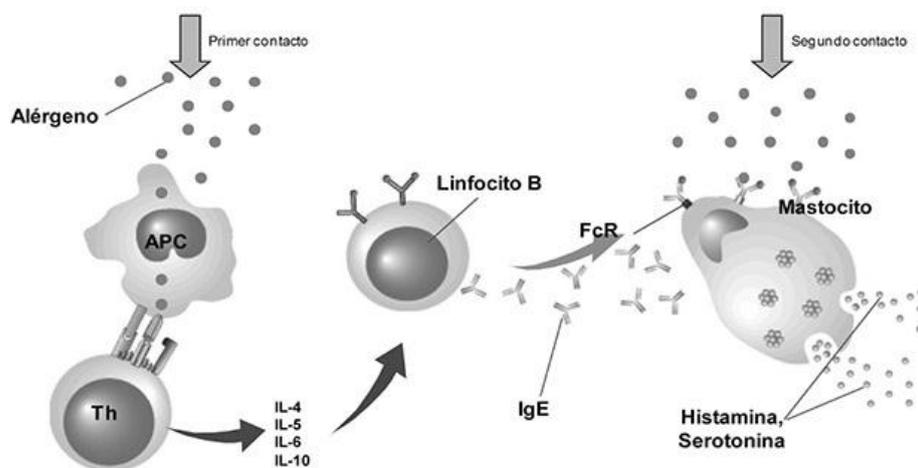
En las personas atópicas, la IgE reacciona contra un agente generalmente inofensivo (alérgeno) que al unirse a la IgE induce una serie de mecanismos que desencadenan la liberación de mediadores inflamatorios que producen la reacción alérgica.

Pero esta reacción no sucede repentinamente sin precisa de una fase previa denominada sensibilización. Como en toda respuesta inmune específica, los anticuerpos tienen que producirse tras una o varias exposiciones previas al alérgeno, durante las cuales se tolera su contacto. En esta fase se generan anticuerpos IgE que reconocen al alérgeno, de forma que en posteriores contactos se desencadena la reacción.

La reacción alérgica se produce por la liberación de sustancias procedentes de células inflamatorias. En el caso de las reacciones mediadas por IgE, las células implicadas son los basófilos y los mastocitos. Estas células se descargan bruscamente al ser activadas por la IgE, con la consecuente liberación de los mediadores responsables de todas las manifestaciones de la reacción. Es precisa la unión simultánea del alérgeno a 2 o más moléculas de IgE unidas a receptores FcεRI (receptor de alta afinidad de IgE) en la superficie celular para que se produzca esta activación.

Figura 1.1 La reacción de hipersensibilidad tipo I o alérgica.

Javier Fernández 2017 Libro de Alergia Básica mra ediciones



Los alérgenos son proteínas, glicoproteínas o lipoproteínas, con un tamaño que les permita atravesar las mucosas y ser capaces de producir una respuesta en sujetos sensibilizados. Según la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), la nomenclatura de los alérgenos sigue el nombre taxonómico de género y especie: tres primeras letras del género, espacio, primera letra de la especie, espacio y un número arábigo según la prioridad de su descubrimiento y su actividad biológica. Habitualmente se habla de alérgenos mayores y menores; los primeros son reconocidos por más del 50% de los sujetos alérgicos. Los alérgenos menores son reconocidos por menos del 50% de los pacientes.

La sensibilización, tiene lugar tras la exposición al alérgeno, ya sea por inhalación (aeroalérgenos), ingestión (alérgenos de alimentos) o por inyección (alérgenos de picaduras de insectos). Un mismo anticuerpo IgE puede reconocer distintos alérgenos homologos en diferentes fuentes biológicas (p ej. Mal d 1 de manzana en pacientes alérgicos a Bet v 1 del polen de abedul). Las características moleculares que hacen de una molécula un alérgeno no están muy definidas, pero aspectos como el tamaño, la solubilidad, la compactación molecular y la estabilidad contribuyen notablemente a su potencia alergénica (Villalba Diez M. Tratado de Alergología 2015).

Los aeroalérgenos son alérgenos que sensibilizan por inhalación. En general son de pequeño tamaño (10-60 kDa), cuya solubilidad en medios acuosos facilita su liberación al llegar a las mucosas conjuntival, nasal o bronquial. Estas partículas volátiles pueden ser de origen diverso (heces, polen, esporas) (Chapman MD, 1998). Los pólenes, junto con los ácaros, las cucarachas y los epitelios de animales, constituyen las principales fuentes de aeroalérgenos.

Las manifestaciones clínicas de la alergia respiratoria son fundamentalmente nasales y conjuntivales (rinoconjuntivitis), pero también puede aparecer asma en un porcentaje variable de pacientes, dependiendo del tipo de alérgenos implicados y de la naturaleza de la exposición. Los síntomas de rinitis alérgica son las salvas de estornudos, el prurito nasal, la rinorrea, que generalmente es acuosa y obstrucción nasal. Los de la conjuntivitis son el prurito ocular, lagrimeo y eritema conjuntival; y los del asma la disnea, la tos, los ruidos respiratorios y opresión torácica.

Desde el siglo pasado, las enfermedades alérgicas han pasado de ser unas enfermedades bastante raras a convertirse en una pandemia de salud. Estas se pueden manifestar con diferentes síntomas dependiendo de los órganos afectados.

Las enfermedades alérgicas son las enfermedades crónicas más frecuentes en Europa en la actualidad, afectando a la vida cotidiana de más de 60 millones de personas (Papadopoulos NG, 2012).

Las enfermedades alérgicas en España afectan a un 30% de la población, esto es, 16 millones de personas. Según el estudio epidemiológico Alergológica 2015 un 42,2% de los pacientes con rinoconjuntivitis están sensibilizados exclusivamente a pólenes aunque se ha visto que un 23,3% está sensibilizado a dos grupos de alérgenos y un 10,1% a tres o más grupos diferentes (se entiende por grupo: “pólenes”, “ácaros”, “hongos”, “epitelios”, etc.). En Castilla y León el 91,0 % de los pacientes con rinoconjuntivitis alérgica están sensibilizados a pólenes.

En relación al asma alérgico, en Alergológica 2015 se registra que un 65,6 % de los pacientes alérgicos está sensibilizado a pólenes, a diferencia de Alergológica 2005 que era de un 43,8 50 %.

El incremento en la prevalencia de sensibilización a los pólenes parece confirmar la impresión generalizada de que existe un aumento de las enfermedades atópicas causadas por estos aeroalérgenos.

1.1.2 Polinosis

Se piensa que la primera descripción en la historia de la Medicina de la rinitis alérgica estacional por sensibilización al polen fue realizada por el médico árabe de origen persa Rhazes (865-932), cuando tituló una de sus publicaciones *“Una disertación sobre la causa de la coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume”*.

Siglos más tarde, en Inglaterra en 1819, John Bostock en un trabajo titulado *“Case of a periodical affection of the eyes and chest”* (Un caso de afección periódica de los ojos y del pecho) diferencia la rinoconjuntivitis alérgica del catarro común por infección respiratoria, acuñando el nombre de “fiebre del heno”. Este es un término equivocado, que él mismo acabó rechazando, pero que ha perdurado durante bastante tiempo.

Posteriormente en 1828 y también en Inglaterra, Charles Blackley describió los

síntomas alérgicos, mediante pruebas cutáneas que se realizó a sí mismo en el antebrazo y efectuó los primeros estudios aerobiológicos relacionando estos síntomas con el polen (Blackley, 1873).

La polinosis se define como la alergia respiratoria causada por los alérgenos contenidos en los granos de polen de las plantas siendo originario en la mayoría de los casos de plantas anemófilas, que realizan su polinización a través del lanzamiento y posterior dispersión del polen en el aire. La incidencia de la polinosis está muy influida por factores ambientales, la flora local y por las características del polen al cual se esta sensibilizado.

El grano de polen es el vehículo de aeroalérgenos de exterior más importante, y debe reunir ciertos requisitos para llevara cabo un transporte eficaz:

- a) Tener un diámetro comprendido entre 15 y 60 μm .
- b) Proceder de plantas anemófilas, es decir, polinizadas por el viento, que incluyen árboles, malezas y gramíneas.
- c) Liberar fácilmente los alérgenos al llegar a las mucosas del individuo alérgico.

La presencia de polen en la atmósfera varía en cuanto a aéreas geográficas, especies, épocas de polinización y concentraciones que se alcanzan.

El polen, al igual que las semillas, está sometido a la deshidratación una vez secretado. Si bien este proceso resultaría letal para otras partes de la planta, ciertos mecanismos moleculares protegen el citoplasma y las membranas de las células y permiten su rehidratación una vez alcanzado el estigma de la flor que polinizan o las mucosas del individuo. Con 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. Pero no solo el grano de polen intacto es el único vehículo de alérgenos, sino que otras partículas influyen de manera clara y directa en la sensibilización y pueden llegar a transportar alérgenos de forma más eficaz, llegando con mayor facilidad a las vías respiratorias.(Villalba Díaz M. 2015)

Las especies vegetales cuyos pólenes son alergénicos son las gramíneas, los árboles y las malezas. Las gramíneas son las más extendidas y abundantes estando presentes en casi todo el mundo, siendo la causa más frecuente de alergia al polen. En cambio, la distribución de las especies pertenecientes a las malezas y a los árboles

depende del ámbito geográfico en el que se encuentren estas plantas. Así, por ejemplo, en los países del norte y centro de Europa predomina la alergia al abedul, en Norteamérica a la ambrosía, en las costas mediterráneas a la *Parietaria*, Cupresáceas y el olivo y en Japón al cedro japonés (*Cryptomeria japonica*).

Una característica importante de la polinosis es su periodicidad anual, con síntomas que normalmente suceden durante el mismo período cada año, durante la polinización. La repetición de los síntomas clásicos de rinoconjuntivitis asociados o no con asma bronquial en dos o más estaciones polínicas es un fuerte indicador de polinosis.

La sensibilización a los alérgenos de polen puede ocurrir aislada o asociada con sensibilización a otros alérgenos perennes, tales como alérgenos de los ácaros del polvo, hongos y epitelios de animales. Los síntomas pueden ocurrir solo en la estación polínica, o a lo largo del año (en cuyo caso los síntomas se recrudecen durante la polinización) (Taketomi, 2006).

En general, los síntomas derivados de la sensibilización a los pólenes de los árboles aparecen durante el invierno y a principios de la primavera, a los pólenes de las gramíneas durante la primavera y verano y a los de las malezas en verano y otoño; aunque los perfiles de sensibilización varían considerablemente dependiendo de la ubicación geográfica de la población de estudio (Bousquet J, Khaltayev N 2008).

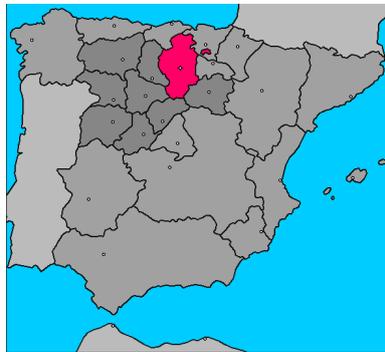
Es muy importante valorar la relación entre la polinosis y la patología alérgica que presentan los pacientes. Por ello, el especialista deberá conocer bien la aerobiología particular de la zona en que vive la población a la que atiende, para la realización de un diagnóstico correcto y un tratamiento adecuado (Subiza E 1989) (Subiza J, 2001).

Entre los factores que incrementan el riesgo de sensibilizarse están los antecedentes de atopia, predisposición genética, grado de exposición o factores meteorológicos como el cambio climático que origina el aumento de las temperaturas, de los niveles de CO₂ y la sequía. Las ciudades crean un ambiente hostil a las plantas y éstas, para defenderse, producen proteínas de estrés que hacen más agresivos a los pólenes de zonas contaminadas de las ciudades que a los de zonas rurales no contaminadas, ocasionando una mayor alergenidad. Los altos niveles de contaminación de las ciudades impulsan el fenómeno de inversión térmica que impide a los pólenes abandonar la atmósfera sobre las ciudades y aumenta el tiempo que nos exponemos a ellos (Moral A, 2017).

1.1.3 Polinosis en Burgos

Burgos se encuentra situado en la parte norte de la meseta central con clima mediterráneo con rasgos de continentalidad: inviernos largos y fríos y veranos cortos y cálidos y además un fuerte contraste entre la temperatura durante el día y la noche. Burgos presenta unas temperaturas de unos grados más bajas que en el resto de las zonas con este clima, motivado principalmente por la gran altura en la que se encuentran. Tiene un piso bioclimático (relación entre el clima y la vegetación) supramediterráneo (Rivas-Martínez S, 1983)

Figura 1.2 Localización de la provincia de Burgos en la Península Ibérica



En el estudio previo (Carretero P, 2005) valoramos cuales eran los pólenes que con más probabilidad producían polinosis en nuestra área de Burgos. Para ello se analizaron los recuentos de pólenes de los taxones cuya media fuera superior al 1% del total de los años 1997, 1998 y del 2001 al 2004. Dentro de un estudio multicentrico del comité de Aerobiología de la SEAIC para el estudio de la polinosis, se seleccionaron 147 pacientes de ambos sexos, con clínica de rinitis y/o asma estacional, residentes en nuestra área y con pruebas positivas para pólenes. Según la metodología del estudio se realizaron pruebas cutáneas por la técnica del prick con una batería de 25 pólenes. Los resultados de las pruebas cutáneas en orden de prevalencia fue de: gramíneas (91%), *Plantago lanceolata* (42.86%), *Olea europaea* (36.05%), *Chenopodium album* (26.53%), *Urtica dioica* (24.49%), *Platanus hispanica* (21.77%), *Cupressus arizonica* (19.05%) y *Quercus ilex* (18.37%) principalmente.

En relación a los recuentos de pólenes anuales identificados en este estudio, las cupresáceas, con el 39,87%, fue el taxón que alcanzó los niveles más altos en nuestra ciudad. Es el que más pronto poliniza, realizándose está, dependiendo de cada año, entre los meses de enero y abril. Los niveles en el año 2004 fueron muy altos llegando a los 18,434 granos/m³, no siendo lo habitual en otros años, cuando la media suele ser sobre los 4000 granos/m³. Burgos, al igual que otras ciudades con recuentos altos de estos pólenes, presenta una alta prevalencia de pacientes sensibilizados

En los meses de mayo y sobre todo junio los tres taxones más frecuentemente recogidos en el captador con respecto al total de pólenes fueron Poaceae (gramíneas), *Quercus* y *Pinus*. El pico de pólenes de gramíneas se suele producir a en la mitad de junio. Casi un 92% de los polínicos del área de la ciudad de Burgos mostraban pruebas cutáneas positivas a gramíneas, mientras que en el caso de *Quercus* y *Pinus* solo son sensibles un 18,37% y un 3,40% respectivamente. El polen de *Quercus*, a pesar de ser uno de los más abundantes recogidos en el captador (14,51%) presentaba una frecuencia de pruebas cutáneas positivas muy inferior a las gramíneas y sin pacientes monosensibilizados. Entre nuestros pacientes menos del 4% tiene pruebas cutáneas positivas al polen de *Pinus*, siendo el polen con la prevalencia más baja encontrada.

Después de las gramíneas, la sensibilización frente a plantagináceas fue la más frecuente. El *Plantago*, con una presencia ambiental del 2,32%, llega a sensibilizar a cerca de la mitad de los pacientes (43 %). Poliniza en la misma época que las gramíneas con valores medios bastante inferiores y hay escasos pacientes monosensibilizados por lo que para algunos autores sea difícil establecer su significado clínico (Feo Brito F, 1998) (M. Ferreiro Arias, 1998) (Subiza J, 1998). La presencia de Pla1 en la atmósfera depende no solo del polen de *Plantago* sino también del polen de otras especies de la familia Oleaceae (González-Parrado Z, Fernandez-Gonzalez D, 2014).

Destaca el alto número de pacientes sensibilizados a pólenes de la familia de las Oleaceae (*Olea europaea*, y *Fraxinus excelsior*), que en nuestra area tiene una alta asociación a sensibilización frente a gramíneas. No consideramos estos pólenes como alérgenos a tener en cuenta para el desarrollo de la clínica de nuestros pacientes, como sucede en otras regiones, ya que se obtienen valores insignificantes en los recuentos (2,20% del total de *Olea* y habitualmente menos del 1% del total de *Fraxinus*).

Las *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* son el 4º grupo de taxones en frecuencia de sensibilizaciones (26,53%), aunque solo representan el 1,26% del total de pólenes recolectados. Estos pacientes son también alérgicos a las gramíneas. Pensamos que solo tiene relevancia clínica en aquellos pacientes que presenten síntomas de polinosis en julio y agosto, ya que según algunos autores, es un polen bastante “agresivo”, ocasionando síntomas a partir de los 10-15 granos/m³ (Pola J, 2003).

El polen de *Platanus* (Plátano de sombra) aparece en los meses de marzo, abril y mayo (3.39% del total). A pesar de la relevancia clínica de este polen en otras ciudades, los niveles atmosféricos en Burgos son bajos.

1.1.4 Alérgenos de los pólenes

1.1.4.1 Localización de los alérgenos

El grano de polen es el gametofito masculino que germina en contacto con el estigma. Los pólenes anemófilos con relevancia alérgica son los provenientes de gimnospermas, diseminados por el viento y distribuidos en forma abundante en la naturaleza. Las plantas anemófilas producen una cantidad tan grande de polen que, probablemente, cada estigma atraparé granos de distintas especies, pero sólo los de las especies correctas germinarán para fertilizar el óvulo. Para iniciar el crecimiento del tubo polínico, las características químicas del grano de polen y el estigma deben ser compatibles.

Los granos de polen están recubiertos por dos capas. La exina es la capa más externa que le da la extrema resistencia al grano de polen. Su componente químico fundamental es la esporopolenina, también hay un componente polisacárido y otro lipídico, así como proteínas, fundamentalmente glucoproteínas. A pesar de su gran resistencia, presenta una cierta elasticidad y plasticidad, permitiendo al grano de polen adaptarse a las condiciones ambientales.

La cubierta más interna, intina, rodea al citoplasma donde están las organelas: núcleo germinativo y vegetativo, gránulos de almidón y partículas de polisacáridos. Sus componentes principales son celulosa, pectinas y glucoproteínas.

El grano de polen es el vehículo de aeroalérgenos de exterior más importante. La mayoría de los alérgenos que se encuentran en los granos de polen están situados en las paredes o dentro de ellas. Los alérgenos más importantes son proteínas o polipéptidos, aunque los polisacáridos, las glucoproteínas y las lipoproteínas también pueden actuar como alérgenos. Normalmente, los antígenos de los granos de polen situados en las paredes 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.

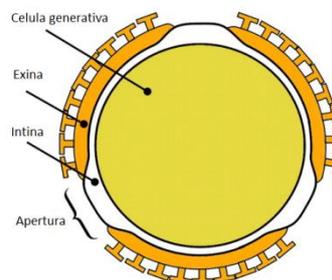
Cuando el grano de polen entra en contacto con la superficie húmeda del estigma, las proteínas que se encuentran en los cuellos diminutos de la exina son liberadas en pocos segundos y actúan como contraseña química. Si la contraseña es correcta, las enzimas producidas en niveles más profundos de la célula polínica reaccionan con el estigma y agujerean el estilo para permitir el crecimiento del tubo polínico. Por el tubo polínico pasan los gametos masculinos hasta fusionarse con el ovulo.

Cuando los granos de polen se posan en la mucosa respiratoria, tiene lugar la misma secuencia. Debido a que los alérgenos de pólenes son altamente hidrosolubles pueden ser liberados en segundos en condiciones de humedad. Las proteínas de reconocimiento se liberan rápidamente cuando el grano de polen entra en contacto con la superficie húmeda de las mucosas, mientras que las enzimas del interior de los granos se liberan lentamente a través de las aberturas. Estos compuestos, además de los que se encuentran en los microporos de la exina, son los alérgenos del polen que pueden sensibilizar y provocar la producción de IgE. (Emberlin JC, 2005).

La liberación del alérgeno específico es esencial para que ocurra la sensibilización alérgica. En una atmósfera seca, los pólenes son muy estables y pueden albergar a sus alérgenos durante años.

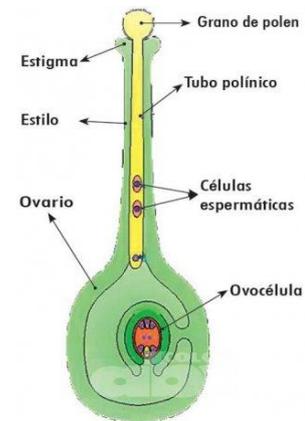
La elevada humedad, las tormentas con truenos y lluvia copiosa y la polución ambiental son los tres factores más importantes para la liberación de alérgenos de los granos de polen. Si el grano de polen se expone bruscamente a una humedad ambiental elevada,

Figura 1.3 Grano de polen maduro



puede ocurrir una expulsión vigorosa del contenido citoplasmático. En algunas situaciones, como en las tormentas, el polen puede romperse por shock osmótico, liberando su contenido. Esto explicaría la elevada prevalencia de exacerbaciones asmáticas durante estos eventos climáticos. Los niveles de expresión de los alérgenos en el grano de polen también pueden verse influidos por el grado de maduración y características intrínsecas de ciertas especies como la resistencia a la sequía (Helander ML, 1997)

Figura 1.4 formación del tubo polínico



En condiciones óptimas de humedad, pH y temperatura los alérgenos se liberan en el proceso fisiológico de la polinización. La liberación de alérgenos tiene lugar en la superficie de las mucosas del huésped y en el ambiente externo. La importancia de esta segunda forma de liberación ha sido ampliamente evaluada y se ha observado que la presencia de aerosoles alérgenos en el aire puede ser clínicamente relevante.

La forma en que los alérgenos transportados por polen contribuyen al desarrollo de la inflamación en las vías respiratorias inferiores de los pulmones ha sido desde años un rompecabezas, porque sólo un pequeño porcentaje de granos de polen se depositan en las vías respiratorias periféricas. El grano de polen intacto no es el único vehículo de alérgenos. Se ha demostrado que la hidratación en el agua de lluvia y la humedad pueden provocar la expulsión de granos de polen de las gramíneas y árboles, lo que conduce a la liberación de partículas micrónicas y submicrónicas (o subpolínicas) con tamaño de 0,12-5 μm que contienen alérgenos (Schappi GF, 1999) (Grote M, 2000) (Burge HA, 2002) (Taylor PE, 2004). Hay trabajos que describen la exposición a alérgenos polínicos en ausencia de granos de polen identificables en el aire con la posibilidad de que estas partículas pudieran encontrarse en el ambiente fuera de la época de polinización, lo que también explica la discordancia temporal que a veces existe entre síntomas y polinización o recuentos de pólenes (Barnes C, 2000). Igualmente, los niveles de alérgenos aumentan en el ambiente durante la temporada de floración, especialmente después de fuertes precipitaciones, que se correlacionan con el incremento de la frecuencia de visitas a centros sanitarios de los pacientes polínicos (Wark PA, 2002).

Las partículas submicrónicas pueden encontrarse en dos lugares: en el citoplasma del polen (por ejemplo, los gránulos de almidón), o en otras estructuras de la planta que se relacionen (contacten) con el polen. Su tamaño varía entre 0,5 y 2 μm , lo cual es bastante menos que el tamaño de un grano de polen (10 a 200 μm). La exposición a estas partículas depende del grado de hidratación del polen.

Las fuentes de las partículas submicrónicas pueden ser:

- Fragmentos de las plantas producidos por la degradación física ambiental.
- Orbículas o cuerpos de Ubisch que pueden ser definidos como corpúsculos de tamaño variable (0,14 μm -20 μm) que son restos de las anteras de la planta o del interior de los granos de polen que se han fragmentado por la hidratación. Alérgenos principales de cupresáceas y abedul han sido localizados en el interior de dichos orbículos.
- Aerosoles que contienen alérgenos que están fijados a partículas que se encuentran en el ambiente (por ej. Partículas de Escape Diesel).
- Granos de polen que se rompen por choque osmótico provocado por la lluvia y que liberan al ambiente aproximadamente 700 gránulos de almidón (leucoplastos) contenidos en el citoplasma (diámetro inferior a 3 μm).
- Polensomas, vesículas similares a los exosomas

El empaquetamiento de los alérgenos con gránulos de almidón en amiloplastos presentes en el citosol celular y la asociación de los pólenes o las moléculas alergénicas con materiales externos no proteicos, como las partículas derivadas de la combustión de los motores diesel, pueden facilitar el acceso de las moléculas alergénicas a las vías respiratorias y su permanencia en el aire.

(Villalba Díaz M, 2015) (Behrendt H, 2001) (D'amato G, 2001) (Vinciger S, 2001) (Grote M, 2001) (Suarez-Cervera M, 2003) (Currie AJ, 2000) (Bacsi A, 2006) (Prado N, 2014) (Serrano C, 2005)

1.1.4.2 Contaminación y cambio climático.

Las últimas décadas han revelado una tendencia hacia el aumento de las concentraciones de polen en el aire en Europa, atribuyendo estas tendencias a un aumento de las emisiones antropogénicas de CO₂ y la temperatura. Sin embargo, la falta de disponibilidad de agua en el sur de Europa puede provocar una tendencia hacia

una menor intensidad de floración, especialmente en plantas herbáceas. Los cambios en las precipitaciones en la región mediterránea, atribuidos al cambio climático, tienen un impacto importante en la fenología de las plantas (Galan C, 2016)

La mayor parte de la contaminación urbana, procede de la combustión de carburantes del tráfico rodado de vehículos, fundamentalmente de los motores diesel, generándose productos nocivos para la salud como son el monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, benceno y partículas de escape diésel (PED). Las PED producen un aumento de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias y en individuos atópicos aumentan la síntesis de IgE, por otro lado se ha observado una gran afinidad para unirse a alérgenos polínicos, favoreciendo a nivel atmosférico la formación de aerosoles de partículas contaminantes-partículas polínicas.

1.1.4.3 Funciones bioquímicas de los alérgenos de los pólenes

La actividad enzimática que poseen algunos alérgenos de los pólenes es muy importante para el adecuado funcionamiento de la planta, pudiendo tener una gran relevancia en el desarrollo de enfermedad en los seres humanos.

La capacidad que tiene los alérgenos de los pólenes para mantenerse en el ambiente durante largos periodos de tiempo y desencadenar reacciones alérgicas en segundos a través del contacto con las mucosas del individuo alérgico hace que estos se puedan encuadrar en un patrón molecular común, muy general, similar al que poseen otros aeroalérgenos: son moléculas muy solubles en medios acuosos y fácilmente extraíbles de la fuente natural, con tamaños relativamente pequeños. Sin embargo, sus actividades bioquímicas son muy diversas (enzimática, de defensa, estructural, transportadora, reguladora, etc.).

En la última década, con la implementación del uso de técnicas de biología molecular para la caracterización de alérgenos, se ha conseguido determinar la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de una gran parte de los pólenes más relevantes.

Los pólenes de especies que pertenecen a la misma familia presentan alérgenos similares. Son varios los alérgenos identificados como marcadores específicos de sensibilización a cada grupo.

1.1.4.3.1 Alérgenos de polen de gramíneas

Las gramíneas (Poaceae) son las plantas más ubicuas en la mayoría de las partes del planeta, habiéndose identificado más de 12.000 especies, con una amplia distribución.

Las Pooideae (*Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*) son las más ubicuas en climas templados.

Los alérgenos identificados se clasifican en función de su estructura y función, los grupos 1 y 5 de gramíneas se consideran los alérgenos mayores del polen de gramíneas.

Phl p 1 se considera marcador de diagnóstico a gramíneas y de sensibilización precoz.

Los marcadores de diagnóstico son los alérgenos principales específicos para una fuente alérgica determinada. Permiten diferenciar a aquéllos pacientes sensibilizados de forma primaria a un alérgeno (sensibilidad genuina), de aquéllos sensibilizados de forma secundaria por fenómenos de reactividad cruzada.

El grupo 1 de alérgenos (expansinas) es común en todas las Poaceae, en cambio el grupo 5 (ribonucleasas) pertenece en exclusiva a la subfamilia de Pooideae.

Por el contrario los alérgenos del grupo 12 de las gramíneas (profilinas) y los del grupo 7 (polcalcinas) contribuyen a la reacción cruzada entre gramíneas, árboles, y malezas.

La asociación con de la sensibilización a Phl p 1 con varias sensibilizaciones a Phl p 5, 7 y 12 puede ser un marcador pronóstico de progresión de la alergia.

La determinación de IgE específica a los alérgenos mayoritarios de gramíneas (Phl p 1 y 5) aumenta la especificidad del diagnóstico, especialmente en aquellos pacientes sensibilizados a otros pólenes por reactividad cruzada (Casquete-Román E. 2009) (Villalba Díaz M, 2015) (Popescu FD, 2014) (Pablos I, 2016) (Matricardi PM, 2016).

1.1.4.3.2 Alérgenos de pólenes de árboles

Las especies de árboles con más relevancia alergológica se limitan a 4 familias:

- Fagales: Betulaceae (abedul, aliso, avellano) y Fagaceae (castaño, roble)
- Oleáceas: olivo, fresno, lilo, aligustre.
- Cupresáceas: *Cupressus*, enebro, sabinas,...
- Platanáceas: Plátano de sombra

Tabla 1.1 Principales moléculas alergénicas de los árboles (Adatado de Villalba Díaz M, 2015 y Matricardi PM, 2016)

Cupresáceas		<i>Olea europea/Fraxinus excelsior</i>	
Grupo 1	Pectato liasa	Ole e1/Fra e 1	Reguladora/ Homologa a Ole e 1
Grupo 2	Poligalacturonasa	Ole e 2/Fra e 2	Profilina
Grupo 3	Homologa a taumatina	Ole e 3/Fra e 3	Polcalcina (2EF)
Grupo 4	Polcalcina	Ole e 5	Superoxido dismutasa
Cup a 8	Profilina	Ole e 6/Fra e 6	Proteina rica en Cys
<i>Betula verrucosa</i>		Ole e 7	nsLTP
Bet v 1	Union lipidos/Ribonucleasa	Ole e 8	4 EF
Bet v 2/	Profilina	Ole e 4/Ole e 9/Fra e 9	®-1,3-gucanasa
Bet v 3	3 EF	Ole e 10/Fra e 10	Union carbohidratos (CBM-43)
Bet v 4/	Polcalcina (2EF)	Ole e 11/Fra e 11	Pectin metilesterasa
Bet v 6	Isoflavona reductasa	Ole e 12/Fra e 12	Isoflavona reductasa
Bet v 7	Ciclofilina	Ole e 13	Homologa a taumatina
Bet v 8	Pectin metilesterasa		
<i>Corylus avellana/ Carpinus betulus/Alnus</i>		<i>Ligustrum vulgare/Syringa vulgaris</i>	
Cor a 1 Car b 1 Aln g 1	Homologa a Bet v 1	Lig v 1/Syr v 1	Homologa a Ole e 1
Cor a 2 Car b 2 Aln g 2	Profilina	Syr v 3	Polcalcina
Car b 4 Aln g 4	Polcalcina		
Cor a 6	Isoflavona reductasa	<i>Platanus acerifolia/orientalis</i>	
Cor a 10	nsLTP	Pla a 1/Pla or 1	Inhibidor invertasa
Fagaceas: <i>Castanea sativa, Fagus sylvatica, Quercus alba</i>		Pla a 2/Pla or 2	Poligalacturonasa
Cas s 1, Fag s 1, Que a 1	PR-10, Homologo Bet v 1	Pla a 3/Pla or 3	nsLTP
Cas s 5	Quitinasa	Pla a 8/Pla or 8	Profilina
Cas s 8	Non-specific lipid transfer protein type 1		
Cas s 9	Cytosolic class I small heat shock protein		

En arboles los marcadores de diagnóstico alergénico son las pectatoliasas en cupresáceas (Cup a 1, Cry j 1), las proteínas relacionadas con la patogénesis PR 10, Bet v 1 y homólogos en betuláceas, Ole e 1 y sus homólogos en las oleáceas y Pla a 1 y Pla a 2 en las platanáceas. Se han determinado como alérgenos de reactividad cruzada las Profilinas (Bet v 2), Proteinas de union al Calcio (Polcalcinas) (Ole e 3). Recomiendan analizar la bromelina (Ana c 2 o MUXF3) en el caos de múltiple reactividad IgE por si es debida a una sensibilización a Carbohidratos (Matricardi PM, 2016)

1.1.4.3.2 Alérgenos de pólenes de malezas

La mayoría de estas plantas pertenecen a los géneros.

- Asteraceae: las más representativas son ambrosía, artemisia, girasol
- Amaranthaceae: que incluye chenopodium y salsola.
- Urticaeae, la más representativa es parietaria.

- Plantaginaceae, familia a la que pertenece el plantago.

En general crecen en climas cálidos y suelos secos, aunque la ambrosía se puede localizar en el centro de Europa. La época de polinización suele ocurrir en los meses de agosto y septiembre, la parietaria y chenopodiáceas tienen 2 picos de polinización en primavera y otoño. En ciertas zonas de península ibérica como Aragón y Levante, la salsola es uno de los pólenes más relevantes.

Es frecuente la reactividad cruzada entre las especies mayores de malezas

Las 4 familias de proteínas responsables de las principales sensibilizaciones a estos pólenes:

- Pectatoliasas. Amb a 1 (presente en >95% de los pacientes) puede ser un marcador útil para la sensibilización de la ambrosía con gran reactividad cruzada con Art v 6 de artemisa. No tiene reactividad cruzada con las pectatoliasas de las cupresáceas.
- Familia de las defensinas (Proteínas de defensa PR 12): Art v 1 (presente en 95% de los pacientes) marcador de sensibilización a artemisia con reactividad cruzada con Amb a 4.
- Proteínas de transporte de lípidos (LTPs): Par j 2, Art v 3 y Amb a 6. Par j 2 (presente en 80% de los pacientes) es un alérgeno marcador muy específico para la sensibilización a Parietaria. Art v 3 se asocia frecuentemente con sensibilización a LTP (Pru p 3) en pacientes mediterráneos
- Proteínas homólogas a Ole e 1: Che a 1 y Pla l 1. Pla l 1 (presente en 86% de los pacientes) es un marcador muy específico de sensibilización de Plantago y Che a 1 (presente en 70% de los pacientes) de Chenopodium pero este con reactividad con Sal k 5 de la Salsola.

También hay otros alérgenos de reactividad cruzada como polcalcinas y profilinas.

Sal k 1 es un marcador muy específico de sensibilización a salsola (presente en 65% de los pacientes)

(González Delgado P, 2017) (Matricardi PM, 2016)

Tabla 1.2 Principales moléculas alergénicas de las malezas (Adatado de Villalba Díaz M, 2015 y Matricardi PM 2016)

<i>Ambrosia artemisiifolia/psilostachya/trifida</i>		<i>Parietaria judaica/officinalis</i>	
Amb a 1	Pectato liasa	Par j 1	nsLTP
Amb a 3	Plastocianina	Par j 2	nsLTP
Amb a 4	Defensina	Par j 3	Profilina
Amb a/Amb p/Amb t 5	Proteína rica en Cys	Par j 4/Par o 1	Polcalcina
Amb a 6	nsLTP		
Amb a 7	Plastocianina	<i>Chenopodium album</i>	
Amb a 8	Profilina	Che a 1	Homóloga a Ole e 1
Amb a 9	Polcalcina (2EF)	Che a 2	Profilina
Amb a 10	Proteína ligadora Ca 3EF	Che a 3	Polcalcina
Amb a 11	Cisteine proteasa		
<i>Artemisia vulgaris</i>		<i>Salsola kali</i>	
Art v 1	Defensina	Sal k 1	Pectín metilesterasa
Art v 2	PR-1	Sal k 2	Proteína quinasa-like
Art v 3	nsLTP	Sal k 3	Metionina sintasa
Art v 4	Profilina	Sal k 4	Profilina
Art v 5	Polcalcina	Sal k 5	Ole e 1-like
Art v 6	Pectato liasa (Amb a 1-like)	<i>Amaranthus retroflexus</i>	
Art v 60	Glicoproteína ácida	Ama r 2	Profilina
<i>Helianthus annuus</i>		<i>Mercuriales annua</i>	
Hel a 1	Defensina	Mer a 1	Profilina
Hel a 2	Profilina	<i>Plantago lanceolata</i>	
		Pla l 1	Homóloga a Ole e 1

1.1.5 Alérgenos de reactividad cruzada

1.1.5.1 Definición de reactividad cruzada

Se define como reactividad cruzada al fenómeno por el cual un anticuerpo IgE reconoce, se une y desencadena una respuesta inmunitaria contra moléculas similares (homólogas) presentes en distintas especies. Un grado de identidad 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, un mayor grado de identidad (> 70%) es necesario para que dos proteínas compartan aminoácidos expuestos en la superficie molecular y epítomos de IgE y, por tanto, para que la reactividad cruzada tenga lugar (Villalba Díaz M, 2015)

Se ha utilizado las características de las plantas para determinar la probabilidad de reactividad cruzada. La validez de este proceso depende de dos premisas. La primera es que las plantas más estrechamente relacionadas tendrán mayores similitudes y más

antígenos compartidos. La segunda premisa es que la clasificación botánica actualmente aceptada refleja verdaderamente la filogenia, es decir, dos plantas del mismo género evolucionaron de un antepasado común, dos de la misma familia de un antepasado más distante, y así sucesivamente. Por lo tanto, se esperaría que dos plantas en el mismo género tuvieran el mayor número de alérgenos compartidos, éstos en la misma familia quizás menos, y así sucesivamente. De la misma manera, las plantas distantemente relacionadas presentan poca reactividad cruzada. La investigación hasta la fecha apoya generalmente el uso de este enfoque con algunas excepciones, siendo la más notable la presencia de panalérgenos como las profilinas, que están presentes en pólenes y en alimentos, e incluso pueden encontrarse en látex (Casquete-Román E. 2012).

Ante la disparidad de conceptos que se encuentran en la literatura sí que quisiera definir los términos según se recogen en Miguera y col. (Miguera M, 2014):

- Polisensibilización: sensibilización confirmado por estudio alergológico frente a dos o más alérgenos
- Cosensibilización: Reacciones alérgicas (IgE mediadas) como consecuencia de sensibilizaciones múltiples y no relacionadas frente a grupos alérgicos estructuralmente no relacionados
- Sensibilización-reactividad cruzada: Reactividad IgE en la que los anticuerpos IgE se han desarrollado originalmente frente a unos alérgenos determinados, pero que se fijan a otras proteínas alérgicas.

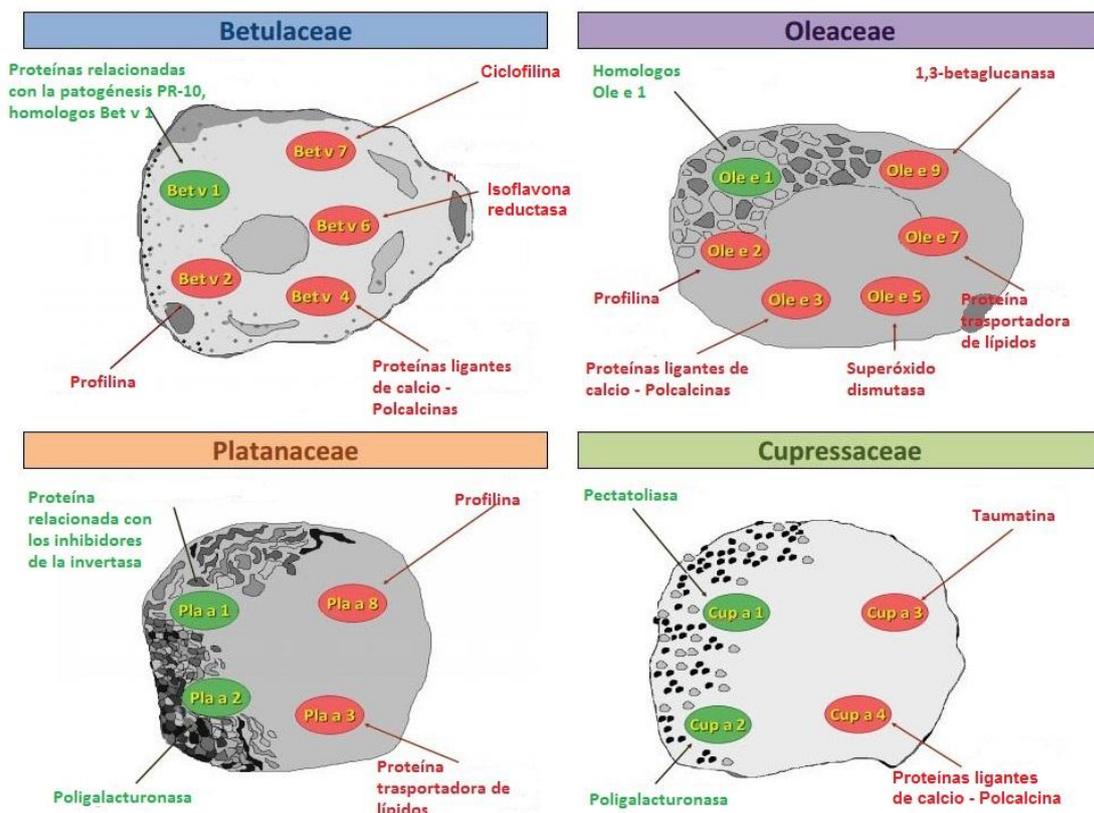
Se consideran marcadores de reactividad cruzada entre pólenes y entre pólenes y alimentos principalmente a: profilinas, polcalcinas, homólogos de Ole e 1, pectatoliasas, poligalacturonasas, determinantes carbohidratados, proteínas PR-10, taumatinas o PR-5 y proteínas transportadoras de lípidos (LTP).

1.1.5.2 Reactividad cruzada entre pólenes

La reactividad cruzada es especialmente significativa en los pólenes debido al gran número de familias asociadas bajo un mismo orden, que dan lugar a la producción de moléculas con alto grado de identidad. Se puede predecir la reactividad cruzada entre alérgenos conociendo la taxonomía de las plantas que los producen, de manera que las más relacionadas filogenéticamente son las que producen más alérgenos homólogos.

En las regiones templadas del norte, muchos taxones relacionados liberan polen cronológicamente durante el período de crecimiento, lo que puede llevar a una polinosis de muchos meses de duración. Por ejemplo, en las betuláceas (la familia del abedul), el *Betula* (abedul), el *Alnus* (aliso), el *Corylus* (avellano) y el *Carpinus* (carpe) tienen alérgenos parecidos. En el norte de Europa, la exposición al polen de aliso y avellano a principios de la primavera participa en la estimulación de las personas sensibilizadas antes de la estación de polen de abedul. Los taxones afines que crecen en regiones climáticas diferentes pueden provocar problemas a los viajeros. Existe una gran reactividad cruzada entre cupresáceas. El polen de olivo (*Olea*) de las zonas mediterráneas reacciona de manera cruzada con el fresno (*Fraxinus*) de latitudes más altas y con el aligustre (*Ligustrum*) que provoca el alargamiento de la época de síntomas en alérgicos a oleáceas

Figura 1.5 Marcadores de diagnóstico (verde) y alérgenos de reactividad cruzada (rojo) de polen de árboles (Adaptado de Matricardi PM, 2016)



Muchos de los componentes de determinadas fuentes alérgicas, como es el caso de los grupos 1 y 5 de las gramíneas, poseen una estructura tan parecida que la sensibilización a una de ellas implica la sensibilización al resto de las gramíneas.

El diagnóstico y la terapia de la polinosis está marcada por la similitud entre las moléculas alergénicas de los distintos pólenes, lo cual ha sido, y sigue siendo, crucial a tener en cuenta a la hora de simplificar el espectro de pólenes necesarios para su uso clínico. Es decir, aun suponiendo que las dosis óptimas de los alérgenos utilizadas en las aplicaciones clínicas estén perfectamente tipificadas, la reactividad cruzada afecta de manera decisiva a las dosis reales de las moléculas empleadas y el desconocimiento de dichas similitudes puede repercutir negativamente en la inocuidad de las muestras, pudiéndose incrementar el número de reacciones adversas en los pacientes.

Aunque en el tratamiento con inmunoterapia esto queda todavía lejano en el tiempo, en el diagnóstico es una realidad gracias al diagnóstico por componentes.

También existe reactividad cruzada entre pólenes poco relacionados desde un punto de vista filogenético, por medio de alérgenos como las profilinas, polcalcinas, homólogos de Bet v1. Las proteínas transportadoras de lípidos, también presentes en pólenes, tiene más relevancia como alérgenos de reactividad cruzada entre alimentos vegetales.

Las profilinas y las polcalcinas han sido identificadas en casi todas las especies del amplio espectro vegetal por su gran homología entre ellas (Deviller P, 1997) (Pauli G. 2000)

Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de los miembros de estas dos familias de proteínas son pequeñas y, en la mayoría de los casos, son alérgenos minoritarios. Así, estas proteínas están presentes en diferentes familias de pólenes y ha sido demostrado su papel en la reactividad cruzada entre abedul y fresno (Hemmer W, 2000), entre olivo y gramíneas y entre olivo y malezas. En la polinosis, las profilinas y las polcalcinas son los mejores ejemplos (Hauser M, 2010). La relevancia clínica se considera limitada, pero la amplia reactividad cruzada influye mucho en el diagnóstico basado en extractos completos (Stringari G, 2014). Se dispone de un panel de profilinas y polcalcinas, consideradas representantes de todo el grupo alérgenos de reactividad cruzada, para el diagnóstico molecular que permite discriminar entre la sensibilización genuina y la sensibilización cruzada (Asero R, 2011). También existen comercializadas para la profilina pruebas cutáneas (prick test) basadas en el polen de la Palmera (*Phoenix dactylifera*).

1.1.5.2.1 Profilinas

Las profilinas son proteínas de 12-15 kDa, que se encuentran en todas las células eucariotas. Regulan la polimerización de actina durante el movimiento celular y la transmisión de señales intracelulares. Se pueden encontrar en pólenes, vegetales, látex y veneno de himenópteros (Ebo DG, 2004). La secuencia de aminoácidos de las profilinas vegetales está muy conservada, y llega a presentar el 70-85% de homología, incluso en especies muy distantes filogenéticamente (Breiteneder H, 2004). 73 están informadas como alérgenos en la página de <http://www.allergome.org> debido a que se tiene experimentos que demuestran la sensibilización a estas proteínas presentes en 43 especies diferentes. Los pacientes alérgicos a profilinas se sensibilizan primariamente por vía inhalatoria al alérgeno, y posteriormente, la ingesta de alimentos con este mismo panalérgeno desencadena la clínica. Los síntomas que produce se limitan a la cavidad oral, denominado síndrome de alergia oral, debido a que resiste a las amilasas orales, pero es sensible al pH del estómago y a las pepsinas digestivas (Rodríguez-Pérez R, 2003). La sensibilización a las profilinas se ha considerado un marcador predictivo de reacciones alérgicas a múltiples fuentes de pólenes y de alergia al polen asociada con alimentos vegetales. La prevalencia de sensibilización a las profilinas varía en función del área geográfica. Así, es de alrededor del 20% en polínicos del centro de Europa, mientras que alcanza hasta el 70% en pacientes alérgicos a pólenes y alimentos (Wensing M, 2002). Las profilinas más utilizadas para el diagnóstico molecular son: Phl p 12, Che a 2 y Bet v 2 (Landa-Pineda CM, 2013). Se ha abusado del término de panalérgeno para todos estos alérgenos de reactividad cruzada, siendo el único que encaja con esta definición las profilinas ya que es causa de reactividad cruzada en todo tipo de vegetales (pólenes, alimentos, látex) (Nieto A, 2002) (Hauser, 2010)

1.1.5.2.2 Polcalcinas

Las polcalcinas son proteínas fijadoras de calcio relacionadas con la germinación y el crecimiento de las plantas, y también se encuentran en animales. Tienen 9 kDa y dos lugares de unión al calcio. Conservan su estructura en el 75% de las especies en las que se expresan. La prevalencia de sensibilización es aproximadamente del 10-30% (Wopner N, 2007). Las polcalcinas más utilizadas para el diagnóstico son Che a 3 y Phl p7. A diferencia de las profilinas, las polcalcinas sólo están presentes en pólenes, pero no en los alimentos, por lo que son marcadores de sensibilización a múltiples pólenes por reactividad cruzada. La polcalcina de gramíneas probablemente contiene más

epítopes que las polcalcinas de otras fuentes. El polen de gramíneas podría ser responsable de la sensibilización a la polcalcina (Asero R, 2016).

1.1.5.2.3 Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas. PR-10

Las Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) son ampliamente consideradas como una rica fuente de alérgenos. Se definen como proteínas que son codificadas por el genoma de la planta e inducida específicamente en respuesta a las infecciones por patógenos como hongos, bacterias o virus, o por factores ambientales adversos como puede ser el estrés hídrico. Estas proteínas no constituyen una superfamilia de proteínas, pero representan a un conjunto de familias de proteínas no relacionadas cuya función es formar parte del sistema de defensa de la planta. Hoy en día, las PR se clasifican en 14 familias

El alérgeno mayor de *Betula verrucosa* es Bet v1, una proteína de defensa de las plantas del grupo 10 (PR 10). Esta proteína y sus homólogos son termorresistentes, e intervienen en las funciones de defensa ante los agentes patógenos y el estrés (Niederberger V, 1998). Entre los alimentos, se encuentran en la manzana (Mal d1) y en la avellana (Cor a 1), y el síntoma que suele producir con su ingesta es un síndrome de alergia oral, aunque también pueden originar anafilaxia.

1.1.5.2.4 Determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada (CCD)

Muchos alérgenos son glicoproteínas, que consisten en una parte de proteína y una o más cadenas de glicanos. Las cadenas de glicanos están compuestas de diferentes azúcares unidos entre sí y están unidos a través de un grupo amino (N-glicano) o un grupo hidroxilo (O-glicano) a la parte de proteína. Los N-glicanos son particularmente inmunogénicos y pueden inducir la producción de IgE, específica para N-glicanos, que habitualmente son patológicamente irrelevantes.

Los determinantes de hidratos de carbono son glucoproteínas con residuos β -1,2-xilosa y α -1,3- fucosa. Se encuentran en gramíneas, malezas, árboles, insectos y en el veneno de himenópteros (Ebo DG, 2004). La prevalencia varía entre el 15 y el 60% de sensibilización en los casos de polinosis, siendo también muy variable según trabajos en la población general.

Excepción a esto es la sensibilización a la galactosa α 1,3 galactosa (alfa-gal) que produce alergia a carne de mamíferos, sensibilización a gelatina de origen animal,

reacciones de hipersensibilidad tras la implantación de válvulas cardíacas de origen bovino y porcino o reacciones alérgicas severas a cetuximab, un anticuerpo monoclonal. Todo ello relacionado con posibles picaduras previas de garrapatas como fuente de sensibilización (Wilson JM, 2018)

Se ha demostrado una reactividad a IgE relacionada con glicanos en la mayoría de las fuentes alérgicas, especialmente en el reino vegetal. Los progresos recientes en la investigación han permitido una clasificación más clara de estos glico-epítomos. A diferencia de los epítomos clásicos de cadena peptídica, los glicoepítomos pueden compartir homologías estructurales significativas más allá de los límites de las familias de proteínas. Estos glicoepítomos son por tanto propensos a una extensa reactividad cruzada. Han sido llamados "determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada" (CCD). Muchos de estos glicoepítomos se comportan como "panepítomos", dando lugar a una reactividad cruzada entre productos tan distantes como el polen y los venenos de himenópteros. Debido a que una unión monovalente a IgE es suficiente en ensayos basados en suero, los glicoepítomos y CCD se consideran clásicamente como una fuente potencial de resultados positivos in vitro de la IgE sin significación clínica. (Malandain H. 2005). (Malandain H. 2007)

A finales del siglo XX algunos autores comenzaron a informar que la IgE específica a carbohidratos interviene en la reactividad a los componentes del polen de *C arizonica*. Además apoyaban la idea de que los epítomos de los CCD, así como panalergenos como la profilina y las proteínas de unión de calcio podría influir en el diagnóstico in vitro e in vivo y por lo tanto en las estrategias terapéuticas (Afferni C, 1999). Los mismos informan que estos CCD pueden ser la causa de positividades a nCup a 1 (al ser alérgeno natural purificado o nativo) ya que tiene la capacidad de liberar histamina y juegan un papel en la unión in vitro de IgE en el extracto de polen de *C arizonica* (Iacovacci P, 2002).

Se ha visto que prevalencia de sensibilización por CCD varía según la población. En la población adulta general, la prevalencia de IgE a un marcador CCD (MUXF 3, el N-glicano de tipo bromelina) oscila entre el 2,1% en una población urbana de Dinamarca hasta el 23% en una clínica de alergia en Italia.

Los factores de riesgo para la sensibilización CCD incluyen la atopía (como otras sensibilizaciones), en particular la sensibilización a polen y los antecedentes de

picaduras de himenópteros También el consumo elevado de alcohol. La interferencia que pueden originar los CCD en el diagnóstico puede ser, por lo tanto, más importante en poblaciones con altos porcentajes de elevado consumo de alcohol, que hayan sufrido picaduras de himenópteros y tengan niveles altos de sensibilización a pólenes (Vidal C, 2012).

En el estudio realizado por Vidal C. y col., en población Española, determinan que la prevalencia observada de sensibilización CCD en sus pacientes sometidos a estudio de alergia respiratoria en una clínica especializada era baja y los títulos de CCD-sIgE eran bajos. Relaciona estos datos con su población que tiene como alérgeno respiratorio más frecuente los ácaros del polvo, el más habitual en su ambiente (Vidal C, 2012).

Panzer y col. posteriormente informaron en su estudio en Europa Central que la tasa de sensibilización al componente CCD, MUXF3, en pacientes sensibilizados a polen fue del 6,5% y esta tasa fue similar a la del estudio de Vidal C, y col. Vieron que los pacientes que mostraban positividad a los componentes purificados naturales estaban más frecuentemente sensibilizados a MUXF3: la sensibilidad a MUXF3 fue 2 veces mayor en pacientes sensibilizados a Cyn d 1, superior $\times 1.4$ para Phl p 4, superior $\times 1.9$ para Cup a 1, superior $\times 1.9$ para Pla a 2 y superior $\times 1,7$ para Art v 1. En cualquier caso, la proporción de pacientes MUXF3-positivos entre estos subgrupos fue bastante baja, lo que significa que cualquier posible falsas positividades debido a la reactividad CCD no habría influido de forma relevante en los resultados. En su estudio, la población sensibilizada a cupresáceas era de un 14.1% (Panzner P, 2014)

1.1.5.2.5 Proteínas transportadoras de lípidos - LTP

Las proteínas transportadoras de lípidos son proteínas de 9 kDa, cuya función principal es defensiva y estructural (Fernandez-Rivas M, 2003). Se trata de una proteína de defensa, como los homólogos de Bet v1, pero del grupo 14 (PR 14). Se encuentra en diferentes pólenes: plátano de sombra (Pla a3), olivo (Ole e7) y en alimentos, como el melocotón (Pru p3). Se ha encontrado una prevalencia de sensibilización del 60% en los alérgicos al melocotón. Es una proteína altamente resistente a la digestión, la temperatura y la fermentación, y estas características son las que le confieren la capacidad de ser un sensibilizante primario por vía digestiva y de producir reacciones sistémicas, por llegar intacta al tubo digestivo. (Cuesta-Herranz J, 1998).

1.1.5.2.6 Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas. Taumatinas (TLP)

La familia 5 de las PR (PR-5) comprende un conjunto de proteínas con diversas funciones dentro de estos mecanismos de defensa. Debido a las homologías de secuencia entre PR-5 y taumatina, una proteína con un intenso sabor dulce aislada del fruto del *Thaumatococcus daniellii* (arbusto tropical de la familia Marantacea), los miembros de esta familia de proteínas se denominan taumatinas (Thaumatococcus like proteins)

Se han descrito varias Taumatinas alergénicas cuyas fuentes son frutas, frutos secos, pólenes, cereales e incluso maderas: Mald 2 de manzana, Act d 2 de kiwi, plátano (Mus a 4), naranja (Cis s TLP), melocotón (Pru p 2), melón (Cuc m TLP), níspero (Man Za TLP), aceituna (Ole e 13), almendra (Pru d 2), avellana (Cor a TLP), castaña (Cas a TLP), lechuga (Lac s TLP) y coliflor (Bra 0 TLP)

También se ha identificado como alérgenos en pólenes. Jun a 3, taumatina del polen de *Juniperus ashei* fue la primera TLP de polen descrita. Posteriormente se describe la taumatina de *Cupressus arizonica* (Cup a 3), *Cupressus sempervivens* (Cup s 3) y de *Cryptomeria japonica* (Cry j 3) como alérgenos respiratorios. Otras TLP descritas como alérgenos respiratorios más allá de las cupresáceas es la taumatina de polen de plátano de sombra (Pla a TLP), de artemisia (Art v TLP), de polen abedul (Bet v TLP), de marihuana (Can s TLP) e incluso de alérgenos respiratorios ocupacionales como es el caso de la taumatina de harina de trigo (Tri a TLP) o la de madera de Obeche (Trip s TLP) (Bartra J, 2015).

1.1.5.3 Reactividad cruzada entre pólenes y alimentos

Dentro del fenómeno de reactividad cruzada nos encontramos que la sensibilización primaria por inhalación de un alérgeno puede provocar la reacción alérgica posterior a un alimento. Éste es el caso de la reactividad cruzada entre aeroalérgenos de pólenes y ciertos alérgenos de alimentos que provocan reacciones alérgicas frente a alimentos como frutas, vegetales y frutos secos: Homólogos de Bet v 1, profilinas y glucanasas (Síndrome látex-frutas, las beta 1,3-glucanasas, pertenecientes a la familia de las PR-2, presentes también en el látex, Hev b2). En algún caso se ha descrito también la LTP como fuente de reactividad cruzada entre pólenes y frutas (Cuesta-Herranz, 1999).

En el área mediterránea destaca la reactividad cruzada de las profilinas de las gramíneas (Phl p 12) con profilinas de frutas de la familia rosacea, sobre todo el melocotón. Como son moléculas sensibles a la desnaturalización térmica y a la digestión gástrica, la alergia alimentaria ocasionada por las profilinas está confinada al desencadenamiento del síndrome de alergia oral (SAO) solamente tras la ingestión de alimentos crudos.

En el norte de Europa es el Bet v 1, el alérgeno principal del polen de abedul, quien reacciona con otras frutas de la familia rosáceas como la manzana (Mal d 1), y vegetales de la familia apiáceas, como el apio (Api g 1) y la zanahoria (Dau c 1). (Pomés A, 2007).

Las Taumantinas están relacionadas con la alergia a fruta predominantemente en los pacientes con polinosis asociada, pero también tenían perfiles de sensibilización relacionada a las áreas geográficas de estudio (Palacín A, 2012).

Otros alérgenos de reactividad cruzada como los miembros de las familias pectatoliasa, LTP, y Ole e 1 muestran un patrón de reactividad heterogéneo. En estos casos la reactividad cruzada se limita principalmente a las moléculas estrechamente relacionadas con alta identidad de secuencia y puede variar en diferentes poblaciones (Pablos I, 2016).

1.2 DIAGNOSTICO ETIOLOGICO DE LAS ENFERMEDADES ALERGICAS

1.2.1 Evolución histórica

En las enfermedades alérgicas, el diagnóstico recae en tres pilares básicos: una anamnesis dirigida lo más exhaustiva posible, a veces casi detectivesca para identificar a que se expone el paciente, una exploración física rigurosa y la demostración, mediante exploraciones complementarias in vivo (pruebas cutáneas habitualmente) e in vitro (en fluidos o secreciones), de la existencia de IgE específica del alérgeno sugerido por la anamnesis. En algunas ocasiones es precisa una prueba de provocación con el o los alérgenos sospechosos para concluir el diagnóstico.

1.2.1.1 Historia clínica

La herramienta principal para evaluar las enfermedades alérgicas respiratorias, es la historia del paciente.

En la anamnesis de las enfermedades alérgicas respiratorias es relevante conocer, si es posible, si el origen de los síntomas es un alérgeno de interior o de exterior. En el interrogatorio al paciente es necesario determinar la estacionalidad de ellos, incluso detallando en que meses los presenta, especialmente si sospechamos que el polen es su causa. También por ello debemos conocer la Aerobiología de la zona donde se da la patología y correlacionar la clínica con la presencia de alérgenos en esa atmosfera.

Las investigaciones con pruebas de diagnóstico incluyen pruebas cutáneas con extractos alérgicos completos, y determinación de IgE específica en suero para los extractos alérgicos completos y para componentes individuales.

1.2.1.2 Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas como método diagnóstico comenzaron a emplearse en el siglo XIX (Charles H. Blackley, en 1865) y, sin grandes modificaciones técnicas, se han continuado aplicando hasta nuestros días. En el caso de la alergia respiratoria la técnica que habitualmente se usa es la intrapícdérmica o prick test. Ofrece gran rentabilidad diagnóstica y al principio solían tener mayor sensibilidad que las pruebas de laboratorio con alérgenos con poca actividad alérgológica. La simplicidad, rapidez, bajo coste y alta

sensibilidad hace que continúe siendo la prueba inicial de aproximación diagnóstica al paciente alérgico, cuando sospechamos una alergia respiratoria. Realizadas por personal cualificado y experto son habitualmente seguras, rápidas en su realización, tienen un coste asumible y son fiables. La reactividad cutánea se ve modificada por algunos fármacos (antihistamínicos y ciertos antidepresivos), por lo que debemos suspenderlos antes de realizar la prueba. Las indicaciones de las pruebas cutáneas se basan en una correcta historia clínica, confirmando o no la sospecha de una hipersensibilidad mediada por IgE.

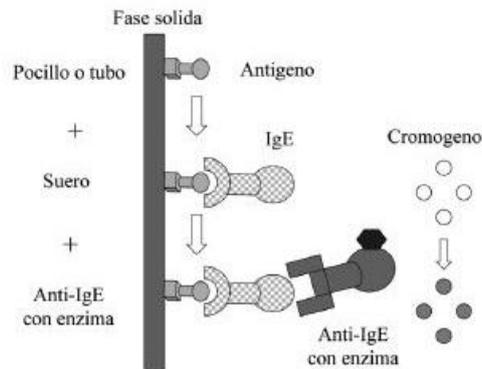
Desde el principio de la Alergología, el diagnóstico y el tratamiento de estas enfermedades se han basado en el empleo de extractos provenientes de fuentes alergénicas naturales. Una fuente alergénica es un tejido, partícula, alimento u organismo capaz de inducir alergia (por ejemplo, caspa de gato, *Dermatophagoides pteronyssinus*, leche, *Aspergillus fumigatus*, polen de *Phleum pratense*, etc.). Estos extractos eran una mezcla cruda no fraccionada de proteínas alergénicas y no alergénicas, polisacáridos y lípidos obtenidos de la extracción de una fuente alergénica (por ejemplo, granos de polen) aunque con el tiempo se han conseguido purificar más. (Migueres, 2014)

Aunque la cantidad de alérgenos a probar puede ser enorme, la selección de los alérgenos se realizará en función de los datos de la anamnesis sobre el medio ambiente del paciente (Scadding G, 2011) (Bousquet J, 2012) (EAACI, 1989)

1.2.1.3 Determinación de la IgE específica

La historia de las pruebas in vitro (de laboratorio) para el diagnóstico alergológico se inició a principios de los años setenta, poco después del descubrimiento de la IgE, en 1967. Para la determinación de la IgE específica se desarrollaron métodos basados inicialmente en radioinmunoensayos y posteriormente en enzimo-inmunoensayos (RAST, ImmunoCAP System, AlaSTAT, AdviaCentaure,...), capaces de detectar esos anticuerpos en el suero de los pacientes alérgicos. Ello vino a complementar de manera consistente la información obtenida mediante las pruebas cutáneas, a la vez que permitió “cuantificar” en cierto modo la “intensidad” de la alergia en un paciente determinado. Sin embargo, mediante estas técnicas in vitro solo se identificaban anticuerpos específicos frente a fuentes proteicas enteras (ácaros, pólenes, alimentos).

Figura 1.6 Inmunoanálisis en fase sólida para la cuantificación de IgE específica



Aportan una información objetiva, al permitir, en la mayoría de los casos, confirmar o excluir la sensibilización. Sin embargo, aunque detectan la sensibilización a un alérgeno, no pueden predecir su importancia clínica. Para que una prueba cutánea y/o la determinación de IgE a extracto completo positiva frente a un alérgeno tengan valor diagnóstico en la alergia respiratoria, se debe demostrar que los síntomas del paciente son producidos por la exposición a ese. En relación a la polinosis, existe un alta correlación significativa entre los niveles de polen en la atmósfera y de IgE específica en el suero sanguíneo, menor en el caso de las pruebas cutáneas y los valores de polen atmosférico (Rodríguez D, 2011).

Otra desventaja aún más importante de los extractos alérgicos es que son incapaces de diferenciar entre la sensibilización inmunológica primaria y una reactividad cruzada.

1.2.1.4. Limitaciones actuales de los extractos

En los últimos años se ha logrado un gran avance en el control de la producción de los extractos, mejorando enormemente en su caracterización y estandarización, pero nos seguimos encontrando con limitaciones que originan una menor precisión diagnóstica.

La falta de unificación entre las diferentes compañías farmacéuticas fabricantes de extractos alérgicos para su preparación y estandarización, hacen que éstos puedan diferir considerablemente unos de otros por lo que dos pruebas de prick realizadas con un mismo extracto de dos fabricantes diferentes no son equivalentes. Estas diferencias pueden deberse a diversas causas como la variación en la procedencia de la materia prima; distintos métodos, tiempos y soluciones de extracción; el tamaño del poro de diálisis y a los métodos de valoración de los alérgenos para asignarles una potencia

biológica determinada. En la estandarización *in vivo*, es igualmente necesario unificar los criterios de selección de los pacientes para obtener resultados homogéneos. Los métodos de valoración, aunque el principio científico sea el mismo, deben ser uniformes y estar validados; de otra forma, estas variaciones pueden agravarse. El objetivo final de todos debe ser la obtención de extractos que sean consistentes y reproducibles, estables, y con eficacia

Otras limitaciones son que hay un posible riesgo de contaminación con alérgenos o material no deseado (glicoproteínas capaces de unirse a la IgE), que nos encontremos con alérgenos relevantes en determinadas áreas geográficas ausentes o presentes solo en pequeñas cantidades. También la presencia alérgenos minoritarios o alérgenos de poca relevancia clínica para algunos pacientes que pueden conducir a la unión de la IgE por reactividad cruzada. Los extractos naturales permiten únicamente identificar la fuente alérgica, pero no las moléculas concretas a las que un paciente se encuentra sensibilizado. Este problema también nos lo encontramos en el tratamiento de las enfermedades alérgicas ya que en la inmunoterapia se aplica con estos extractos (Valenta R, Niederberger V 2007) (Chapman MD. 2000)

1.2.1.5 Evolución de los métodos diagnósticos

La aplicación de técnicas de biología molecular a la Alergología proporciona un importante avance al permitir cuantificar los anticuerpos IgE específicos para las moléculas alérgicas puras.

Ambas formas de abordar el diagnóstico alergológico son complementarias, de forma que se inicia el estudio investigando las fuentes alérgicas que desencadenan la sintomatología y posteriormente se identifican individualmente los componentes alérgicos concretos frente a los que está sensibilizado el paciente. De este modo se obtiene información muy relevante para realizar un diagnóstico preciso de la alergia y en su caso, para la aplicación de tratamientos desensibilizantes con alérgenos como es la inmunoterapia específica.

1.2.2 Diagnóstico Molecular

Los alérgenos recombinantes son moléculas alergénicas, originariamente identificadas en los extractos alergénicos, pero que se han sintetizado mediante técnicas de biotecnología. La mayoría de los alérgenos recombinantes tienen una capacidad de unión a los anticuerpos IgE comparable con el alérgeno de origen natural. En la actualidad se ha logrado obtener los alérgenos más importantes mediante técnicas de recombinación. Las aplicaciones diagnósticas de los alérgenos recombinantes son muy importantes pudiéndose usar, en algunos casos, como sustitución de los extractos alergénicos con mejoría del rendimiento diagnóstico, para la estandarización de extractos alergénicos y en el diagnóstico alergológico molecular (Chapman MD, 2000).

El diagnóstico alergológico molecular es una estrategia destinada a la identificación de los alérgenos a los que se encuentra sensibilizado un paciente a escala molecular por medio de moléculas alergénicas (componentes alergénicos). Estas pueden estar purificadas de fuentes naturales (alérgeno natural purificado) o se pueden producir por técnicas de ADN recombinantes (alérgeno recombinante). El término Component resolved diagnosis (CRD) – diagnóstico por componentes alergénicos – fue acuñado por el grupo de Valenta al final de los años noventa y abrió una nueva etapa en el concepto diagnóstico e inmunopatología de la alergia (Valenta, 1999).

Los componentes alergénicos se pueden agrupar en distintas familias en base a la similitud estructural. Las consecuencias de la sensibilización a miembros de estas familias dependen de sus propiedades, de la cantidad en que están presentes en las fuentes alergénicas y su homología con el alérgeno sensibilizante primario. Algunos componentes alergénicos son específicos de una fuente alergénica (Phl p1 del polen de gramíneas, Ole e 1 del polen de olivo, Cup a 1 del polen de cupresáceas,...) mientras que otros pueden aparecer en muchas fuentes alergénicas (Profilina, Polcalcina, LTP,...).

Desde su aparición las técnicas de diagnóstico molecular han adquirido cada vez mayor difusión en la atención alergológica ordinaria

El diagnóstico molecular desempeña un importante papel en tres aspectos básicos en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas:

1. Aporta una mayor precisión diagnóstica. Permite la distinción en los pacientes polisensibilizados entre la sensibilización primaria y la sensibilización cruzada, con la consiguiente mejora en el conocimiento de los alérgenos desencadenantes. Además permite la identificación de nuevos alérgenos capaces de explicar reacciones alérgicas cuyo origen era previamente desconocido. También es un instrumento para el diagnóstico de la conjuntivitis vernal (Armentia A, 2016) y en la esofagitis eosinófila (Armentia A, 2015) (Casquete-Román E, 2009).
2. Biomarcadores de riesgo o probabilidad de tolerancia. Como es el caso de la evaluación de la sensibilización a componentes de alérgenos estables que pueden provocar reacciones sistémicas (LTP) o la sensibilización a componentes inestables que se relaciona, sobre todo, con reacciones locales (profilina). Esto reduce la incertidumbre del paciente antes el riesgo de reacciones graves sobre todo en relación con la alergia alimentaria y permite reducir las pruebas de provocación.
3. También puede mejorar la indicación y la selección de alérgenos adecuados para la inmunoterapia específica (ITE), ya que la identificación del alérgeno que produce la enfermedad es un requisito previo para la prescripción precisa de este tratamiento. Asimismo, el CRD podría predecir las reacciones adversas a la ITE. (Canonica GW, WAOJ 2013) (Ferrer M, 2009). De esta manera, la prescripción de la inmunoterapia basada en los resultados del estudio alergológico sería considerablemente diferente en función de la información procedente del estudio convencional o del análisis molecular. En la misma dirección apuntan el consenso de numerosos Alergólogos de España (Vidal C, 2014) sobre el diagnóstico y la indicación de inmunoterapia en pacientes polisensibilizados. Otros autores encuentran que, en pacientes alérgicos a pólenes en zonas de elevada exposición y polisensibilización a los mismos una vez realizado el diagnóstico por componentes moleculares, existe una escasa concordancia con el diagnóstico convencional, haciendo necesario un cambio en la composición de los extractos de inmunoterapia en relación con la prescripción inicial (Landivar M, 2012) (Sastre J, 2012). MT Lizaso y cols. comunican una modificación en el

diagnóstico inicial en el 30% de los pacientes polínicos una vez realizado el diagnóstico por componentes moleculares (MT Lizaso, 2011).

Otro aspecto que nos aporta el diagnóstico por componentes es que nos ayuda a identificar patrones de sensibilización según área geográfica y a establecer unos factores pronósticos en la alergia a aeroalérgenos. Ejemplo de esto es el estudio EXPO, estudio de la exposición en pacientes polínicos, en el cual se incluyeron más de 2000 pacientes y que nos permite conocer la prevalencia real de la sensibilización a pólenes empleando técnicas de diagnóstico molecular. Este estudio ofrece interesantes datos que nos ayuda a conocer la interacción entre la exposición ambiental a pólenes y los diferentes perfiles de sensibilización, estableciendo unos factores pronósticos en la polinosis de acuerdo a la presencia de sensibilización a diferentes moléculas (Barber D, 2008).

La técnica de diagnóstico molecular se basa en el análisis de biochips de ADN y la medición de anticuerpos IgE específicos frente a numerosos componentes alérgenos. A través de un sencillo análisis de sangre del paciente, se cruzan los componentes alérgenos con los anticuerpos IgE procedentes del suero del paciente.

En la actualidad se han desarrollado soportes con un número creciente de moléculas recombinantes y purificadas: ImmunoCAP (Thermofiser), ADVIA Centaur (Siemens) o ImmuLite (Siemens). No obstante, como cualquier herramienta de laboratorio, su resultado siempre debe ser interpretado en función de la historia clínica del paciente. En la actualidad disponemos de un número relativamente limitado de alérgenos purificados o recombinantes, y aunque muchos de ellos son los alérgenos más importantes, su sensibilidad diagnóstica no es la ideal. Esto hace recomendable utilizar en algunos casos extractos estandarizados completos, bien en una prueba de prick o midiendo la sIgE, junto con la determinación de IgE a componentes moleculares para evitar falsos negativos en el diagnóstico.

Hay disponibles varias bases de datos que contienen información detallada sobre las familias de proteínas y alérgenos, destacando la base de datos oficial de nomenclatura de alérgenos, International Union of Immunological Societies (<http://www.allergen.org>). Existen otras bases de datos como Allergome (<http://www.allergome.org>), basada en las publicaciones sobre alérgenos.

El diagnóstico molecular lo podemos utilizar como herramienta diagnóstica en varios tipos de plataformas según el número de alérgenos estudiados a la vez: uniplex (1), multi-alérgico (<10) y multiplex (>100), con características particulares de diseño y rendimiento. En la uniplex (un ensayo por muestra) se analizan componentes individuales acoplados a las matrices convencionales utilizadas para la determinación de IgE específica (ImmunoCAP y otros). Permite al médico escoger las moléculas alérgicas cuando solo quiere estudiar un número reducido y puntual de alérgenos. Las plataformas multiplex permiten varios ensayos por muestra y detectan simultáneamente más de un centenar de componentes alérgicos en una pequeña muestra de suero. Posibilita la caracterización de la respuesta IgE contra un amplio abanico de alérgenos preseleccionados depositados en un chip con independencia de la historia clínica. La tecnología multiplex basada en microensayos del sistema ISAC® Thermofisher, Uppsala, Sweden (Immuno-Solid phase Allergen Chip - Chip de inmunoensayo de alérgenos en fase sólida) es actualmente la plataforma más completa que mediante la tecnología de las micromatrices es capaz de analizar más de 130 componentes alérgicos. Se ha presentado otra plataforma multiplex llamada FABER 244.

Varios estudios recogidos en el artículo de WAOJ analizan la reproducibilidad de este inmunoensayo y han comparado el chip ISAC con otros métodos de medición de sIgE. Los resultados ISAC han sido similares a los obtenidos en las plataformas uniplex aunque la concordancia de resultados varía según el alérgeno analizado. No obstante el ImmunoCAP es más sensible que ISAC en presencia de niveles bajos de IgE específica lo que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de este último y de contrastarlos con los antecedentes clínicos de los pacientes. También hay autores que informan que los resultados obtenidos por ImmunoCAP para la IgE específica no son equivalentes a los obtenidos mediante ISAC. Los pacientes más idóneos para estas plataformas multiplex son pacientes polisensibilizados en los que se sospecha la sensibilización a alérgenos de reactividad cruzada, especialmente cuando intervienen alérgenos alimentarios (Canonica GW, WAOJ 2013) (Goikoetxea MJ, 2013).

En un estudio recientemente publicado informan que en general, el ISAC permitió identificar sensibilizaciones clínicamente relevantes en pacientes con más de 2 sensibilizaciones. Las pruebas inmunoalérgicas para cada polen revelaron sobrediagnóstico de la alergia al polen de parietaria, gramíneas y plátano, y subdiagnóstico de la alergia al polen de olivo y de ciprés. Estos hallazgos, según ellos,

podrían ser explicados por los resultados falso-negativos de las pruebas cutáneas utilizadas en una sola aplicación, incluso cuando se realizan por técnicos especializados (sólo en 2 casos). Proponen que se debería de probar más de un 1 extracto comercial de polen ciprés y de olivo y apoyan la utilidad del diagnóstico por componentes en áreas con sensibilizaciones complejas a pólenes (Depreux N, 2016).

En relación a al diagnóstico molecular de alergia a cupresáceas usando nCup a 1, Cabrera-Freitag P publican un artículo en que se compara la rentabilidad diagnóstica (sensibilidad y especificidad) entre el ImmunoCAP frente al extracto total de *C arizonica* y Cup a1 en ISAC CRD103 (12 alérgicos/92 controles), concluyendo que se encuentran resultados similares entre ambas técnicas si los valores límite se establecen en 0.66 kU/L (ImmunoCAP Se: 91.7, Sp: 89.1) (Cabrera-Freitag P 2011).

BE Garcia y col (Tabla 1.3) en su estudio para determinar la exactitud diagnóstica de ISAC 112 en alergia al polen de diversos taxones y su utilidad clínica en una población española cuando analizan nCup a1 obtienen una correlación alta tanto en la plataforma uniplex como en la multiplex (García BE, 2016).

Tabla 1.3 Valoración de la exactitud diagnóstica de ImmunoCAP ISAC 112 en alergia al polen de cupresáceas usando Cup a 1 (García BE, 2016).

	Se%	Sp 1,%	Sp 2,%	PPV	NPV	AUC
ISAC112	88	97.8	92.9	81.5	95.6	0.905
UNIPLEX	81.4	100	NR	100	72.9	0.907

Abreviaturas de la tabla: AUC, área bajo la curva; NPV, valor predictivo negativo; PPV, valor predictivo positivo; Se, sensibilidad; Sp 1, especificidad calculada con pacientes control sin alergias a las plantas; Sp 2, especificidad calculada incluyendo pacientes con alergias a plantas.

La transición de extractos alérgicos a moléculas para el diagnóstico de reacciones o enfermedades mediadas por IgE tiene un gran potencial, pero requiere un conocimiento

detallado e interpretación inteligente. La relevancia de las respuestas de los anticuerpos IgE específicos de los alérgenos específicos, ya sea a extractos o moléculas, sólo puede ser determinada por el médico basándose en el contexto clínico (historia, provocación) y no por el propio test.

1.3 RECUENTOS DE POLEN

Como hemos comentado antes Blackley fue uno de los primeros investigadores en la polinosis que desarrolló varios tipos de colectores de pólenes. En 1946 el americano Durham propuso su método estandarizado de muestreo gravimétrico y en 1952 JM Hirst desarrollo el primer colector de aspiración.

A finales de los 70 la casa Burkard desarrolló el Burkard Seven Day Volumetric Spore-Trap®, colector basado íntegramente en el método de Hirst, pero con la ventaja adicional de que la impactación se produce en una cinta de 345 mm en lugar de un porta de 76 mm, lo que le permite un tiempo de muestreo ininterrumpido de 7 días en lugar de las sólo 24 horas del Hirst. El colector Burkard es el más usado por la mayoría de las redes de colectores de todo el mundo y es el que viene utilizando la Red de Colectores de la SEAIC desde que ésta se iniciara en la década de los setenta (Subiza, E, 1986)

Los recuentos de pólenes se realizan a través del muestreo del aire mediante un colector de pólenes: los pólenes se analizan microscópicamente y se informa de una relación cuantificada de taxones polínicos correspondiente a los datos brutos de un período definido de tiempo (día, semana...). Se utiliza el taxón porque no siempre puede identificarse de qué especie procede el polen. De hecho, la mayoría de veces la precisión llega sólo a nivel de género o familia. Los resultados se expresan en unidades de concentración: pólenes/m³, que es el número medio de granos de polen contenidos en un espacio cúbico de un metro de lado, durante el tiempo que dura el muestreo (Belmonte J. 2002).

En España están funcionando dos grandes redes de muestreo atmosférico, la del Comité de Aerobiología de la SEAIC, y la de la Red Española de Aerobiología (REA) y en nuestra comunidad la de la Junta de Castilla y Leon.

Esta información de los recuentos polínicos se trasmite a la población a través de los medios de comunicación (televisión, internet, prensa, radio, telefonía móvil – sms o aplicaciones-) con el fin de predecir la potencial intensidad de los síntomas y aplicar medidas de evitación o adecuar la planificación de los viajes de ocio o trabajo (Subiza J, 2001)

1.3.1 Utilidad clínica de los recuentos de pólenes

Desde entonces hasta nuestros días, los avances tecnológicos aplicados a la aerobiología y en concreto a la palinología, han permitido un mejor y más exhaustivo conocimiento de esta disciplina, teniendo como fin último la aplicación práctica en un más preciso diagnóstico y en consecuencia, más adecuado tratamiento del paciente polínico. Aún así hemos de aceptar que en esencia seguimos haciendo lo que comenzó a realizar hace casi dos siglos el Dr. Blackley: conociendo los pólenes a los que se halla expuesto en cada momento del año el paciente polínico y los períodos de presentación de síntomas, confirmar la sospecha diagnóstica mediante la realización de test cutáneos.

El mapa polínico de una zona determinada puede considerarse como un fiel reflejo de su flora anemófila, con información detallada de los pólenes que pueden ser causa de polinosis y precisión del período de polinización de cada taxón, constituyendo así, para el alergólogo, un elemento básico para el correcto diagnóstico etiológico del paciente polínico (Subiza J 2001). Permite asimismo entender la variabilidad de los síntomas de unos años a otros en un mismo paciente debida a la, en ocasiones, gran diferencia interanual objetivada en los recuentos en una misma zona así como las variaciones de la intensidad de los síntomas al trasladarse de unas áreas geográficas a otras.

La vigilancia polínica permite detectar y valorar el aumento de concentraciones de ciertos pólenes en un área determinada, consecuencia de cambios climatológicos, efectos de la urbanización o de la propagación de especies vegetales, considerándolos como potenciales nuevos agentes causantes de polinosis en zonas en las que previamente podían no ser de interés alergológico (Subiza J, Feo Brito 1998). (Gonzalez Galán I, 1998), (Subiza J, Jerez M, 1998) (Tavira Muñoz J, 1998) (González Minero FJ, 1998) (Subiza J, 1992) (Subiza J, 1994) (Varela S, 1997) (García González JJ, 2002) (García JJ, 1997) (Vidal C, 2001) (Marcos C, 2001) (Asero R, 2002) (Sneller MR, 1993)

Una de las más útiles aplicaciones de los mapas polínicos es la de poder establecer una correlación entre los recuentos y la aparición cronológica e intensidad de los síntomas recogidos por el paciente polínico en las cartillas elaboradas al efecto, resultando de una gran ayuda en la interpretación de los test cutáneos:

- Permitiendo considerar ciertas positividadades como sensibilizaciones subclínicas, si no se acompañan de sintomatología durante el período de polinización. O positividadades sin trascendencia cuando se trata de pólenes ausentes en la zona y que pueden explicarse por exposición y sensibilización subsecuente en otras zonas geográficas en las que ha residido previamente el paciente.
- Nos ayuda asimismo a considerar a ciertos pólenes como de escasa alergenidad, cuando aun estando presentes en concentraciones no despreciables no son capaces de sensibilizar a la población.
- Valoración del paciente polisensibilizado y que complica sobremanera el tratamiento con ITE

(Velloso A, 2002) (Subiza J, Jerez M 1995).

Desde el punto de vista del rigor científico, constituyen un elemento fundamental en todo trabajo de investigación, tanto de eficacia clínica de fármacos antialérgicos como de inmunoterapia en polínicos.

Incluso en lo que a política sanitaria se refiere, el conocer los períodos de alto riesgo polínico permite una mejor preparación de servicios de urgencias hospitalarios, que con frecuencia se ven colapsados en dichos períodos (Lierl MB, 2003) (Cabrera M, 1998).

Además esta información es de gran utilidad para el paciente, que conociendo el período de polinización de las especies a las que se halla sensibilizado, va a entender mejor su enfermedad, lo que conlleva de entrada, una mejor tolerancia. Va a poder estar preparado para seguir las medidas preventivas de evitación de exposición así como seguir el tratamiento sintomático en el momento adecuado. Podrá asimismo "organizar" su vida en lo que se refiere a actividades de ocio, desplazamientos y elección de períodos y destinos vacacionales.

1.3.2 Factores que pueden interferir en la correlación recuentos-síntomas

Si bien de forma global se acepta que existe correlación significativa entre recuentos de pólenes y síntomas que presentan los pacientes (mediante la valoración de la intensidad de síntomas en cartillas-calendario), existen ciertas "limitaciones" que es preciso tener en cuenta y que explican el por qué en ocasiones puede verse alterada dicha correlación (Subiza J, 1992) (Varela S, 1997) (Martínez-Cócera C, 2000) (Ferreiro M, 2002) (Muñoz Pereira M, 2000). (Frenz DA, 2001).

- Factores relacionados con la ubicación del colector.

Se han establecido al respecto una serie de recomendaciones (Jäger S. 1995) (D'Amato. 1995) que deben seguirse como son la altura (aproximadamente a 15 metros sobre el nivel del suelo) y la ubicación lejos de edificios altos colindantes, así como de fuentes emisoras de polen potencialmente importantes, ya que la vegetación próxima al colector contribuye en gran medida al polen captado por el mismo. Se ha demostrado que existen variabilidades de hasta un 25% en las concentraciones de polen en una misma ciudad. Comparando recuentos de colectores en diversos puntos de una misma ciudad se ha comprobado que las diferencias son menores para los pólenes procedentes de fuentes emisoras de fuera de las ciudades, como ocurre en el caso de las gramíneas, en comparación con los pólenes procedentes del ámbito urbano como ocurre con ciertos árboles (*Platanus*). (Frenz DA, 2001) (Gonzalo-Garijo MA, 2006).

- Factores individuales, inherentes al paciente y ambientales.

Los recuentos obtenidos a partir de un colector pueden considerarse válidos para un paciente que se mueva en un radio de unos 10 Km en torno al mismo dependiendo del tipo de polen (Subiza J. 1995). Así pues, al valorar la relación entre los síntomas del paciente y los recuentos, ha de tenerse presente el lugar de residencia, en relación a la ubicación del colector, así como el tipo de vida: lugar y tipo de trabajo, viajes, vehículo que utiliza en sus desplazamientos, actividades en su tiempo de ocio, deportes al aire libre, salidas al campo, etcétera.

Se observa una diferencia significativa entre los diversos niveles de vivienda a favor de los pisos más altos. Se encuentra además una tendencia lineal en los resultados, especialmente con las gramíneas, de modo que aumenta la sensibilización frente a ellas

a medida que el piso es más alto. (Armentia A, 2004), (Malik P, 1990). Todos estos estudios se han realizado en localizaciones geográficas muy diversas y con características climáticas específicas de cada localización, lo que podría explicar en parte sus resultados. Parece ser que la tendencia natural del polen es a incrementar su concentración a medida que aumenta la altura. A pesar de la fuerza de la gravedad, los granos de polen son sometidos a corrientes de convección y turbulencias que los hacen elevarse sobre los niveles más altos de la atmósfera. Este fenómeno de dispersión se cumple especialmente en los pólenes pequeños y en los días soleados. En estas diferencias encontradas respecto a la altura hemos de tener en cuenta los factores citados antes. Por ejemplo, las muestras recogidas a diversas alturas parecen reflejar su procedencia. Así, se recogen pólenes de un área local cercana en las alturas más bajas; por el contrario, los niveles más altos nos permiten una visión más general y amplia del área circundante.

Las condiciones climáticas afectan también a las diferencias que podamos encontrar respecto a la altura (Hart ML, 1994). Especialmente en los días soleados, el polen se libera durante la mañana y asciende a medida que el aire se calienta, de modo que se encuentra en las capas más altas de la atmósfera durante las horas centrales del día para volver a descender al atardecer, cuando el aire vuelve a enfriarse.

Los parámetros meteorológicos que más parecen influir en la concentración de polen a diversas alturas son: la temperatura, la humedad, las horas de sol, la velocidad y dirección del viento y la lluvia (Alcazar P, 1999).

El rango de gravedad de la polinosis es muy amplio de paciente a paciente. Muchos pacientes presentan sensibilizaciones a otros pólenes que florecen simultáneamente con las gramíneas (*Olea europaea*, *Plantago sp*, *Rumex sp*. ...). El umbral de respuesta tanto nasal como bronquial va disminuyendo a lo largo de la estación, el efecto de “priming” descrito por Connell (en *Ambrosia*) según el cual, el umbral de respuesta de la mucosa nasal y bronquial disminuye a medida que avanza la estación polínica, de manera que cada vez es necesaria una exposición al alérgeno menos intensa para desencadenar síntomas (Connell, 1969).

No siempre coinciden los recuentos de polen altos con síntomas polínicos esos días. Se ha descrito que algunos pacientes pueden presentar síntomas después de unos días de lluvia, como consecuencia de una reacción tardía (Frenz DA. 2001) (Sack S, 1942)

La exposición humana a los pólenes también es variable, puede aumentar dependiendo de la actividad, como cortar el césped, ir en el automóvil con las ventanillas bajadas o realizar ejercicio al aire libre (Muilenberg ML, 1991), y del lugar donde se reside (Solomon WR 1984).

- **Partículas alergénicas fuera de los granos de polen.**

Se ha comentado antes, la existencia de pequeñas partículas aerovagantes, partículas submicrónicas, con actividad alergénica que escaparían a los recuentos, procedentes de otras partes de la planta o de los mismos granos de polen tras su ruptura (Solomon WR, 1983), (Agarwal MK, 1984), (Schäppi GF, Taylor PE, Pain MCF 1999), (Yli-Panula E, 1997), (Barnes C, 2000). En ocasiones se han detectado considerables picos de actividad alergénica divergentes en el tiempo, anteriores y posteriores a los períodos de polinización, como se ha descrito en relación a alérgenos de gramíneas en Madrid (Cabrera M, 2000), (Cabrera M, 2002) y a los que se han atribuido síntomas tardíos en ciertos pacientes. No obstante, algunos autores encuentran gran similitud cronológica entre recuentos de pólenes y actividad alergénica ambiental, y buena correlación de ambos con la intensidad de la sintomatología en los pacientes. Concluyendo que puesto que las dos opciones resultan de utilidad similar para una valoración clínica adecuada, parece suficiente la realización de un recuento de granos de polen, evitando técnicas de mayor dificultad y coste económico (Spieksma F T, 1999), (D'Amato G, 1994), (Spieksma FT, 1995), (Riediker M, 2001).

- **Factores que modifican la alergenicidad de los pólenes.**

Los recuentos de pólenes expresan la concentración de granos de polen detectados, pero son varios los factores que pueden influir en la mayor o menor alergenicidad de dichos granos. Se ha establecido un factor genético, inherente a la planta, así como influjos ambientales como que temperaturas medias más altas pueden justificar mayor alergenicidad del polen de abedul (Ahlholm JU, 1998). Otro estudio sugiere que la carencia de luz puede actuar como factor ambiental que podría justificar una mayor expresividad proteica y mayor alergenicidad en pólenes de abedul que crecen en zonas sombrías (Helander ML, J 1997).

Un estudio reciente ha demostrado que en zonas urbanas se produce un crecimiento más rápido de la ambrosía, con polinización más temprana y mayor producción de polen pero con menor alergenicidad del mismo en comparación con zonas rurales; atribuyen este comportamiento al influjo de la elevación de la temperatura media y de las concentraciones de CO₂, más manifiestas en el medio urbano y sugieren que dicho comportamiento sería similar a los efectos atribuidos al cambio climático global (Ziska LH, 2003).

Sin duda un factor que ha suscitado gran interés en los últimos años es el efecto de la polución atmosférica sobre el aumento de las enfermedades alérgicas (Fernández E, 1998), (Behrendt H, 1995), (Rusznak C, 1994), (D'Amato G, 2000). Los contaminantes pueden actuar directamente sobre los pólenes alterando la viabilidad del grano y modificando la liberación proteica del mismo (Thomas P, 1996). Ciertas alteraciones estructurales del grano de polen han sido asimismo atribuidas al efecto de los contaminantes (La Motta N, 1998). Las partículas procedentes de la combustión de motores diesel (cada vez más extendidos en países industrializados), cobran un interés especial al haberse demostrado que pueden actuar no sólo como transportadoras de alérgenos hasta las vías respiratorias sino por una acción adyuvante, que podría justificar un incremento en la alergenicidad del polen (Parnia S, 2002) (Muranaka M, 1986) (Knox RB, 1997) (Cortegano I, 2004) (Suarez-Cervera, Castells T, 2008).

1.3.3 Interpretación de los Resultados.

Un tema controvertido es la forma más adecuada de dar la información de los recuentos a los pacientes para que resulten de utilidad y no constituyan, por el contrario, una fuente de confusión. Una posibilidad es dar esta información en grados, es decir, hablaríamos de concentraciones bajas, medias o altas de pólenes. Estos datos son orientativos debido a factores del propio polen, de cada área, de los captadores y de los pacientes que hacen que las clasificaciones en términos cualitativos (bajo, medio o alto) pueden resultar demasiado arbitrarias: un recuento bajo para unos pacientes según su grado de sensibilización, puede ser alto para otros, o lo que puede ser bajo al inicio de la estación (efecto *priming* de Connell), puede resultar alto pocas semanas después.

Siguiendo las recomendaciones del Comité de Aerobiología de la SEAIC damos los datos totales de polen (granos de polen por metro cúbico de aire). De esta forma cada paciente pueda aprender a reconocer cuál es su cifra umbral de reactivación. Esta, puede orientarle para saber cuándo debe de iniciar o finalizar su tratamiento y de esa forma conseguir un mejor control de su enfermedad (J. Subiza, 2001).

De forma orientativa se han establecido estos niveles de alerta. Nivel medio significa que la mayoría los pacientes alérgicos a ese polen presentan síntomas.

Tabla 1.4 Niveles orientativos de alerta en granos/m³ (SEAIC)

	Bajo	Medio	Alto
<i>Cupressaceae/Taxaceae</i>	< 50	50-130	>130
Gramíneas	<10	10-50	> 50
<i>Plantago</i>	< 10	10-50	> 50
<i>Platanus</i>	< 50	50-130	>130
<i>Olea</i>	< 100	100-200	>200

1.4 LAS CUPRESÁCEAS O CUPRESSACEAE COMO FUENTE DE ALERGENOS

1.4.1 Introducción

Cupressus es el nombre latino del ciprés que de acuerdo con algunos autores proviene de "Cyprus" (Chipre), de donde es nativo y crece silvestre. El nombre recuerda una leyenda griega donde se relata la historia de "Kuparissos" quien se convirtió en un ciprés.

Las cupresáceas son plantas muy antiguas (Paleozoico).

En muchas civilizaciones ha tenido gran simbolismo religioso. En la cultura greco-latina ha tenido relación con las divinidades del infierno siendo el árbol de las regiones subterráneas, estando ligado al culto de Plutón, dios de los infiernos. En la cristiana adorna los cementerios e iglesias. En el Japón, su madera se usa en rituales y en la fabricación de diversos instrumentos de los sacerdotes y para la construcción de los templos. En China los yin, según Confucio, lo plantaban al lado de los altares de la Tierra (Chevalier J, 2009)

1.4.2 Taxonomía de las cupresáceas.

Se trata de árboles o arbustos, con hojas en forma de escama o aciculares, habitualmente perennes. Son de gran altura, pudiendo llegar hasta los 20 o 30 metros según especies y muy longevos. No tienen verdaderas flores y sus órganos reproductores pueden ser monoicos (en la misma planta los dos sexos) o dioicos (en distinta planta). La polinización es anemófila, eliminando gran cantidad de polen desde la base hasta la copa.

Son plantas con semilla al descubierto, es decir, pertenecen las Gimnospermas o Pinofitas.

Dentro de estas se encuentra la clase Coniferopsida, en la que se encuadran las Coniferales.

El orden Coniferales abarca especies de 7 familias. La Cupressaceae es la familia más ampliamente distribuida en todo el mundo. Es la familia de gimnospermas de mayor relevancia alergológica.

Otras gimnospermas como Pinaceae y Ginkgoaceae se han asociado con una menor incidencia de alergia. La familia *Pinaceae* tiene 5 géneros principales: *Abies* (abeto), *Cedrus* (cedro), *Picea* (abeto de Navidad), *Larix* (alerce) y *Pinus* (pino). La morfología del polen de las Pinaceae es completamente diferente del resto de las Coniferales y tienen una baja prevalencia entre las polinosis, menos del 5%. Además, no se ha demostrado reactividad cruzada entre las Pinaceae y el resto de Coniferales (Lewis WH, 1983)

La familia Cupressaceae está dividida en siete subfamilias, con aproximadamente 30 géneros y alrededor de 160 especies. Las subfamilias que principalmente contribuyen a las alergias al polen de ciprés son la Cupressoideae con los géneros *Cupressus*, *Juniperus* y *Thuja*, y la subfamilia Taxodioideae con los generos *Cryptomeria* y *Taxodium* (Asam C, 2015).

Al género *Cupressus* pertenecen: *C. sempervirens* (ciprés común), *C. arizonica* (arizónica), *C. macrocarpa* (ciprés de Monterrey), *C. funebris* (ciprés llorón) y *C. lusitánica* (ciprés de Portugal). Hay algún autor que mediante estudios moleculares asigna a *C. arizonica* a un nuevo género llamado *Hesperocyparis* llamándola *Hesperocyparis arizonica* (Adams RP, 2009)

Al género *Juniperus* pertenecen: *J. communis* (enebro común), *J. oxycedrus* (enebro de la miera), *J. phoenicea* (sabina negra), *J. thurifera* (sabina alba/blanca) y los *J. virginiana* y *J. ashei* (cedro de montaña). Estos últimos son causa muy importante de polinosis en Norteamérica (la del *J. ashei* llamada “fiebre del cedro”) y también en los Balcanes.

Figura 1.7 Distribucion mundial de la alergia a polen de cipres (Charpin, 2017)



A la familia *Taxodiaceae* pertenecen 10 géneros, entre las que se encuentran los árboles más viejos (2.000-3.000 años) y más altos del mundo (hasta 100 metros) como: *Sequoia dendrumgiganteum* (árbol del mamut) y *Sequoia sempervirens* (secuoya) y el *Taxodiummu cronatum* (ciprés mejicano). La importancia alergológica de esta familia la da la *Cryptomeria japonica* (cedro del Japón o Sugi), que ocupa el 18% del área total de la isla de Japón y es la causa de un 90% de las polinosis en Japón (llamadas allí Kafunsho) y el género *Chamaecyparis obtusa* (ciprés japonés), que se concentra en la región de Kanto y la parte oeste de la isla japonesa.

(Little DP, 2006) (Hart JA. 1987). (Moral de Gregorio A, 1998) (Ramírez DA. 1984) (Ishizaki T 1987) (Pola Pola J. 2015) (Moral de Gregorio A, 2016) (Okamoto Y, 2009)

1.4.3 Características botánicas, distribución, usos y etnografía.

La presencia de cupresáceas antes de la división de los continentes hace que sean la familia de coníferas con una distribución más global, pues las encontramos actualmente tanto en el hemisferio Norte como en el Sur, y en todos los continentes, excepto la Antártida. Los miembros de esta familia crecen en hábitats diversos pudiéndolas encontrar al nivel del mar o en altas regiones montañosas y desde tierras húmedas a suelos secos.

El aumento en la plantación de especies de la familia *Cupressaceae* como arbustos ornamentales en urbanizaciones, en parques y jardines, o para reforestación, es uno de los factores que explican el aumento de la prevalencia de esta polinosis.

Hay plantas importadas a la península Iberica entre las que están el *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus macrocarpa*, *Cupressus lusitanica*, *Platycadus orientalis*, *Thuja orientalis* (tuya, árbol de la vida chino), *Calocedrus decurrens* (cedro blanco de California), *Chamaecyparis lawsoniana* (cedro de Oregón o ciprés de Lawson en algunos puntos del norte de España). También hay especies autóctonas como: *Tetraclinis articulata* (Sabina de Cartagena, en la Sierra de Cartagena) y las del género *Juniperus*: *Juniperus communis*, *Juniperus sabina*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus navicularis*, *Juniperus phoenicea*, *Juniperus thurifera* y *Juniperus ashei* (Belmonte J, 1999)

La polinización es por viento (anemófila). La liberación de pólenes parece seguir un ritmo circadiano, produciéndose la máxima emisión entre las 9 y las 11 de la mañana. Las mediciones realizadas en las últimas décadas muestran una tendencia positiva de la emisión estacional del polen de ciprés. Durante el período de polinización, el polen de ciprés representa del 10% al 40% del polen total, mostrando una alta variabilidad de su producción anual (Mandrioli P, 2000). A causa de calentamiento global, el periodo de polinización tiende a durar más tiempo y las especies de cupresáceas se están estableciendo más al norte. En los países mediterráneos el ciprés es una de las especies de árboles de mayor relevancia alergológica.

1.4.3.1 *Cupressus*

En relación al género *Cupressus*, aunque no son originarias de Europa algunas de ellas como el *Cupressus sempervirens*, existen desde hace milenios en el área mediterránea donde ha tenido un gran simbolismo religioso plantándose en cementerios, monasterios e iglesias. También desde la antigüedad su madera ha sido bien apreciada. Otras como el *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa* son de reciente introducción. Su plantación se ha extendido por que se utiliza mucho en jardinería para la formación de setos y barreras cortavientos por su porte compacto y robusto. Es muy resistente a la sequía, tolerante a los fríos y a las heladas, y puede vivir en casi todo tipo de suelos. Se da bien en los terrenos secos y calcáreos admitiendo muy bien la poda. También se han utilizado en plantaciones forestales.

Figura 1.8 Plantaciones forestal en Castrojeriz (Burgos)



Figura 1.9 Fruto de *Cupressus arizonica*



En los últimos tiempos están proliferando, por ser muy resistente, rústico y adaptable a cualquier tipo de suelo, los setos y pantalla vegetal de *Cupressus leylandii* conocido como Leilandi o Ciprés de Leyland. Es un híbrido natural bigenérico entre *Cupressus macrocarpa* y *Chamaecyparís nootkatensis*. Su crecimiento es muy rápido haciéndolo ideal para setos bien tupidos por lo que su uso está muy extendido. Desafortunadamente para los alérgicos mantiene, aunque parece que algo menos, su capacidad alérgica.

Figura 1.10 *Cupressus leylandii*



Figura 1.11 *Cupressus sempervirens*



1.4.3.2 *Juniperus*

Del género *Juniperus* las especies más importantes desde el punto de vista alergológico son los enebros y las sabinas.

1.4.3.2.1 *Enebros*

Los enebros son arboles pequeños o arbustos que pueden llegar hasta los 10 metros. Son longevos y tardan en crecer. La polinización también es en invierno y principio de la primavera. Tienen unos frutos que se llaman gálbulos. De la fermentación de cereales que destilados con los gálbulos del enebro común se obtiene la ginebra. A este nuevo preparado lo llamaron Genievre («enebro», en francés).

Hay dos especies importantes. El *Juniperus communis* (enebro común) y el *Juniperus oxycedrus* (enebro de la miera)

El *Juniperus communis* (enebro común) es un arbusto o arbolillo de pequeña altura muy ramificado y de copa densa. Fruto globoso, azul negruzco y pruinoso.

Ampliamente distribuida en algunas zonas de la provincia de Burgos.

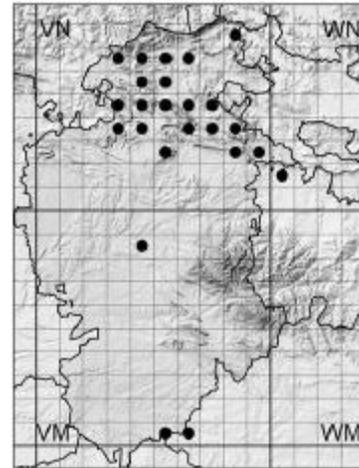
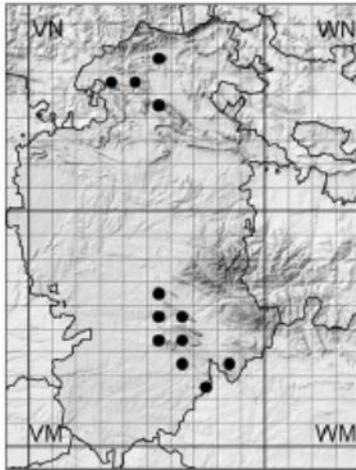
Tiene varias subespecies:

- *Juniperus communis communis*, la típica, que forma parte de bosques y matorrales. Erecto, denso y de forma columnar.
- *Juniperus communis alpina* Enebro rastrero, que se llama así por estar pegado al suelo.
- *Juniperus communis hemispaherica*, intermedio entre las dos anteriores

El *Juniperus oxycedrus* (enebro de la miera) arbusto o arbolillo de hasta 5 m con frutos pardos o rojizos florece de enero a abril. Tiene una distribución mediterránea, apareciendo las subespecies *oxycedrus* y *badia* en el bosque mediterráneo y la *macrocarpa* en zonas más áridas. De la destilación de la madera del enebro de miera se obtiene la miera o aceite de cade muy empleado tanto en veterinaria como en medicina. En nuestra provincia la distribución es variada según las subespecies.

Distribución del enebro de la miera (*Juniperus oxycedrus* L.) en la provincia de Burgos. (Alejandre, J.A2006) <http://www.pfcyl.es/sites/default/files/eventos/70.pdf>

Figura 1.12 *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *badia* Figura 1.13 *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*



1.4.3.2.2 Sabinas

Las sabinas son árboles de hasta 20 metros de altura como la *Juniperus thurifera* o sabina albar y arbustos como la *Juniperus sabina* o sabina rastrera. Aparece en el S y SE de Francia, el centro, este y sur de la Península y el norte de África. Crece en zonas de clima continental. Constituyen sabinares o forman parte de la vegetación de bosques. El mayor sabinar albar de Europa, se extiende entre las provincias de Soria y Guadalajara. También en Burgos encontramos *Juniperus phoenicea* que se distingue hojas pequeñas en forma de escamas y su fruto rojo y que florece de enero a abril. Forma unos "frutos o bayas" llamados gayubas. La madera es muy apreciada por los carpinteros y ebanistas; da excelentes postes y vigas al ser muy resistente a la putrefacción

Figura 1.14 Distribución de la *Sabina albar* (*Juniperus thuriferal.*) en la provincia de Burgos Alejandro, J.A. (2006); <http://www.pfcyl.es/sites/default/files/eventos/120.pdf>

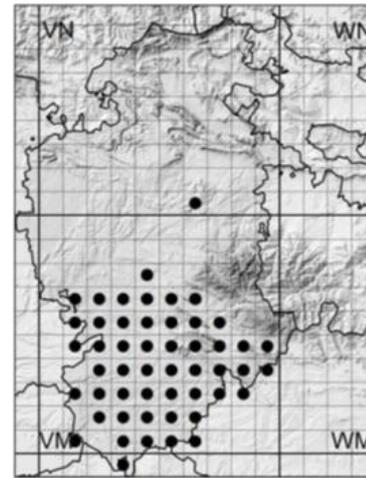


Figura 1.15 Sabinars del Arlanza

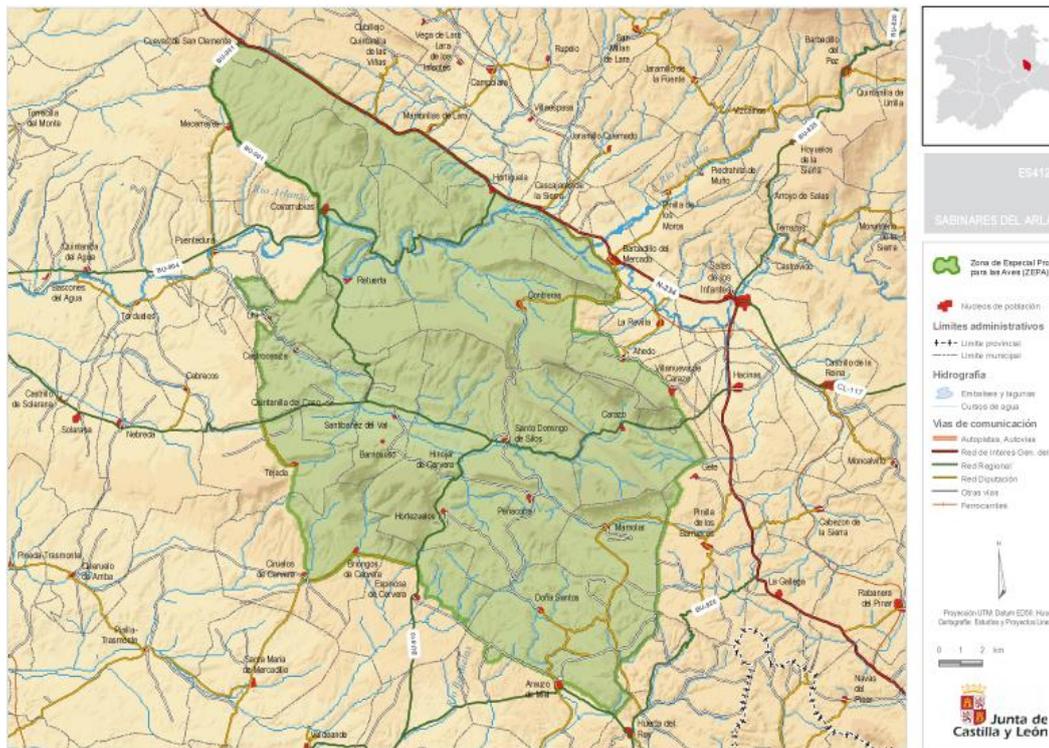


Figura 1.16 Sabina albar (*Juniperus thurifera*)



Figura 1.17 Sabina albar (*Juniperus thurifera*) Cedido por laboratorios Leti



1.4.3.3 Otras especies

Hay otras especies no presentes habitualmente en España pero de gran relevancia alergológica por la polinosis que producen:

- El cedro japonés o la *Crytomeria japonica* (Sugi) originario de Japón y China. Es árbol nacional de Japón. Tiene gran simbolismo patriótico y religioso, plantándose junto a los templos. Árbol muy grande, como otros de la familia de las taxodiáceas, pudiendo alcanzar los 70 m de altura y 4 m de diámetro de tronco. Es causa del 90% de las polinosis en Japón. En España las encontramos principalmente en parques. A este se suma la polinosis de *Chamaecyparis obtusa*, el Falso ciprés, camecíparis o en japonés hinoki, perteneciente a la familia de las cupresáceas, originaria del centro de Japón. Se cultiva por su madera de muy alta calidad en Japón, donde se usa como material para construir palacios, templos, santuarios, teatros tradicionales, baños y palas de tenis de mesa entre otros. Es también un árbol ornamental popular en parques y jardines, tanto en Japón como en otros lugares de clima templado incluyendo Europa occidental y partes de Norteamérica. También se cultiva a menudo como bonsái.

- *J. virginiana* y *J. ashei* (cedro de montaña) que es una de las causas más importantes de polinosis en el sur oeste de Estados Unidos (Texas, Nuevo México) y norte de Méjico.

También se han incorporado a la flora ornamental especies de los géneros *Thuja* y *Calocedrus*

(Charpin D, 2013) (Pola Pola J, 2015) (Moral de Gregorio A, 2016) (Allue Camacho C, 2015)

1.4.4 Morfología del polen de Cupressaceae.

Los granos de polen son muy uniformes dentro de la familia y también son muy similares a los de la familia Taxaceae, diferenciándose sólo en el tamaño. Por eso al identificar a estos pólenes al microscopio se les denomina *Cupressaceae-Taxaceae*, aunque olvidamos el resto de las familias de las Coniferales.

Todas las especies de Cupressaceae producen granos de polen esférico de aspecto muy similar. En el género *Cupressus*, el tamaño medio de los granos de polen hidratados varía de 25 a 40 μm , y difieren según su origen geográfico. El tipo de polen de Cupressaceae generalmente se describe como inaperturado, aunque se puede ver un poro circular débil en el material fresco. También se caracteriza por una exina muy delgada (membrana externa), por lo que algunos gránulos u orbicules (cuerpos de Ubisch) parecen estar dispersos, y hay una íntima muy gruesa (membrana interna). En condiciones de humedad hay una hidratación rápida de la intina que rompe la exina, saliendo el protoplasto que aparece abrazado por la intina lo que da la imagen clásica que vemos en la figura 1.18 (Danti R, 2010) (Charpin D, 2017).

Figura 1.18 Polen de Cupressaceae-Taxaceae. Cedido por laboratorios Leti



1.4.5 Aerobiología del polen de Cupressaceae.

La polinización es anemofila. El viento puede transportar el polen a cientos de kilómetros. Las especies de cupresáceas generalmente producen grandes cantidades de polen.

Sus órganos reproductores pueden ser monoicos (ambos sexos en la misma planta) excepto el género *Juniperus* que es dioico (en distintas plantas). Ocasionalmente producen una gran liberación de polen, por producirlo desde la copa hasta la base, debido a la estructura columnar que tienen estos árboles.

Como hemos comentado antes, el tipo polínico Cupressaceae incluye también las familias Taxaceae y Taxodiaceae. A pesar de la diversidad de especies incluidas en el tipo polínico Cupressaceae, la mayoría del polen recogido pertenece al género *Cupressus* debido al gran uso que se hace de sus especies con fines ornamentales. Las especies silvestres del género *Juniperus* polinizan con menos intensidad y usualmente crecen en zonas alejadas del área de muestreo de los captadores, aunque en nuestra provincia son muy comunes y están muy presentes en la flora de nuestra ciudad. Prácticamente, no hay ninguna zona de España libre de polen de cupresáceas (Belmonte J, 1999)

Pueden polinizar en cualquier época del año. Aunque el verano puede considerarse como un período libre de este tipo de polen, en el área mediterránea, los días sin este polen son raros. En España la polinización se produce en general desde octubre hasta el

final de la primavera, pero fundamentalmente entre enero y marzo, similar al resto de los países Mediterráneos (Belmonte J., 2000). Cada especie de cupresácea tiene sus épocas de floración. A modo orientativo *Juniperus oxycedrus* poliniza desde octubre a diciembre. El género *Thuja* en diciembre y enero. *Cupressus arizonica* desde noviembre hasta marzo solapándose con *Cupressus sempervirens*, que lo hace desde enero hasta incluso finales de mayo (Perez-Badía R, 2011) (Hidalgo PJ, 2003). Se ha recogido que las concentraciones diarias varían significativamente entre las áreas urbanas (por ejemplo, Madrid, Barcelona) y el campo (por ejemplo, Viella), donde son más bajas. Es común que se produzcan picos pronunciados de polen. Estos valores, que se deben a condiciones muy favorables para la polinización de plantas o el transporte de polen a largas distancias, también deben tenerse en cuenta al analizar los síntomas de los pacientes (Charpin D, 2017). Los inicios de las polinizaciones son variables dependiendo de factores como la temperatura ambiental (Fuertes-Rodríguez CR, 2007)

En Texas (EE. UU) el *Juniperus ashei* poliniza desde noviembre hasta marzo. *Cryptomeria japonica* poliniza en Japón desde febrero hasta abril.

Díaz de la Guardia y colaboradores, en Granada, determinaron que los niveles más altos eran en las horas centrales del día. También refieren que la presencia de polen de *Cupressaceae* en el aire tiene un comportamiento irregular, fuertemente relacionada con variables meteorológicas, de modo que la temperatura máxima, la temperatura media y la insolación aumentan generalmente el contenido de polen en el aire, fomentando tanto la emisión como la dispersión. Por el contrario, cuando la temperatura baja en invierno, la emisión se ve obstaculizada y el aumento de humedad y de precipitaciones provoca la agregación y deposición del polen. La lluvia antes de la floración incrementa la producción de polen. (Díaz de la Guardia, 2006).

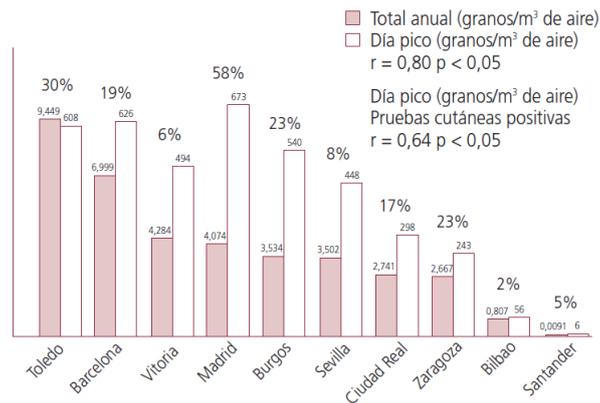
Benitez y colaboradores comparan los niveles de polen medidos mediante la técnica de microscopio óptico frente a la citometría de flujo y además usan esta última técnica para analizar la carga alérgica usando el anticuerpo policlonal de conejo Cup a 1. Identifican que además del polen existen en la atmósfera partículas incompletas más pequeñas, con presencia de Cup a 1, que podrían inducir la sensibilización alérgica y que pueden ser responsables de los síntomas en pacientes alérgicos a cupresáceas. La presencia de partículas submicrónicas en el ambiente y su asociación con un aumento de los casos de asma también ha sido informada por otros autores (D'Amato G. 2001).

La carga alérgica que se encuentra en el polen de Cupressaceae muestra una mayor correlación el recuento de polen realizado por citometría de flujo. A modo de ejemplo, podemos ver una mayor la carga alérgica después de los días de lluvia, aunque no podemos ver un aumento significativo en el polen mediante su identificación por microscopía óptica como he comentado antes (Benítez FM, 2014) (Arilla, 2004).

El polen de Cupressaceae / Taxaceae es uno de los 12 pólenes aeroalérgicos más abundantes en Europa (Skjoth CA, 2013).

En España la proporción de pólenes de cupreasáceas es muy variable con respecto al total de pólenes alérgicos dependiendo de las ciudades y de diferencias interanuales, oscilando entre cifras por ejemplo del 2,46% de Santander y o el 33% de Burgos. Como se ve en la figura 1.19 existe correlación significativa entre totales anuales y día pico (Pola Pola J, 2015)

Figura 1.19 Recuentos de pólenes de Cupressaceae en 2003



En trabajos anteriores publicados por nosotros y analizando los recuentos de 2004, en Burgos se registró que las cupresáceas (39,87% del total de los pólenes anuales identificados) son el taxón que alcanza los niveles más altos en nuestra ciudad y es el que más pronto poliniza, desarrollándose está entre los meses de enero y marzo (Carretero P, 2005).

1.4.6 Polinosis de las cupresáceas

1.4.6.1 Referencias

La alergia a cupresáceas fue descrita por primera vez por Black en 1929, que demostraron el papel del polen del cedro montaña (*Juniperus ashei*) en la inducción de polinosis en Texas y los estados del sur de América del Norte a los que incluso les administro inmunoterapia (Black JH, 1929) y un poco más tarde Kahn (1931) lo describe para el *Juniperus virginiana*.

Ya específicamente la alergia la genero *Cupressus*, se describe por primera vez en Sudáfrica (Ordman, 1945) donde desde principios del siglo XX *Cupressus arizonica* era el ciprés más abundante pues se utilizaba como cortavientos, en setos ornamentales y para dar sombra; en Japón debida al polen de *Cryptomeria japonica* (Horiguchi S, 1964) y en el área Mediterránea, debida al polen de *Cupressus sempervirens* (Tas J, 1965).

Otros árboles pertenecientes a la familia Cupressaceae causan polinosis: *Callitris glaucophylla* en Australia (Bass D, 1991), *Thuja* en el norte de Francia (Guerin B, 1996) y *Calocedrus decurrens* en Italia (Cavagni G, 2003). El polen de *Taxodium distichum*, una especie del género *Taxodium*, de la familia Taxodiaceae, es causa de polinosis en Florida, Estados Unidos (Bucholtz GA, 1985).

1.4.6.2 Prevalencia de la polinosis por cupresáceas

La polinosis por cupresáceas previamente se había subestimado por su confusión con infecciones víricas respiratorias y/o procesos intrínsecos.

Estudios transversales repetidos realizados a diferentes intervalos de tiempo han demostrado un aumento de tres veces en el porcentaje de esta polinosis. De particular importancia tiene en los países mediterráneos tales como España, Francia, Italia e Israel; las especies de *Cupressus*: *C. sempervirens* y *C arizonica*. (Ariano, 1988) (Bousquet J, 1993) (Caballero T, 1996) (Subiza J, Jerez M, 1995) (Mari A, 997) (Charpin D, 2000) (Sakashita M, 2010)

Según Alergológica 2005, el porcentaje de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica por pólenes por causa de cupresáceas (*Cupressus* en las tablas) en España es de 9.2% pasando al 22.8% en Alergológica 2015 con la premisa que estaba ausente en alergológica 1992 (Figura 1.20). Desglosado por comunidades autónomas (Figura 1.21), en Castilla-León el 41,5 % de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica por pólenes estaba sensibilizados a *Cupressus* (6,3 % en Alergológica 2005) convirtiéndose en la segunda con mayor porcentaje de sensibilizados a *Cupressus* tras Aragón (45,5 %). En nuestra comunidad es la segunda causa de sensibilización a pólenes tras las gramíneas.

Figura 1.20 Pólenes relevantes en los pacientes con rinoconjuntivitis alérgica en Alergológica 2015, Alergológica 2005 y Alergológica 92

Pólenes	Alergológica 2015	Alergológica 2005	Alergológica 1992
Gramíneas	73,7	34,8	44,0
Olea europæ	52,1	29,7	27,0
Chenopodium album	8,5	9,5	6,4
Especies de Cupressus	22,8	9,2	-
Platanus acerifolia	14,2	7,7	-
Plantago lanceolata	11,3	7,2	-
Salsola kali	13,1	7,2	-
Artemisia	5,8	6,8	8,0
Parietaria judaica	9,5	6,8	10,0
Betula	1,6	0,7	-
Arbustos	-	-	2,3
Otros	3,7	2,9	7,0

Figura 1.21 Porcentajes de pacientes con rinoconjuntivitis sensibilizados a los pólenes más frecuentes según comunidades autónomas en Alergológica 2015 y 2005

Comunidad autónoma de residencia	Gramíneas		Olea europeae		Platanus acerofila		Especies Cupressus		Chenopodium album	
	2015	2005	2015	2005	2015	2005	2015	2005	2015	2005
Andalucía	70,4 %	39,1 %	79,2 %	48,3 %	8,8 %	6,8 %	14,4 %	6,8 %	8,0 %	15,0 %
Aragón	81,8 %	46,3 %	59,1 %	43,3 %	22,7 %	22,4 %	45,5 %	22,4 %	9,1 %	20,9 %
Asturias	100,0 %	31,3 %	16,7 %	1,3 %	16,7 %	0 %	0,0 %	0 %	0,0 %	0 %
Baleares	65,2 %	25,0 %	87,0 %	36,1 %	8,7 %	2,8 %	8,7 %	4,2 %	0,0 %	1,4 %
Canarias	40,0 %	8,1 %	80,0 %	1,5 %	0,0 %	0 %	0,0 %	0 %	0,0 %	3,0 %
Cantabria	92,3 %	19,0 %	7,7 %	4,8 %	23,1 %	2,4 %	38,5 %	0 %	0,0 %	0 %
Castilla y León	86,2 %	53,9 %	27,7 %	14,1 %	10,8 %	2,3 %	41,5 %	6,3 %	4,6 %	8,6 %
Castilla-La Mancha	86,7 %	55,6 %	69,4 %	55,6 %	8,2 %	10,2 %	17,3 %	11,1 %	3,1 %	18,5 %
Cataluña	51,6 %	20,0 %	35,5 %	17,4 %	38,7 %	7,6 %	22,6 %	5,7 %	6,5 %	4,5 %
Ceuta	100,0 %	0 %	100,0 %	0 %	0,0 %	0 %	0,0 %	0 %	0,0 %	0 %
Extremadura	98,1 %	59,0 %	72,2 %	52,6 %	25,9 %	15,4 %	7,4 %	7,7 %	16,7 %	12,8 %
Galicia	100,0 %	31,1 %	0,0 %	2,4 %	0,0 %	3,6 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	4,2 %
Madrid	87,1 %	61,9 %	58,9 %	45,6 %	23,9 %	22,1 %	40,5 %	34,4 %	9,2 %	11,2 %
Melilla		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %
Murcia	49,0 %	26,7 %	86,3 %	53,3 %	13,7 %	6,7 %	19,6 %	14,3 %	29,4 %	31,4 %
Navarra	77,8 %	43,8 %	50,0 %	12,5 %	0,0 %	3,1 %	27,8 %	6,3 %	5,6 %	0 %
País Vasco	95,7 %	23,2 %	17,4 %	0,8 %	0,0 %	0,8 %	8,7 %	0 %	0,0 %	0 %
Rioja	100,0 %	52,6 %	38,9 %	21,1 %	27,8 %	10,5 %	5,6 %	10,5 %	0,0 %	5,3 %
Valencia	47,5 %	21,8 %	73,8 %	31,0 %	8,8 %	3,0 %	25,0 %	7,3 %	21,3 %	8,3 %

En relación al asma también aparece un incremento en España desde los dos estudios en relación a pacientes asmáticos sensibilizados a polen de cupresáceas que pasa del 7,55% en Alergológica 2005 al 12,6% en Alergológica 2015. Ocurre algo similar a las rinoconjuntivitis en relación con asmáticos sensibilizados a cupresáceas en Castilla-León en que el porcentaje en Alergológica 2015 es de un 24 % (Tercera comunidad autónoma en orden de frecuencia por detrás de Aragón 36 % y Madrid un poco más, 26%). En Alergológica 2005 era de un 4,7%. Es evidente el aumento de la frecuencia de la sensibilización a estos pólenes y la relevancia que tiene en nuestra comunidad.

En 2003, el Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC) realizó un estudio multicéntrico en 13 ciudades españolas para valorar la prevalencia de sensibilización a los pólenes más relevantes en España. Entre las cupresáceas se testaron *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens* y *Juniperus oxycedrus*. La mayor prevalencia para *Cupressus arizonica* se produjo en Madrid (55,91%) y las menores en La Coruña (1,28%) y Bilbao (2,27%). Otras ciudades con alta prevalencia de sensibilización a *Cupressus arizonica* fueron: Burgos (19,18%), Toledo (20%), Zaragoza (21,62%) y Barcelona (21,88%). Las ciudades que

presentaban una mayor prevalencia de sensibilización a cupresáceas eran precisamente aquellas que tenían una mayor concentración de estos tipos de pólenes (Moral de Gregorio A, 2003).

En otros países mediterráneos, la prevalencia de sensibilización a las *Cupressaceae* en los polínicos es similar; así en Montpellier (Francia) de 18,5%, Roma (Italia) de 35,1%, Tel-Aviv (Israel) de 32%. (Bousquet J, 1993), (Ramírez DA. 2000), (Geller-Bernstein C, 2000) En Japón, la prevalencia a *Cryptomeria japonica* es de un 36.7%. (Sakashita M, 2010)

Las hipótesis que se manejan para explicar el aumento de frecuencia a esta alergia son:

1. Aumento de la exposición a especies de cupresáceas debido a un aumento de su uso como planta ornamental en parques y jardines, en especial de *Cupressus arizonica* (Raddi P, 2000) y en Japón reforestación con *Cryptomeria japonica* después de la Segunda Guerra Mundial (Tanihara S, 1999).
2. Interacción con contaminantes atmosféricos (partículas diésel) generados por la industrialización y la urbanización que aumenta la expresión de alérgenos de estas plantas (Muranaka M, 1986). Árboles de la misma especie en diferentes localizaciones (por ejemplo, cerca de autopistas o en áreas rurales) y en diferentes años, pueden expresar niveles de proteínas de defensa variables (Cup a 3), que modifican la potencia alergénica de los pólenes (Cortegano I, 2004))
3. Mejoría en la eficacia en los extractos para el diagnóstico (Mari A, 1996).
4. El cambio climático (Shea KM, 2008).
5. Presencia de partículas submicrónicas (orbículos, 300-600 μm) que se desprenden del polen de ciprés en condiciones ambientales de humedad relativa baja y temperatura media que pueden persistir durante y después del período de polinización (Shahali Y, 2010).
6. La elevada reactividad cruzada entre los pólenes de la familia Cupressaceae y también con los pólenes de la familia Taxodiaceae.

Los factores de riesgo incluyen una predisposición genética, una alta exposición al polen y los contaminantes del aire (Honda K, 2013) (Charpin, D 2013).

1.4.6.3 Características de la polinosis por cupresáceas

La exposición al ciprés es un factor de riesgo para el desarrollo de asma alérgico. La incidencia de conjuntivitis en los pacientes alérgicos a ciprés es muy alta (73.7%-88.5% según series) pudiendo ser severa en algunos pacientes (Charpin D, 2013) (Mari A, 1997).

1.4.6.3.1 Alergenicidad del polen de cupresáceas

Las cupresáceas tiene la capacidad de liberar a la atmósfera partículas submicrónicas de alérgenos que se originan a partir de los sacos de polen de ciprés llamado orbículos.

Estas partículas se encuentran en todo el tapetum (la capa nutritiva que compone la pared interna de la bolsa de polen) y están en estrecho contacto con los granos de polen.

Cuando el polen se hidrata y se rompe los orbículos quedan libres formando esas partículas submicrónicas junto con el contenido intracelular con numerosos gránulos de almidón que se suelta a la atmosfera portando los alérgenos (Vinckier S, 2001).

C. japonica fue el primer polen de ciprés estudiado en el nivel de contenido de alérgenos, y en 1983, se informó que Cry j 1 (anteriormente llamado SBP, por Sugi Basic Protein) era su alérgeno principal (Yasueda H, 1983).

El alérgeno principal de *C. japonica*, Cry j 1, se ha localizado en la exina, la intina, la pared celular, el aparato de Golgi y los orbículos del polen joven y maduro de *C. japonica* (Miki-Hirosige H, 1994) y en el citoplasma del polen de *C.arizonica* y *C. sempervirens* (Suárez-Cervera, M 2003). Estos orbículos contienen alérgenos del grupo 1 de cupresaceas y se liberan en la atmósfera, tanto libres como débilmente asociados a los granos de polen. Constituyen un vehículo importante de los alérgenos de cupresaceas, ya que fácilmente pueden interaccionar con las mucosas de los pacientes (Suarez-Cervera M, 2003) (Wang Q, 2012) (Canini A, 2004).

Los alérgenos del grupo 2 también se encontraron en subpartículas intracitoplásmicas de *C. japonica* (Nakamura S, 2004). Se ha demostrado que Cry j 1 y Cry j 2 son liberados por partículas finas derivadas de polen de menos de 1,1 μm (partículas submicrónicas) (Gong X, 2017).

Estas partículas submicrónicas son mucho más numerosas que los granos de polen, lo que implicaría una multiplicación importante del número de partículas alérgicas emitidas a la atmósfera por cada grano de polen de cupresáceas con capacidad de penetrar en las vías respiratorias inferiores. Debido a su pequeño tamaño (300 a 600

nm), estas subpartículas de polen podrían penetrar más profundamente en el tracto bronquial y sensibilizar a los individuos. Suárez-Cervera M y col. encontraron que durante la hidratación del polen, la proteína Cry j 1 migró rápidamente a la vacuola a través del intina. Este mecanismo de hidratación del polen y la posterior liberación de diferentes micropartículas se ha observado en *C. arizonica*, *C. sempervirens* y *J. communis*, y podría considerarse específico de algunas coníferas. Todavía no se dispone de datos sobre la existencia de dicho mecanismo sensibilizador de subpartículas in situ, es decir, en condiciones reales, porque nunca se han medido orbículos atmosféricos libres (Suárez Cervera M, Vega-Maray A, 2008) (Suarez-Cervera M, 2003) (Grant Smith E. Volumen I y II, 1984)

Por el tamaño (> 5 micras), el polen de cupresáceas no puede alcanzar el árbol bronquial y se deposita en la conjuntiva y en la mucosa nasal por lo que polinosis por el polen de cupresáceas tiende a causar más rinoconjuntivitis y rinitis que asma. Las condiciones húmedas del tracto respiratorio conducen a la hidratación del polen y a la rotura de la exina debido al hinchamiento de la intina, similar a lo observado en los granos de polen cuando se hidratan in vitro. Hay una liberación como hemos comentado antes de partículas submicrónicas de pequeño tamaño, portadoras de alérgenos, que penetran en las vías respiratorias inferiores provocando asma en polínicos (D'Amato G, 1981). Además, las observaciones en microscopio electrónico de transmisión del polen de *C. arizonica* revelaron que epítomos específicos (glúcidos o proteicos) se localizaban en el polen de las muestras fijas, pero no en las muestras hidratadas (Canini A, 2004).

Las partículas submicrónicas, debido a su pequeño tamaño, pueden estar en suspensión en la atmósfera antes del inicio y después del final de la polinización, prolongando los síntomas respiratorios de los pacientes alérgicos (Fernandez-Caldas E, 1989). Además, pueden unirse a aerosoles de la contaminación, como las partículas de carbono diésel, durante los períodos de humedad relativa alta, o después de la lluvia, hecho que facilita la transmisión de los alérgenos del polen (Behrendt H, 1992) o hacerlo más alergénico (Cortegano I 2004). Debido a su pequeño tamaño, es difícil de estimar su concentración y persistencia durante y después del periodo de polinización. (Lacovacci P, 1998) (Fein BT, 1962) (Mandrioli P, 2000) (Shahali Y, 2009.) (Moral de Gregorio A, 2016). Existen además otros factores coadyuvantes en la respuesta inmunología al polen de cupresáceas (Kamijo S, 2009).

1.4.6.3.2 Aspectos clínicos

La forma de presentación clínica más frecuente en estos pacientes es la rinitis invernall recurrente, lo que habitualmente hace que la alergia a cupresáceas sea claramente infradiagnosticada y confundida con infecciones respiratorias (Mari A, 1997).

Dependiendo de los trabajos las características clínicas son variables.

Según Ramirez y col, los pacientes sensibilizados sólo a cupresáceas (en su caso *Juniperus sabinoides*) tienen una incidencia de conjuntivitis y de rinitis superior al 70%, mientras que el asma aparece en menos del 20% y suele ser más leve que en los pacientes alérgicos a gramíneas (Ramirez DA, 1984).

Bousquet y col, refieren en un principio que los pacientes alérgicos a cupresáceas presentan características clínicas diferentes a otras polinosis, siendo más frecuentes las monosensibilizaciones que con otros pólenes (23-33%). También que tienen una elevada incidencia de rinoconjuntivitis (>70%) siendo muy intensa y baja incidencia de asma en comparación con otros pólenes. La edad de aparición es tardía, como media más de 10 años más tarde que el resto de las polinosis. Los niveles de IgE sérica total en pacientes monosensibilizados a Cupressaceae son similares a los controles sanos y la IgE específica suele detectarse en pequeñas cantidades, aunque es mayor en los polisensibilizados (Bousquet, 1993).

Según una encuesta japonesa (Okuda M, 2003), y un estudio posterior de Europa (Boutin-Forzano S, 2005), la rinitis es más común que la conjuntivitis. La conjuntivitis es, sin embargo, el síntoma más incapacitante, que ocurre en el 72% de los pacientes alérgicos a cupresáceas frente al 26% de los pacientes alérgicos a gramíneas. Además, en base a una escala analógica visual utilizada por 4025 pacientes que visitaban a su médico de cabecera para tratar la rinitis alérgica, la polinosis por cupresáceas fue más incapacitante que otras polinosis. En este estudio, los síntomas de asma durante la temporada de polen fueron igualmente frecuentes en pacientes alérgicos a gramíneas y cupresáceas, aunque la aparición de tos crónica fue mucho más frecuente en esta última (Truong van ut C, 2012).

En una serie de casos de Montpellier, el 18% de los pacientes alérgicos cupresáceas informaron de síntomas asmáticos. En este estudio el 7,7% de los pacientes refirieron síntomas cutáneos (Caimmi D, 2012).

Sposato y col. informa en otras áreas del Mediterráneo, en Italia, que el 29% de los pacientes tenían asma (Sposato, 2013).

Un estudio español sugiere que los síntomas de asma aparecen con más frecuencia cuando asocia sensibilizaciones a epitelios u otro polen (Galan I, 2010).

Dominguez-Ortega y col. en un estudio realizado en Madrid en pacientes alérgicos polen de coníferas que el 47.7% experimentaron síntomas de asma durante el período de polinización de *C. arizonica*. La mayoría de los pacientes estaban polisensibilizados (88%) y los síntomas podrían ser producidos por alérgenos adicionales (Dominguez-Ortega J, 2016).

Los niveles diarios de concentración de polen requeridos para provocar síntomas alérgicos en pacientes son muy difíciles de establecer, ya que varían de persona a persona y con las condiciones ambientales. No se ha llegado a un acuerdo general sobre cómo definirlos, lo que dificulta la comparación. Por ejemplo, actualmente en Israel, se considera que los síntomas comienzan entre 10 y 50 granos de polen/m³. En Francia, se han establecido diferentes umbrales de riesgo de síntomas para el área mediterránea (designado como bajo: 7-13 granos de polen/m³, moderado: 14-141 granos de polen/m³, y alto > 141 granos de polen/m³, respectivamente), y para el norte y el centro de Francia (designado como bajo: 70-141 granos de polen/m³ y moderado cuando > 141 granos de polen/m³) (DeWeger LA, 2013).

Según Belmonte (2001), en concentraciones diarias inferiores a 20 granos de polen/m³ no se espera que produzcan síntomas alérgicos; 20-100 granos de polen/m³ podrían ocasionar problemas en pacientes muy sensibilizados. Por encima de los 100 granos de polen/m³, el polen ocasiona claramente una respuesta alérgica. En las localidades donde abunda el polen de cupresáceas pueden superarse los 100 granos de polen/m³ entre 15 y 45 días, dependiendo de los años.

También se sabe que el riesgo de alergia se ve alterado por la exposición a contaminantes del aire exterior.

En Madrid se ha observado que la exposición natural a pólenes de cupresáceas en pacientes sensibilizados induce síntomas inmediatos de rinoconjuntivitis, que se hacen más intensos durante los dos días siguientes a la exposición, hecho contrario al que se ve con otros pólenes como las gramíneas o el *Platanus* (Subiza J, Jerez M, 1998).

Shahali Y y col. (2013) demuestran que no hay cambios en la potencia alérgica in vitro de los granos de polen de *C. sempervirens* dejados durante 10 meses en un ambiente interior en comparación con granos de polen recogidos en fresco. Por lo tanto,

estos granos de polen almacenados en casa podrían potencialmente desencadenar los mismos síntomas alérgicos que los frescos cuando están en contacto con la mucosa del paciente y ser causa de unos síntomas persistentes en el interior de edificios incluso enlazando dos polinizaciones.

Se ha descrito una bronquitis eosinofila estacional por polen de cupresáceas (Bobolea I, 2011).

1.4.6.3.3 Historia natural

Ejemplos de la relevancia de la exposición al polen de cupresáceas son una encuesta japonesa que encontró grandes diferencias en la prevalencia de la alergia a *C japonica* en diferentes áreas geográficas (Okuda M, 2003), así como en las encuestas realizadas en el sureste de Francia (Charpin D, 1993) (Charpin D, 2000). Dominguez-Ortega y col. (2016) tiene datos de prevalencias de sensibilización diferentes a estudios previos en Madrid, que se pueden explicar por la variabilidad de la exposición al polen en una misma gran ciudad.

En Japón, una encuesta reciente subraya la importancia de exposición temprana al polen para sensibilización y polinosis severa (Konishi S, 2014)

En Granada el estudio clínico realizado con pacientes atópicos mostró que un 30% de la población con polinosis es sensible al polen de *Cupressaceae*, afectando a ambos sexos por igual. Solo un 12.5% estaba monosensibilización al polen de ciprés. Por otra parte, el grupo de edad más sensible fue el de 21 a 40 años, mientras que los niños y los ancianos registraron valores casi insignificantes (Díaz de la Guardia C, 2006). También Guerra y col. (Guerra F, 1996) encontraron que estos pacientes tenían una media de edad de 25 años.

Ramírez estudió a 234 pacientes alérgicos a *Juniperus ashei* en San Antonio, Tejas, y encontró que el 34% (80 pacientes) eran monosensibles. Comparó a los pacientes monosensibilizados a polen de *Juniperus ashei* con 154 pacientes sensibilizados además a otros pólenes. Mostró que esta monosensibilización se asoció con un inicio tardío de síntomas alérgicos alrededor de los 40 años, sin antecedentes familiares de enfermedades atópicas, un nivel bajo de IgE total y con un lugar de nacimiento fuera del área. (Ramírez DA, 1984).

Bousquet y col. investigaron estos mismos factores en un grupo de 26 pacientes que fueron monosensibilizados a polen de ciprés, en comparación con 63 pacientes que fueron polisensibilizados. Descubrieron que los pacientes con monosensibilidad eran

mayores en el momento de aparición de los síntomas alérgicos y que tenían un nivel de IgE total más bajo (Bousquet J, 1993). La comparación de un grupo de pacientes alérgicos a cupresáceas y un grupo de pacientes alérgicos a gramíneas llevó a la conclusión de que ambos sexos son igualmente susceptibles a la alergia a cupresáceas, donde la enfermedad es igual a la de los pacientes alérgicos al polen de gramíneas (Boutin-Forzano S, 2005). En ambos estudios se determina que la aparición de los síntomas en pacientes alérgicos a cupresáceas se produjo a una edad avanzada.

Posteriormente Charpin y col. informaron de unos datos similares, en el que la alergia al polen de ciprés aparece más temprano en sujetos polisensibilizados que en monosensibilizados. La edad de aparición es más tardía que en la alergia a gramíneas. El 17% de los pacientes era monosensible a cupresáceas. (Charpin D, 2013).

El estudio de la historia natural de la alergia ciprés permite la identificación de un subgrupo de pacientes que no tienen antecedentes personales o familiares de atopia, cuya enfermedad se inició más tarde en la vida, con una baja frecuencia de IgE total y monosensibilización al polen de ciprés. Se podría inferir que, si bien algunos pacientes no eran inherentemente propensos a sensibilizarse (no atópicos), la sensibilización se produjo debido a la exposición intensa y sostenida al polen de ciprés. Esto es bastante similar a las alergias ocupacionales a agentes de bajo peso molecular. Esta observación también significa que esencialmente toda la población está en riesgo de desarrollar una polinosis por cupresáceas, en caso de que se expongan a cantidades masivas y sostenidas (Boutin-Forzano S, 2005) (Charpin D, 2013).

Recientemente en Barcelona, María José Castillo Marchuet en su tesis doctoral informa que los pacientes sensibilizados a polen de ciprés del estudio se caracterizaron por ser mayoritariamente asintomáticos, presentar una elevada frecuencia de polisensibilización, una predominancia del género masculino en la población pediátrica y un tiempo de exposición al polen de *Cupressaceae* prolongado para desarrollar la sensibilización. El perfil de sensibilización a alérgenos individuales reveló que los pacientes estaban mayoritariamente sensibilizados a Cup a 1 y Cry j 1 y que la polisensibilización era principalmente a expensas de sensibilización genuina a otras fuentes polínicas. La sensibilización a profilinas y polcalcinas fue baja.

La polinosis de cupresáceas en Japón se caracteriza porque la mayoría de los pacientes alérgicos a *C japonica* (70%) estén sensibilizados también al ciprés japonés *Chamaecyparis obtusa*, lo que provoca que los síntomas alérgicos continúen en la estación polínica de *Chamaecyparis obtusa* (abril) cuando ya ha finalizado la polinización de *Cryptomeria japonica* (marzo) (Okamoto Y, 2009).

1.4.6. 3. 4 Diagnostico

El diagnóstico se basa por primera vez en la historia clínica, que suele ser altamente sugestiva porque la mayoría de los cipreses polinizan en invierno cuando no hay otros pólenes en el aire. Las pruebas cutáneas, que utilizan extractos de *C. sempervirens* y *C. arizonica* o extractos de *Juniperus* (*J. ashei*, *J. oxycedrus*) complementan el diagnóstico. Como en otras polinosis, nos podemos apoyar en la determinación de la IgE específica a extractos completos o componentes moleculares como Cup a 1 o Cry j 1.

La obtención de extractos estandarizados para cupresáceas ha planteado problemas debido al escaso contenido proteico (menos del 3%) y a la elevada cantidad de hidratos de carbono (50-90%) (Suvunrunsi R, 1982.) Además, los pólenes utilizados deben haberse recogido recientemente. La dificultad para encontrar sueros con IgE específica a títulos elevados dificulta la realización de estudios de RAST de inhibición (Mari A, 1996). Hay que añadir que la pared celular de las cupresáceas es muy resistente y se debe romper con congelación intensa seguida de descongelación (Aceituno E, 2000). (Moral de Gregorio A. 2003).

Barberini S y col. demostraron una mayor actividad alérgica de los extractos de polen de *C. arizonica* en comparación con los de *C. macrocarpa* y *C. sempervirens*. Esto era debido al mayor contenido proteico encontrado en el extracto de granos de *C. arizonica*. En las observaciones citoquímicas revelaron un mayor contenido de β -glucanos y proteínas en la intina de este polen durante la hidratación (Barberini S, 2015).

M J Castillo Marchuet en su tesis doctoral informa que las pápulas inducidas por extracto de polen de *C. sempervirens* son inferiores a las inducidas por *C. arizonica* y *J. ashei* y, en adultos, el extracto de *C. arizonica* induce pápulas mayores que *J. ashei*. La sensibilidad y especificidad de las concentraciones de IgE específicas a los diferentes extractos probados y alérgenos moleculares era inferior al 70% en la población estudiada. En su trabajo la prueba de provocación nasal específica con polen de *J. ashei*

tiene una elevada sensibilidad, pero una muy baja especificidad excepto para la concentración de 1 IR en la población estudiada.

En un estudio realizado en Toledo en 42 pacientes alérgicos a pólenes de Cupresáceas se realizaron prick test con extractos comerciales de varios pólenes. El diámetro medio de las pápulas del prick test de *J. oxycedrus* era de 8,43 mm que fue marcadamente superior a los del género *Cupressus* (*C.s arizonica*, 7,04-6,71 mm y *C. sempervirens* 5,92-5,48 mm) y a los de *Thuja occidentalis* (4,47 mm); mientras que para *Taxus baccata* (*Taxaceae*) sólo aparecieron micropápulas. En estos pacientes el estudio *in vivo* de la IgE específica a diferentes cupresáceas por CAP Pharmacia se obtuvieron un valor medio del extracto total de *C. sempervirens* de 3,61 KU/l. (Moral de Gregorio A. 2003).

Dominguez-Ortega y col. (2016) en su estudio obtienen que todos los pacientes con resultados positivo para sIgE de *C. arizonica* también fueron positivos para Cup a 1. Los valores de IgE para Cup a 1 fueron significativamente más altos que para el extracto completo.

Además, cuatro pacientes positivos a Cup a 1 tuvieron títulos negativos para el extracto completo, con valores para Cup a 1 de 0.38 a 1.93 kUA / L. Esto lo explican por el hecho de que la cantidad de Cup a 1 en el extracto completo de ImmunoCAP pueda ser menor que en la determinación de IgE a Cup a 1. En este caso, los pacientes seleccionados estarían sensibilizados predominantemente a Cup a 1 y no a otros alérgenos de *C. arizonica*. Proponen que, en relación a los problemas para la obtención de extractos adecuados de cupresáceas, la determinación de Cup a 1 parece ser más precisa que la sIgE al extracto entero de *C. arizonica*.

No encontraron diferencias significativas entre los pacientes con asma y los pacientes sin asma con respecto a los niveles séricos de sIgE de *C. arizonica*, los valores de Cup a 1, el perfil de alérgenos, los tamaños de pápula en los resultados de SPT o la cosensibilización con diferentes alérgenos. Tampoco encontraron diferencias entre pacientes monosensibilizados a cupresáceas o polisensibilizados.

1.4.7 Componentes moleculares alergénicos de las Cupresáceas

El primer alérgeno que se identificó en las *Cupressaceae* tenía 40 kD y fue reconocido como el alérgeno mayor del polen de *Juniperus ashei* (Gross GN, 1978). Más tarde se identifica un alérgeno de *Cupressus sempervirens* de 43 kD, denominado Cup s 1 (Ford SA 1991). Posteriormente Di Felice y colaboradores describieron un alérgeno de 43kD, Cup a 1 como el alérgeno mayor de *Cupressus arizonica* que luego fue clonado. (Di Felice G, 1994) (Aceituno E, 2000)

Se han descrito cuatro grupos de alérgenos principales en el polen de cupresáceas, aunque aún no están recogidas todas las moléculas alergénicas para cada especie, en el banco de datos de alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (www.allergen.org). Además, hay varios alérgenos adicionales en los tres pólenes más estudiados, *C. japonica*, *C. arizonica* y *C. sempervirens*

Estos 4 grupos de se han clasificado en relación con su actividad biológica

- Grupo 1: Pectatoliasas (Cup a 1, Cup s 1, Jun a 1, Jun v 1, Jun o 1, Cry j 1, Cha o 1,)
- Grupo 2: Poligalacturonasas (Cup a 2, Cup s 2, Jun a 2, Cry j 2 y Cha o 2),
- Grupo 3: Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas (Proteínas relacionadas con la defensa, grupo 5 – PR-5): taumatinas (Cup a 3, Cup s 3, Jun a 3, Jun v 3, Cry j 3)
- Grupo 4: Proteínas de unión al calcio o polcalcinas (Cup a 4, Jun o 2, Jun v4)

De ellos se han identificado dos grupos principales de proteínas: las pectatoliasas y las poligalacturonasas (Di Felice G, 2001). En el área mediterránea, se encuentran Cup a 1 y Cup s 1, con una alta homología (95.1%) mientras que Cry 1 y Cha o 1 principalmente en Japón, compartiendo 78,6% de identidad de secuencia. Las poligalacturonasas, Cha o 2, Cry j 2 y Jun a 2 son también alérgenos principales, mostrando altos niveles de identidad de secuencia (71% -82%).

Tabla 1.5 Alérgenos de *Cupressaceae* y *Taxodiaceae* en relación con su actividad biológica, peso molecular en kDa y porcentaje de homología comparado con la secuencia de Cup a1, Jun a 2 o Cup a 3 respectivamente. Modificada de Charpin D 2013, Matricardi P 2016 y Charpin D 2017

Actividad biológica	Pectatoliasas	Poligalacturonasas	Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas	Proteínas de unión al calcio
<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1 43 kDa	Cup a 2	Cup a 3 23 kDa	Cup a 4
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cup s 1 43 kDa 96%	Cup s 2	Cup s 3 34 97%	
<i>Juniperus ashei</i>	Jun a 1 43kDa 91%	Jun a 2 43 kDa	Jun a 3 30 kDa 95%	
<i>Juniperus oxicedrus</i>	Jun o 1 43 kDa 97%			Jun o 4 29 kDa
<i>Juniperus virginiana</i>	Jun v 1 43 kDa 95%		Jun v 3 34 kDa 94 %	Jun v 4 17 kDa
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1 41-45 kDa 75%	Cry j 2 45 kDa 71%		Cry j
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Cha o 1 40.2 kDa 81%	Cha o 2 45 kDa 82%		

Otros alérgenos (Charpin D, 2017)

Cupressus arizonica:

- Cup a BP14 (14 kDa)
- β -galactosidase (46-50 kDa)
- LTP CJP8 (LTP) (14 kDa)

Cupressus sempervirens:

- Cup s BP14 (14 kDa)
- β -galactosidase (46-50 kDa)
- Profilina (Cup s 8) (14 kDa)
- Phenylcoumaran reductase (33 kDa)
- Rab-like protein (18 kDa)
- Sigma factor regulation protein (29 kDa)
- Cytochrome c 12 kDa SOD (15 kDa)
- Lactoyl glutathione lyase (32 kDa)
- Malate deshydrogenase (31 kDa)
- Triosephosphate isomerase (33 kDa)
- Glucanase (37 kDa)

- HSP104

Juniperus ashei

- Jun a BP14 (14 kDa)

Cryptomeria japonica

- Cry j BP14 (14 kDa)
- Chitinase (27 kDa)
- Isoflavone reductase (35 kDa)
- Aspartic protease (42 kDa)
- Serine protease subtilisin-like (79 kDa)

Chamaecyparis obtusa

- Cha o 3 (63 kDa)

1.4.7.1 Grupo 1: Pectatoliasas

Identificados en todas las especies de cupresáceas, estos alérgenos incluyen el número 1 en sus nombres de referencia del IUIS (p. Ej., Cry j 1, Cup s 1, Cup a 1, Jun a 1) Sus masas moleculares (MM) son de alrededor de 43 kDa.

Las pectatoliasas o pectín ácido liasas son enzimas liasas que rompe las moléculas de pectina. Se encuentra en algunas bacterias y hongos, fundamentalmente fitopatógenos. En las plantas superiores las pectatoliasas están implicados en la maduración del fruto, mientras que en el polen pueden desempeñar un papel en la remodelación de tejidos y la extensión del tubo polínico, que es una prolongación en forma de tubo que emiten los granos de polen después de aterrizar en los estigmas de las flores y que actúa como vía de transporte de los gametos masculinos desde el grano de polen hasta el óvulo. (Payasi A, 2004) (Marin-Rodriguez MC, 2003) (Payasi A, 2003) (Wing RA, 1989) (Taniguchi Y, 1995)

Cup a 1 es el alérgeno mayor de *Cupressus arizonica* (Alisi C, 2001) (Aceituno E, 2000) y se ha descrito como alérgeno marcador de la sensibilización a polen de cupresceas en Europa (Matricardi P, 2016).

Existe una gran reactividad cruzada entre las cupresáceas debido al alto porcentaje de homología entre este grupo de alérgenos. Cup a 1 tiene un 96% de identidad con Cup s 1, un 91% con Jun a 1, un 97% con Jun o 1, un 95% con Jun v 1. Algo más baja es la homología entre Cup a 1 y Cry j 1 (75%) o Cha o 1 (81%). Cup a 1 no tiene reacción cruzada con los antígenos de pináceas (Charpin D, 2005). Cha o 1 tiene una identidad de secuencia del 80% con Cry j 1 (Suzuki M, 1996).

También son pectatoliasas algunos alérgenos de Asteráceas como Amb a 1 (Alérgeno mayor de la ambrosia) y Art v6 (Alérgeno menor de la Artemisia) con gran reactividad cruzada entre ellas, pero ausente con cupresáceas (Pichler U, 2015)

1.4.7.2 Grupo 2: Poligalacturonasas

El grupo 2 corresponde a las poligalacturonasas (PG). Las PG son enzimas involucradas en la maduración del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico y que están ampliamente distribuidas en el reino animal. Sus MM son generalmente de alrededor de 43 kDa, aunque algunos también son de 56-60 kDa.

Cry j 2 es un alérgeno principal (Sakaguchi M, 1990) al igual que Cha o 2. Cup a 2 es un marcador de sensibilización genuina a *Cupressaceae* junto con Cup a 1 (Matricardi P, 2016). Debido a que la sensibilización ocurre en más del 80% de los pacientes alérgicos a cupresáceas, puede considerarse como un alérgeno principal.

En el caso de las PG se ha observado una reactividad cruzada IgE entre los alérgenos homólogos pertenecientes a las familias de *Cupressaceae* (Cri y 2, Cha o 2, Cup a 2, Cup s 2 y Jun a 2) (Asam C, 2015).

La PG perteneciente al *Phleum* (Phl p 13) mostró también una identidad de secuencia considerable (hasta 40%) con Cri j 2, pero sin reactividad cruzada (Swoboda I, 2004).

Se encuentra una identidad de secuencia ligeramente más alta con PG de fruta (40-47%), lo que sugiere que podrían ser buenos candidatos para reactividades cruzadas que a veces se observan con frutas (melocotón, naranja, higo, etc.) y que se sospecha con el tomate (Kondo Y, 2002). Pueden interactuar en complejos moleculares con lectinas y otras proteínas, como la nsLTP (Tomassen MM, 2007). Hasta el momento, no hay datos disponibles sobre su capacidad para interactuar con los LTP de las frutas que son ampliamente consumidas en las regiones donde *Cupressaceae* es abundante.

1.4.7.3 Grupo 3: Proteínas relacionadas con la patogénesis de las plantas. Taumatinas

Son proteínas análogas a la taumatinas (TLP) que son proteínas relacionadas con la defensa del grupo 5 (PR-5). Se expresan en las plantas ante una agresión y las sirve de mecanismo de defensa (son antifungicas).

Los alérgenos del grupo 3 se consideran en la frontera entre alérgenos mayores y

menores y sensibilizan entre un 40 y un 65% de los pacientes alérgicos al polen de ciprés. Cortegano y cols. encuentran que el 63% de los alérgicos a *Cupressus arizonica* lo son a Cup a 3 (Cortegano I, 2004).

La expresión de Cup a 3 es dependiente de los niveles de polución ya que es un mecanismo de defensa ante ella. Su nivel de expresión basal es bajo y aumenta en condiciones de alta polución atmosférica. Además el polen obtenido en esas condiciones es más alergénico (Cortegano I, 2004) (Suarez-Cervera M, 2008). Jun a 3 también se expresa de forma variable en el polen según su exposición a la contaminación ambiental (Midoro-Horiuti T, 2000).

La identidad de secuencia entre los diferentes miembros de los alérgenos del grupo 3 en Cupressaceae es alta (85-95%).

Algunos alérgenos de la familia de proteínas TLP se describieron como de reactividad cruzada entre el polen y alimentos (Palacín A, 2012).

1.4.7.4 Grupo 4: Proteínas de unión al calcio

Los alérgenos del grupo 4 de Cupressaceae pertenecen a la familia de las proteínas de unión al calcio y en este caso tienen cuatro sitios de unión para el calcio (4 EF-hand) Aparece en el 9.6% de los pacientes alérgicos a *Cupressus arizonica* por lo que es un alérgeno menor (Pico de Coana Y, 2010).

La identidad entre Cup a 4 y Jun o 4 es del 90% pero aún no se conoce para Cup s 4.

También pertenecen a este grupo los alérgenos del grupo 3 y 8 de las oleáceas. El porcentaje de identidad de Cup a 4 con Ole e 8 es, sin embargo, tan bajo como de un 7%, por lo tanto, excluye la reactividad cruzada. La mayoría de las proteínas de unión al calcio en otros pólenes, como el grupo 7 de alérgenos de gramíneas, tienen solo dos sitios de unión para el calcio (Pico de Coana Y, 2010).

Se ha informado que Jun o 4 comparte epítomos con las polcalcinas de pólenes de gramíneas (Phl p 7, Cyn d 7) y betuláceas (Aln g 4, Bet v 3, Bet v 4) (Weber RW, 2001).

1.4.7.5 Otros alérgenos

- Sahajali Y y col describen en *C sempervirens* una proteína de 14 kDa, que se ha identificado en 17 a 37% alérgicos a cupresáceas. Se expresa en mayor cantidad en el polen de *C sempervirens* en comparación en el polen de *Cryptomeria japonica* y *J. ashei* o incluso menos en el polen de *C arizonica*. Se ha denominado BP-14. Contiene epítomos conformacionales resistentes al calor y al agua; y no contiene determinantes carbohidratados, por lo que no tiene reactividad cruzada con pólenes de otras especies. Se ha descrito que BP14 comparte homología de secuencia de aminoácidos con dos proteínas: peamacleina (alergeno Pru p 7 en melocotón) y una proteína regulada por giberelina (GRP) similar a la descrita en *Arabidopsis thaliana*. Ambas proteínas pertenecen a la misma familia de proteínas Snackin / GRP, que están ampliamente distribuidas entre especies vegetales y están involucradas en varios aspectos del desarrollo de la planta incluyendo maduración del polen, respuestas de plantas al estrés biótico o abiótico y otras funciones. Aunque se sospechó que BP14 era una LTP este es un dato que se ha rechazado en los últimos estudios (Shahali Y, 2014) (Charpin D, 2017) (Shahali Y, 2012)

Además de estos cuatro grupos certificados por el IUIS de alérgenos del polen de cupresáceas, se han descrito varios alérgenos adicionales en estudios realizados con el objetivo de descifrar los alérgenos del polen de ciprés, o en estudios que usan extracto de ciprés como polen de control (Fuente [http:// www.Allergome.org](http://www.Allergome.org)). Debido a que se estudiaron las reactividades en un pequeño número o en una selección de pacientes alérgicos al polen de ciprés, no está disponible su prevalencia.

- Se ha descrito en *C arizonica* un alérgeno similar a la LTP (LTP-like) de 15 kDa que no solo presentaban síntomas respiratorios con el ciprés, sino que, algunos alérgicos a *C arizonica*, también tenían alergia alimentaria a melocotón (Sánchez-López J, 2011). También se ha descrito una proteína de 35 kDa como alérgeno principal de *C arizonica* en pacientes alérgicos a este polen en Teherán (Shahali Y, 2009)
- Las β -galactosidasas en *C. arizonica* y *C. sempervirens* también se han descrito como alergénicas (Bistoni O, 2005).

- Se ha descrito de forma indirecta una profilina en *C sempervirens* (Cup s 8) (Barderas R, 2004)
- Se han identificado 10 alérgenos más en el polen de *C. sempervirens*, siete ya descritos como alérgenos en otras fuentes alérgicas, como polen, hongos, insectos, frutas, verduras, látex, mariscos y semillas: citocromo c, superóxido dismutasa (Cu-Zn), lactoilglutación liasa, fenilcoumaran reductasa, malato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa y proteína similar a la glucanasa. El análisis proteómico ha revelado cinco alérgenos putativos adicionales en el polen de *C. sempervirens*: HSP70, enolasa, metionina sintasa, proteína de la familia de las subtilasas y tioredoxina (Shahali Y, Sutra JP, Fasoli E 2012)

Para *Cryptomerya japonica* se han descrito otros alérgenos:

- Una quitinasa perteneciente a la familia de las quitinasas clase IV, de 34 kDa, responsable de la potencial reactividad cruzada con plantas con quitinasas clase I, como el látex (Fujimura T, 2005)
- Un alérgeno de la familia de las isoflavonas reductasas, con homología del 61% con el polen de abedul (Bet v 5) y del 60% con la pera (Pyr c 5) (Kawamoto S, 2002)
- CJP-8 (17 kDa), un alérgeno que estructuralmente sugiere pertenecer a la familia de las LTP con capacidad para actuar como un alérgeno con reactividad cruzada (Ibrahim AR, Kawamoto S, Nishimura M, 2010)
- Una serin proteasa con reactividad cruzada con extracto de melón (Ibrahim AR, Kawamoto S, Mizuno K, 2010)
- Una proteasa aspártica (Ibrahim AR, Kawamoto S, Aki T, 2010)

Se ha descrito una celulasa (glicosil hidrolasa) de polen de *Chamaecyparis obtusa*, enumerada bajo el nombre Cha o 3, que mostró unión a IgE en 14 de 16 sujetos japoneses alérgicos al polen de ciprés. Además, tres de cada cuatro pacientes evaluados exhibieron una prueba de activación basófila positiva, lo que demuestra un cierto grado de relevancia clínica para Cha o 3 (Harada T, 2012)

1.4.8 Reactividad cruzada del polen de cupresáceas.

1.4.8.1 Reactivida cruzada polen-polen.

De las seis familias que componen el orden Coniferales, tres familias han demostrado elevada reactividad cruzada por la alta homología de los alérgenos que comparten: *Cupressaceae*, *Taxodiaceae* y *Podocarpaceae* (Di Felice G, 2001).

Las reacciones cruzadas entre el polen son comunes porque las proteínas pueden pertenecer a familias de alérgenos de reactividad cruzada, como las proteínas de unión a Ca ++ o las profilinas. Sin embargo, las profilinas rara vez se han detectado como alérgenos en el polen de ciprés.

Schwietz (2000) estudio la reactividad cruzada in vivo e in vitro entre 12 especies de Cupressaceae, una especie Taxodiaceae (*Cryptomeria japonica*), una especie Pinaceae y una angiosperma. Encontraron una fuerte reactividad cruzada entre el alérgeno principal del cedro de montaña (*Juniperus ashei*), una glicoproteína de 40 kD, con alérgenos homólogos en los otros miembros de la familia de las Cupressaceae, así como el alérgeno principal de *Cryptomeria japonica*, sin reactividad cruzada con la Pinaceae y ni la angiosperma

Dirksen y Østerballe (1980) no encontraron correlación en los test cutáneos entre enebro y dos miembros de Pinaceae, pino y abeto. No existe reactividad cruzada entre la familia Cupressaceae y *Taxus baccata* (perteneciente al orden Taxales), ni con otras coníferas como la familia Pinaceae (*Pinus*, *Abies*, *Cedrus*, *Arix* y *Picea*) (Moral de Gregorio A, 2003) (Gastaminza G, 2009)

Ya hemos comentado antes que, aunque Amb a 1 (Alérgeno mayor de la ambrosia) y Art v6 (Alérgeno menor de la Artemisia) son pectatoliasas no tienen reactividad cruzada con las Cupressaceae (Pichler U 2015)

Esta elevada reactividad cruzada parece estar basada en:

- 1- La elevada homología de sus alérgenos principales: las pectatoliasas y la poligalacturonasas como hemos expuesto antes al describir cada alérgeno.
- 2 - El polen de Cupressaceae contiene elevadas cantidades de CCD que sería otro de los motivos de la reactividad cruzada. También se relaciona con la reactividad cruzada con

otras especies no relacionadas taxonómicamente por compartir N-glicanos similares a los presentes en la bromelina de la piña y la fosfolipasa de *Apis mellifera*, como la β 1-2xilosa, la α 1-3fucosa²⁵³ y la α 1-6fucosa. También se ha referido que la determinación de IgE a CCDs podría conducir a una reactividad in vitro engañosa en el caso de pruebas basadas en extractos o cuando se usan glicoproteínas purificadas naturales que contienen CCD, tales como nCyn d 1, nOle e 1, nCup a 1, nSal k 1, nPla a 2 o nArt v 1 (Altman F, 2007) aunque esto no se relaciona con el comportamiento de alérgenos in vivo (Malandain H, 2007).

1.4.8.1 Reactivida cruzada polen-alimentos.

Hay varias publicaciones que relacionan la alergia a cupresáceas con la alimentaria a melocotón (Caimmi D, 2013). Se ha propuesto que un alérgeno no caracterizado (putativo Cup s 1 o Cup s 2) de 45 kDa es el alérgeno de reactividad cruzada (Hugues B, 2006). En otro estudio, se ha detectado un alérgeno de 15 kDa (que podría tratarse de una LTP) en el polen de *Cupressus arizonica* en un grupo de pacientes que presentan síntomas respiratorios por ciprés y alergia al melocotónse (Sanchez-Lopez J, 2011)

Se ha descrito una correlación significativa entre la sensibilización a proteínas debajo peso molecular (14kDa) características de la sensibilización a *Cupressus semperviens* y la sensibilización a Pru p 3 en población francesa y no en población italiana (Shahali Y, 2014).

Tambien se han propuesto a alergenosen antes descritos: glucanasa, isoflavonas reductasas, LTP y poligalacturonasa como alergenosen de reactividad cruzada entre polen de cipres y alimentos

Una poligalacturonasa ha sido informada como sospechosa de ser el alérgeno de reactividad cruzada entre el tomate y *C japonica* (Kondo Y, 2002). En apoyo de la idea de que esta sea una molécula de reacción cruzada entre estas dos fuentes alérgicas, se registro que la inmunoterapia con alérgenos de *C japonica* en pacientes japoneses también sensibilizados a tomate indujo un aumento del grado de tolerancia a la ingestión de tomates (Inuo C, 2015).

Como pertenece a la familia de proteínas GRP, BP14 también podría ser un miembro de los alérgenos de reactividad cruzada de Cupressaceae, ya que se ha observado una asociación de sensibilización con BP14 con sensibilización al melocotón (Shahali Y,

2013). Se ha descrito una inhibición cruzada entre BP14 y una proteína de bajo PM de los cítricos (Martinez S, 2015). Tanto en las fuentes alergénicas de melocoton y cítricos, se ha informado que los GRP son alérgenos (Inomata N, 2014) (Inomata N, 2015) (Tuppo L, 2013). Por lo tanto, esta familia de proteínas Snakin / GRP podría agregarse a la lista de alérgenos de reactividad cruzada entre polen y alimentos. Las proteínas Snackin / GRP también se encuentran en fresas, tomates, patatas, judías, arroz, gerbera, hayucos, maíz, soja y pimiento

También se ha descrito la asociación de rinitis alérgica por polen de ciprés y alergia a cítricos (Martinez S, 2015)

Se ha informado un síndrome de alergia oral en pacientes alérgicos al cedro japonés después del consumo de verduras y frutas frescas específicas (por ejemplo, melón, manzana, melocotón y kiwi) (Ishida T, 2000)

2 HIPOTESIS

En el diagnóstico de la alergia a pólenes es muy importante la correlación entre la sintomatología presentada por el paciente (historia clínica), aerobiología de la zona donde habita el paciente y la positividad en las pruebas cutáneas e IgE específica para establecer una relación causa-efecto. Sin embargo, este diagnóstico se ve complicado por varios factores como el aumento en el número de pacientes polisensibilizados; la coincidencia en el tiempo de polinización de diferentes especies alergénicas y la variable sensibilidad y especificidad de las pruebas in vivo (pruebas cutáneas) e in vitro (IgE específica) informándonos solamente de la fuente alergénica.

Nos encontramos frecuentemente con alérgenos (polen, ácaros, alimentos...) que contiene tanto componentes alergénicos específicos como de reactividad cruzada. Los componentes alergénicos específicos son más o menos exclusivos de su fuente y solo se encuentran en un número limitado de especies muy cercanas. Cada fuente de alérgenos puede contener uno o unos pocos componentes alergénicos específicos. Los componentes alergénicos específicos de especie son los marcadores únicos de su fuente alergénica.

Una de las utilidades clínicas más importantes del diagnóstico molecular en la alergia es su capacidad para revelar los alérgenos frente a los que está sensibilizado un determinado paciente. Mediante el diagnóstico por componentes moleculares se puede identificar su perfil de sensibilización individual, es decir, que parte o molécula de esa sustancia alergénica reconoce y frente a la que posee IgE específicas cada paciente, incluidos los alérgenos específicos de especie o primarios y los marcadores de reactividad cruzada.

La polinosis por cupresáceas representa una causa emergente de morbilidad en el área Mediterránea, siendo nuestra área una de las de mayor incidencia en España, según los datos de Alergológica 2015.

Ya se ha descrito en anteriores trabajos la utilidad del diagnóstico por componentes en otros pólenes (gramíneas, olivo, parietaria). Hasta ahora se ha apuntado que los dos alérgenos principales del cedro del Japón, Cry j 1 y Cry j 2, y Cup a 1 podrían servir como marcadores de sensibilización genuina al polen de árboles de las *Cupressaceae* aunque sin embargo, todavía son pocos los estudios realizados para apoyar esta hipótesis.

Creemos que la realización del diagnóstico molecular en los pacientes alérgicos al polen de *Cupressaceae* aumentaría la precisión diagnóstica. Valoraremos la expresión del alérgeno mayor de las cupresáceas, nCup a 1, en pacientes con alergia a *Cupressaceae* y su validación como marcador de alergia específica a este tipo de polen. Esto permitiría tener un patrón de diagnóstico y en un futuro la utilización de la inmunoterapia solo con este alérgeno. Usamos nCup a 1, el alérgeno nativo, ya que es el único disponible en los medios de diagnóstico habituales.

A través de la correcta identificación de estos pacientes podremos obtener un fenotipo de ellos, podremos analizar la existencia de reactividades cruzadas y otras sensibilizaciones tanto a otros pólenes como a otros alérgenos de reactividad cruzada (Polcalcina, LTP y profilina) de los pacientes de nuestra área (medicina de precisión).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

- Valorar la aportación del diagnóstico por componentes moleculares en la precisión en el diagnóstico de la alergia al polen de cupresáceas. Valorar al alérgeno nCup a 1 como marcador de sensibilización genuina a cupresáceas.
- Valorar la correlación entre las técnicas diagnósticas convencionales en la alergia al polen de cupresáceas (pruebas cutáneas e IgE específicas séricas frente a extractos completos) y la sensibilización a nCup a 1 (alérgeno mayor)

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar el fenotipo de los pacientes alérgicos a cupresáceas en nuestra área
- Determinar el porcentaje de pacientes monosensibilizados (una única sensibilización alérgica) /polisensibilizados a otros pólenes y cuáles son.
- Evaluar la sensibilización a panalérgenos: profilina y polcalcina y LTP
- Periodo Principal de Polinización: Periodo de máxima producción del taxón *Cupressaceae/ Taxodiaceae*

3.3 OBJETIVOS EXPLORATORIOS

- Evaluar la sensibilización a Determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada (CCD) en los pacientes polisensibilizados a árboles.
- Datos aerobiológicos del taxón *Poaceae* (Gramíneas) y otros taxones de interés para el estudio en la atmósfera de Burgos en el periodo 2000-2016.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional transversal analítico con recogida prospectiva de las variables principales

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Burgos.

Para la consecución de estos objetivos, se procedió a realizar una búsqueda eficiente de la bibliografía publicada hasta la fecha del 1 de noviembre 2017 mediante filtros metodológicos (Clinical queries, SUM Search, Grade, Medline, Cochrane Library).

Para el análisis de los datos se procesan mediante el software estadístico IBM SPSS 19 con un intervalo de confianza del 95%. Previamente se ha utilizado para la recogida y tratamiento de los mismos Microsoft Office Excel 2010

4.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

El periodo de recolección de pacientes para el estudio fue entre enero 2015 y marzo de 2016.

Se incluyó de forma consecutiva a 96 pacientes de ambos sexos que acudieron a la consulta de Alergología del Hospital Universitario de Burgos con el diagnóstico de alergia al polen de cupresáceas con un periodo fijo de recolección de pacientes. Previamente a la inclusión en el estudio, los pacientes recibieron información escrita mediante la hoja de información al paciente y si estaba de acuerdo firmaban el consentimiento informado. Se aceptó la cantidad de 96 por que se acercaba al tamaño previsto de 100. Este tamaño superaba o acercaba al de estudios previos en poblaciones españolas anteriormente comentados de Cabrera-Freitag P y col. (2011) en el grupo de alérgicos a cupresáceas (12 alérgicos/92 controles), Dominguez-Ortega y col. (2015) con 64 pacientes o el general de García BE y col. (2016) sobre 100.

4.2.1. Ámbito del estudio

Todos los pacientes procederán de zonas urbanas y rurales del área sanitaria de Burgos sin límites de edad. Nuestra área de influencia comprende a una población de unos 360.000 habitantes

4.2.2. Criterios de inclusión.

Debían cumplir todos

- Tener la prueba cutánea prick-test positiva frente al extracto de *Cupressus arizonica* y/o *serpenvirens*.
- Padecer asma (disnea, tos persistente, ruidos respiratorios), rinitis (prurito nasal, hidrorrea, bloqueo nasal, salvas de estornudos) y/o conjuntivitis (Prurito ocular, lagrimeo, eritema conjuntival) o las tres patologías simultáneamente en la época de polinización de las cupresáceas, determinada por los recuentos del captador de polen.
- Ser residentes de la comunidad de Castilla-León durante al menos los 5 últimos años, en zonas urbanas o rurales.
- Firma del consentimiento informado (y/o representantes legales en menores de edad).

4.2.3. Criterios de exclusión.

- Haber seguido tratamiento con Inmunoterapia con Cupresáceas los 5 años previos a la inclusión en el estudio.
- Toma de medicación que interfiera con la respuesta cutánea al alérgeno (tabla I).
- Enfermedades activas: urticaria, eccema en el área de pruebas, infecciones y enfermedades neurológicas
- Prueba cutánea negativa con el control positivo (solución de dihidrocloruro de histamina a 10 mg/ml).
- Prueba cutánea positiva con el control negativo (suero salino fisiológico).
- Negativa a firmar el consentimiento informado o retirada del mismo

Tabla 4.1: Medicación a evitar previa a la realización de los test cutáneos (Bousquet J, 2012).

Agente terapéutico	Intervalo entre la última dosis administrada y las pruebas cutáneas
Antihistamínicos orales	2-7 días
Imipraminas	Más de 21 días
Fenotiacinas	Más de 10 días
PUVA	Más de 4 semanas
Aplicación local de una crema de corticoide en el lugar de las pruebas	Más de 7 días

4.2.4. Pérdida de pacientes.

Al realizarse todos los procedimientos y actuaciones diagnósticas en una única visita no se perdieron pacientes.

4.2.5. Procedimiento de confidencialidad

Con el objetivo de garantizar la confidencialidad de la identidad e información procedente de los pacientes incluidos en el estudio, de acuerdo con el Real Decreto 1720/2007 de 21 de diciembre por el que se aprueba el desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de datos de carácter personal, se utilizará un sistema de codificación. Cada paciente será identificado en el CRD mediante un número correlativo según el orden de incorporación al estudio.

4.2.6 Características clínicas

Se recogieron siguientes de los datos de los pacientes: datos demográficos (edad y sexo) y manifestaciones clínicas (rinitis, conjuntivitis y asma). Esta se relacionaba con la época de polinización de las cupresáceas. Se les interrogaba por los síntomas de alergia respiratoria en otras épocas. También se valoró la asociación a alergias alimentarias

4.3. PRUEBAS CUTÁNEAS (PRICK-TEST O PRUEBAS INTRAEPIDÉRMICAS)

La técnica de las pruebas cutáneas se realizó de acuerdo a las directrices de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (Dreborg S y col. 1993) (Bousquet J, 2012). Estas pruebas consisten en la colocación de gotas de

Figura 4.1 Lanceta



los diferentes extractos alérgicos sobre la piel del paciente en la cara volar de los dos antebrazos, para posteriormente puncionarlas con una lanceta específica para

tal fin (Prick-Lancet de Domme-Hollister-Stier), permitiendo así que una pequeña cantidad de estos alérgenos penetre en las capas superficiales de la piel (se estima que penetran unos $3,3 \times 10^{-6}$ ml).

Figura 4.2 Prick test



Si el paciente está sensibilizado a un determinado alérgeno se desencadenará en el lugar de aplicación una liberación de histamina de los mastocitos cutáneos, que dará lugar a una pápula y eritema con prurito. La lectura o interpretación de los resultados se realiza

Figura 4.3 Lectura prick test



a los 15 minutos. Existen varias maneras de medir este resultado. En el estudio se ha utilizado la medición del Diámetro Medio de Pápula, calculado a partir de la media obtenida del diámetro mayor y el diámetro ortogonal, es decir, el diámetro a los 90° de su punto medio. Este diámetro se correlaciona con la superficie de la pápula (Vohlonen I, 1989). Los resultados se comparan con el control negativo (glicerosalino al 50%), considerándose positiva la prueba si tiene un diámetro de pápula ≥ 3 mm que este control (Bousquet J, 2012).

Se realizaron pruebas cutáneas frente a una batería de aeroalérgenos habituales en nuestra zona (Alergológica 2005 y Carretero P, 2005) con extractos estandarizados.

Tabla 4.2 Batería de alérgenos para las pruebas cutáneas (Bial-Arístegui S.A. Bilbao, España).

Ácaros	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Lepidoglyphus destructor</i> , <i>Acaro siro</i> ,
Cucaracha	<i>Blattella sp</i>
Epitelio	perro, gato caballo y vaca,
Hongos	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> ,
Pólenes	Mezclas de pólenes de gramíneas, pólenes de malezas y árboles, <i>Platanus hispanica</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Plantago lanceolata</i> ,
Látex	<i>Hevea brasiliensis</i>

El control positivo y negativo también era del laboratorio Bial-Arístegui S.A. Bilbao, España.

Si son positivas algunas las mezclas de árboles o malezas, se realizaron baterías específicas.

Tabla 4.3 Batería accesoria de alérgenos de árboles y malezas (Immunotek, S.A. Madrid, España)

Arboles	<i>Quercus ilex</i> , <i>Pinus pinea</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> <i>Quercus robur</i> , <i>Betula verrucosa</i> , <i>Corylus avellana</i> <i>Populus alba</i>
Malezas	<i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Chenopodium álbum</i> , <i>Parietaria judaica</i> , <i>Salsola kali</i> , <i>Rumex acetosella</i> , <i>Taraxacum officinale/vulgare</i> , <i>Mercurialis annua</i>

Específicas del estudio se realizaron pruebas cutáneas con:

Tabla 4.4 Batería de alérgenos específicas del estudio

<i>Extracto</i>	<i>Laboratorio</i>
<i>Cupressus arizonica</i>	Inmunotek, S.A. Madrid, España
<i>Cupressus sempervirens</i>	Inmunotek, S.A. Madrid, España
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Inmunotek, S.A. Madrid, España
Profilina	Bial-Arístegui S.A. Bilbao, España
Polcalcina	ALK-Abelló, S.A. Madrid, España
LTP de melocotón	Inmunotek, S.A. Madrid, España

Determinamos a la polcalcina como marcador de reactividad cruzada entre pólenes, profilina como panalérgeno y LTP del melocotón como marcadores de reactividad cruzada entre pólenes y/o alimentos.

Los pacientes que referían alergia alimentaria se estudiaban según su historia clínica realizándose las pruebas cutáneas adecuadas.

4. 4. DETERMINACIONES DE LA IGE ESPECÍFICA

4.4.1. IgE específica frente a extractos totales y frente a componentes moleculares

Para las determinaciones de la IgE sérica se utilizó la técnica de ImmunoCAP Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific, Uppsala. Suecia), realizada dentro de la rutina habitual de nuestro hospital.

Brevemente, esta técnica consiste en un fluoroinmunoanálisis en sándwich. Consta de una fase sólida, una matriz de celulosa (CAP), donde se unen de forma covalente los distintos alérgenos que, tras incubación durante 30 minutos con el suero del paciente a estudio, reacciona y se une a sus moléculas de IgE específicas para ese alérgeno. Después de un lavado para eliminar la IgE no específica se añade anti-IgE marcada enzimáticamente que, tras una nueva incubación de 2 horas y 30 minutos, queda unida a la IgE del paciente fijada a la fase sólida. Tras un nuevo lavado se añaden 50 µl de solución de desarrollo fluorescente incubándose durante 10 minutos tras los

cuales se detiene la reacción y se mide la fluorescencia del eluído, determinándose los niveles de IgE mediante comparación con los valores de una curva estándar construida a partir del estándar de la OMS para IgE total. Se consideró la IgE positiva si tenía un valor ≥ 0.35 kUA/L (Lindqvist A, 1995)

Se cuantificó:

1. Cuantificación de IgE frente a extracto de *Cupressus arizonica*
2. Cuantificación de componentes moleculares:
 - 2.1. Cup a 1
 - 2.2. Gramíneas: Phl p1, Phl p 5, Phl p7 (polcalcina), Phl p 12 (profilina)
 - 2.3. Pru p 3 (LTP de melocotón)

Utilizamos Phl p1 y Phl p5, ya que la determinación de ambos se considera marcadores de sensibilización a polen de gramíneas (Casquete-Román E, 2009) (Popescu FD, 2014) (Pablos I, 2016). Phl p7 (polcalcina) (Tinghino R, 2002), Phl p 12 (profilina) y Pru p3 (LTP) al igual que en las pruebas cutáneas como marcadores de reactividad cruzada.

Las muestras tenían el mismo sistema de codificación que el empleado en el CRD, por lo que se garantizó la confidencialidad y anonimato de la información procedente de cada paciente. El médico responsable del estudio es el único conocedor de dicha codificación.

4. 5 DATOS AEROBIOLÓGICOS

4.5.1 Técnica de recolección

Los recuentos de pólenes se realizaron con colector volumétrico siguiendo la metodología estandarizada recomendada por el Comité de Aerobiología de la SEAIC (Subiza E, 1986) (Subiza J, Jerez M, 1995). Se recolectaron durante las 24 horas del día mediante el sistema captador volumétrico “Burkard seven day recording volumetric sporetrap” ® (Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Herst., UK) instalado en la terraza-tejado del centro de especialidades del hospital General Yagüe, a una altura de unos 15 metros sobre el nivel de la calle, localizado en el centro de la ciudad y expuesto a los vientos sin obstáculos. (42°21'06.3"N 3°41'39.7"W, 863 m de altitud) y

posteriormente en el Hospital Universitario de Burgos (42°21'44.8"N 3°41'03.0"W, 881 metros de altitud) separados por una distancia de 1.4 Km. El área que rodea a los captadores está urbanizada, junto a unas colinas pequeñas.

Figura 4.4 Burkard Hospital general Yagiüe



Figura 4.5 Burkard Hospital Universitario de Burgos



Se han utilizado métodos volumétricos de captación dado que son los únicos que nos permiten relacionar cantidad de polen captado con volumen de aire aspirado (Hirst JM, 1952). El captador básicamente consta de una cámara de admisión, que aspira un volumen de aire de 10 litros por minuto a través de una pequeña hendidura de 14 mm de largo por 2 mm de ancho, permanentemente orientada en la dirección del viento, gracias a la acción de una veleta incorporada en el colector.

Las partículas contenidas en el aire succionado impactan en una película transparente de plástico (cinta Melinex®), que se monta sobre un tambor y se recubre de una capa fina y uniforme de vaselina filante. Un mecanismo de relojería incorporado en el propio tambor, hace que éste rote a una velocidad de 2 mm a la hora durante un período de hasta 7 días. Para garantizar su buen funcionamiento, al mismo tiempo que se recogen las muestras del captador y para asegurar un constante flujo del equipo se comprueba todas las semanas el funcionamiento de la bomba y se revisan las diferentes partes del equipo cuando se realiza el cambio de la cinta: medida del caudal de entrada y salida con un rotámetro (caudalímetro) y se anota cualquier incidencia en la hoja de registro de muestreo y mantenimiento del orificio de entrada de aire. Cada semana, excepto en los meses de mayo y junio cuando se hace diariamente se recogen las cintas. Esta se

desmonta y se corta en segmentos de 48 mm de longitud, cada uno de los cuales corresponde a un día de muestreo.

Cada uno de estos segmentos es

adherido sobre un portaobjetos mediante unas gotas de glicero-gelatina a una temperatura de 50-60 °. A continuación, se utilizan unas gotas de glicero-gelatina teñida con fuchina para teñir los pólenes con la que también se fija sobre la cinta de plástico un cubreobjetos, lo suficientemente ancho que abarque toda el área de impacto. Una vez puesto el cubre objetos, éste se presiona uniformemente para eliminar las burbujas de aire y se marca la preparación con la fecha a la que corresponde el muestreo. Finalmente, los bordes de la preparación los sellamos con adhesivo. Con el fin de estudiar los pólenes impactados en 24 horas y de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Internacional de Aerobiología y de Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (Subiza J, Jerez M, 95) se hace 4 barridos de 48 mm, con el objetivo x40 (apertura numérica=0,65), y el factor de conversión de 0.55 se multiplica por la suma de cuatro bandas longitudinales (representando aproximadamente un 12% del área impactada) (Subiza J, 1998) .

Figura 4.6 Captador Burkard y material de identificación de polen

Subiza J, Jerez M Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín, Abril 1998 Vol. 13, Núm. 2,

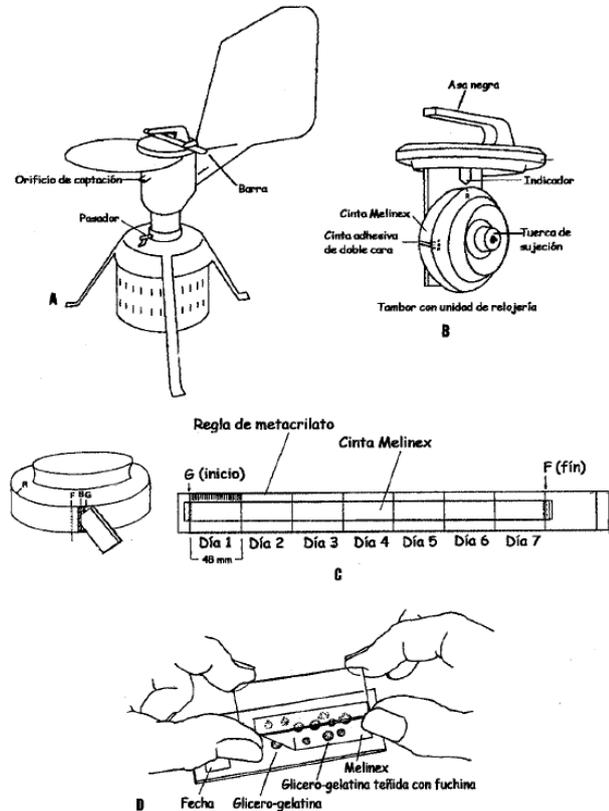
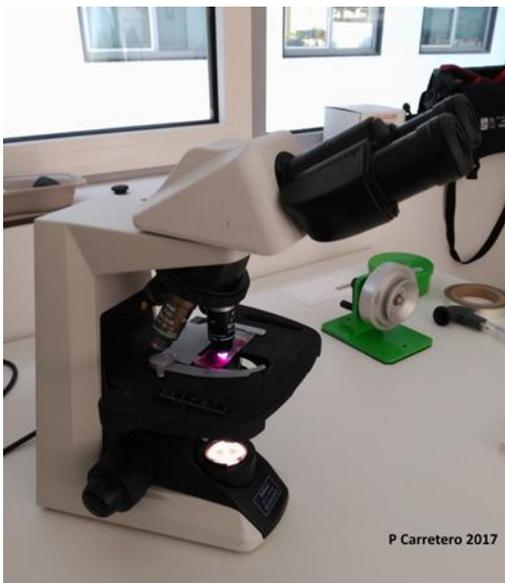


Figura 4.7 Nuestro material para la identificación de polen



Figura 4.8 Microscopio para la identificación de pólenes



La identificación de los pólenes la realizamos mediante comparación con la descripción y fotografías de referencia que aparecen en el Hyde y Adams. Los caracteres morfológicos polínicos fundamentales que permiten su identificación y diferenciación microscópica son: simetría y polaridad, unidades, forma, aperturas, tamaños y arquitectura de la pared. (Jäger S, 1995)

4.5.2. Estación polínica: cálculo de los periodos principales de polinización

Existen diferentes condiciones y criterios para definir y limitar la estación polínica. La curva anual de polen de un taxón determinado se representa como concentraciones medias diarias. Dependiendo de ciertas condiciones o criterios en la literatura, se define a este periodo como “estación de polinización” (Nilsson S, 1981), “periodo de polinización” o “periodo principal de polinización PPP” (Frenguelli G, 2003), “estación efectiva de polen” (Giorato M, 2000) y “estación atmosférica de polen” (Jato V, 2006).

Un método común para el cálculo de la estación polínica, es usar un porcentaje dado del total anual para calcular el comienzo y el fin de la estación principal de polen. Para el cálculo de la estación polínica de *Cupressaceae/Taxaceae* hemos seleccionado el criterio más ampliamente utilizado en la literatura que es el de **PERIODO PRINCIPAL DE POLINIZACIÓN (PPP)**: Periodo de máxima producción de polen. Analizamos los recuentos de 200-2016 para definir los valores umbrales de *Cupressaceae/Taxodiaceae* y *Poaceae* en nuestra atmósfera. Además hemos incluido el taxón *Poaceae* en el estudio por ser el polen más abundante en nuestra atmósfera y por su relevancia en nuestro trabajo.

Para su cálculo, en esta memoria se ha aplicado el método de cálculo de Nilsson S & Persson S (1981) modificado por Jäger (1996), con el fin de definir mejor y de forma más ajustada los índices polínicos atmosféricos a fin de eliminar colas al inicio y final del periodo de floración que incluyen un alto número de valores nulos, ya que son origen de floraciones extemporáneas o de resuspensión de granos de polen, algo que intuíamos que nos íbamos a encontrar con las Cupresáceas.

Método de Nilsson y Persson (1981) modificado por Jäger (1996)

El PPP según el método Nilsson S & Persson S (Nilsson S, 1981): período en días que abarca desde el momento en que la suma de los valores medios diarios de la concentración de polen alcanza el 5% del total anual, hasta que su suma llegue al 95% del total de granos de polen, es decir, la estación polínica comprenderá el período de tiempo en que se recoge el 90% del total anual de granos de polen.

Según las modificaciones de Jäger (1996): la estación de polen comienza el primer día que se alcanza una concentración mayor del 5% del polen anual, sin que se produzcan más de 6 días con valor 0 cero; y se fija como fecha de finalización del PPP cuando se alcanza el 95% del polen anual total recogida

Hay otros autores como Andersen (1991) que utilizan el intervalo de porcentaje acumulado entre 2.5 y 97.5% o más recientemente Lind (2016) que aplica entre 3 y 97%. Pensamos que viendo la hay polinizaciones en los meses de verano, como hemos comentado antes, usar porcentajes menores al 5% pueden distorsionar los resultados.

Los valores que recogemos son:

1. Fecha de inicio de la polinización
2. Fecha del fin de la polinización
3. Duración en días de la polinización
4. Fecha del día pico, el de máximo recuento
5. Valor pico

4.5.3 Graficas de polinización

Analizamos las gráficas de polinización con los recuentos diarios de *Cupressaceae*/*Taxodiaceae* y *Poaceae* en nuestra atmósfera de los años 2000-2016. Además, hemos incluido los otros pólenes a los están sensibilizados los pacientes. No hacemos el cálculo del periodo principal de polinización de estos taxones a los que los pacientes están sensibilizados porque las siguientes causeas no pensamos que sean relevantes:

Olea: gráficamente se aprecia que la época de polinización está delimitada a mayo y junio y los niveles que obtenemos en relación a los de alerta son bajos

Fresno: porcentajes de recuentos totales bajos, menores del 1% del total de los anuales

Plátano: Recuentos bajos en relación con los niveles de alerta

Plantago: época de polinización y sintomatología superpuesta a la de las gramíneas

4. 6 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.6.1 Análisis descriptivos

Se han realizado análisis descriptivos de las variables recogidas:

- Las variables categóricas se han resumido mediante frecuencias y porcentajes.
- Las variables continuas se han resumido mediante las medidas de tendencia central y dispersión: media, desviación estándar, mediana, los percentiles del 25% y el 75% (Q1 y Q3) y valores extremos (mínimo y máximo).

4.6.2 Análisis bivariante

La relación entre variables:

- Para dos variables categóricas se presentan tablas de contingencia con la frecuencia en cada categoría y el porcentaje por columnas. Para evaluar la posible asociación se han realizado pruebas de Chi cuadrado o test exacto de Fisher y se presenta el p-valor resultante.
- Para una variable numérica con una categórica se presentan los estadísticos descriptivos por grupos. Para evaluar la posible asociación se han realizado pruebas T-Test, ANOVA o las pruebas no paramétricas de Wilcoxon o Kruskal-Wallis y se presenta su p-valor resultante.
- Para valorar la relación entre dos variables numéricas se presenta la correlación de Pearson o Spearman, así como su p-valor resultante. En algunos casos cuando la variable no cumplía la condición de normalidad se ha utilizado la transformación logarítmica para normalizarla.

4.6.3 Concordancia entre marcadores (Positivo/Negativo)

Para evaluar la concordancia entre dos marcadores con resultado Positivo o Negativo se presenta el coeficiente Kappa junto a su intervalo de confianza del 95%.

4.6.4 Estimación y comparación curvas ROC

Se han utilizado las curvas ROC para determinar la capacidad predictiva de las pruebas diagnósticas convencionales (SPT e IgE frente a extracto completo), tomando como

valor de referencia (gold standard) el diagnóstico molecular (IgE frente al alérgeno mayoritario Cup a 1). Las curvas ROC nos permiten determinar el punto de corte óptimo en función del binomio sensibilidad / especificidad. El cálculo del área bajo la curva (AUC) nos permite determinar la capacidad predictiva que tiene cada prueba de diagnosticar correctamente a los sujetos alérgicos, en este estudio, a cupressus.

El “Gold Standard” que se ha utilizado para definir los verdaderos pacientes positivos y negativos a cupressus es la prueba IgE Cup a 1, cuando el valor de la prueba era superior o igual a 0.35 kU/L se ha considerado al pacientes positivo y negativo cuando era inferior a 0.35 kU/L.

Para cada una de las curvas ROC se presenta su AUC junto a su intervalo de confianza del 95%. Para realizar la comparación entre dos curvas ROC se ha utilizado el método de Long se presenta la diferencia entre las dos AUCs de las curvas ROC junto a su intervalo de confianza del 95% y su p-valor resultante.

5. RESULTADOS

5.1 DATOS AEROBIOLÓGICOS

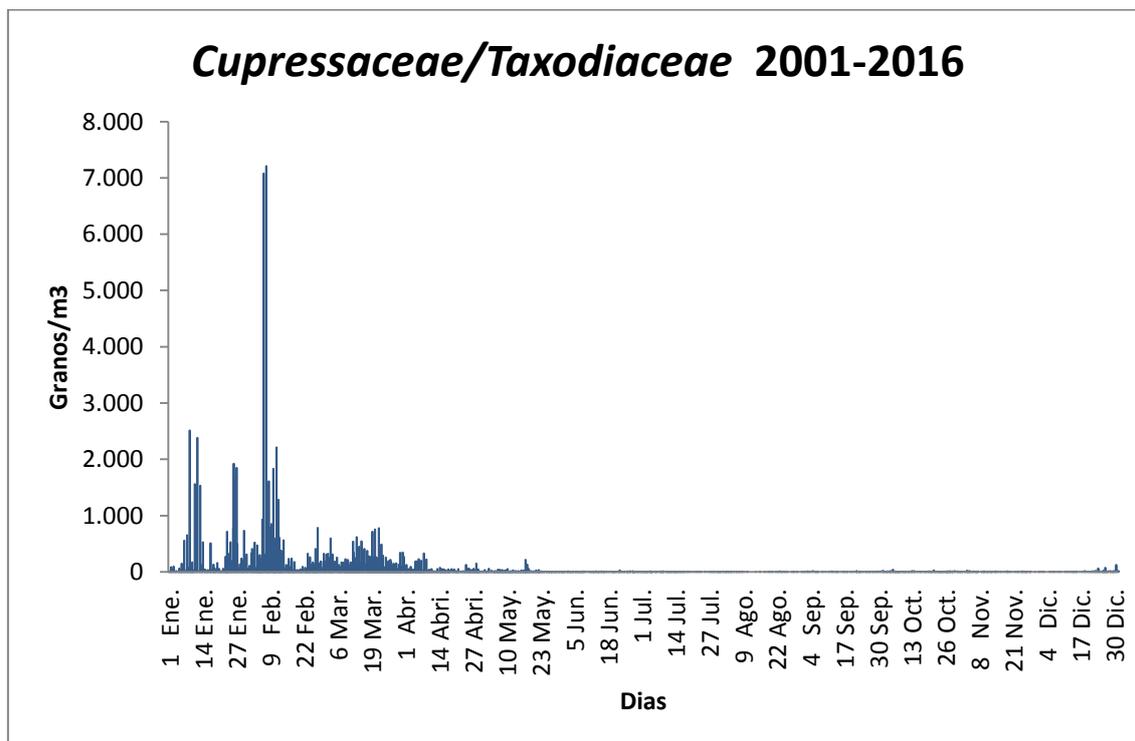
En este apartado se van a presentar los resultados de los recuentos aerobiológicos efectuados en la ciudad de Burgos desde el inicio del año 2000 hasta la finalización del 2016 de los taxones *Cupressaceae/Taxodiaceae* representativo de las cupresáceas, *Poaceae* de las gramíneas, así como el de *Olea*, *Fraxinus*, *Platanus* y *Plantago*.

5.1.1. Datos aerobiológicos del taxón *Cupressaceae/Taxodiaceae* en la atmósfera de Burgos en el periodo 2000-2016.

En primer lugar, los recuentos anuales totales, a continuación, se presentarán los resultados de los años 2015 y 2016 que ha sido el periodo de inclusión de los pacientes. Seguidamente, se presentan los cálculos del Periodo Principal de Polinización.

5.1.1.1 Recuentos de *Cupressaceae/Taxodiaceae*

Figura 5.1 Concentraciones medias diarias del taxón *Cupressaceae/Taxodiaceae* de los años 2001 a 2016 en granos/m³.



Para ver de forma más gráfica la época de polinización hemos suprimido los valores por encima de 1000 granos/m³ (Figura 5.2)

Figura 5.2 Concentraciones medias diarias del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016 en granos/m³(sin valores por encima 1000gr/m³).

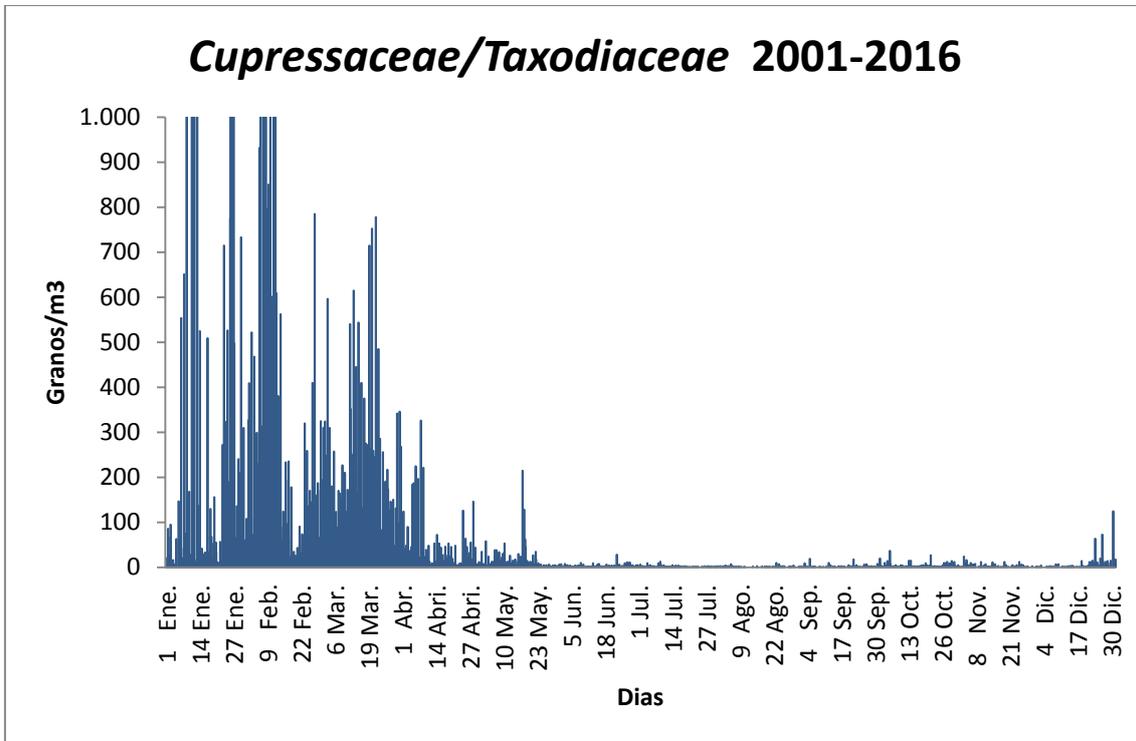


Figura 5.3 Porcentajes anuales del total de pólenes del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016.

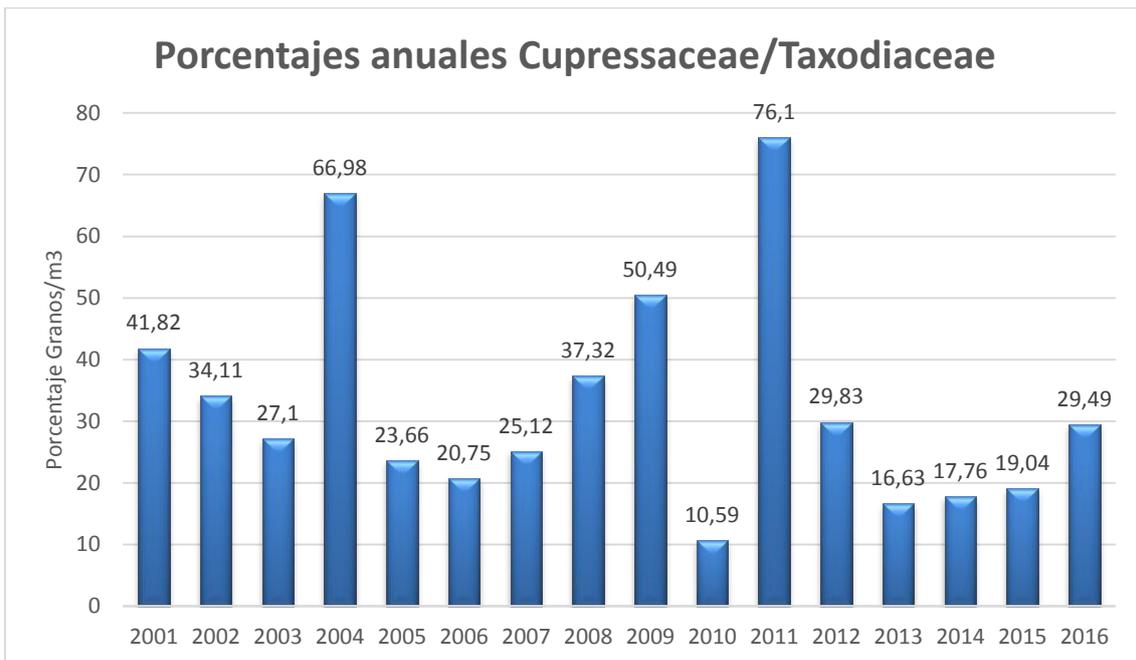


Figura 5.4: Concentraciones anuales máximas de Cupressaceae/Taxodiaceae 2001- 2016

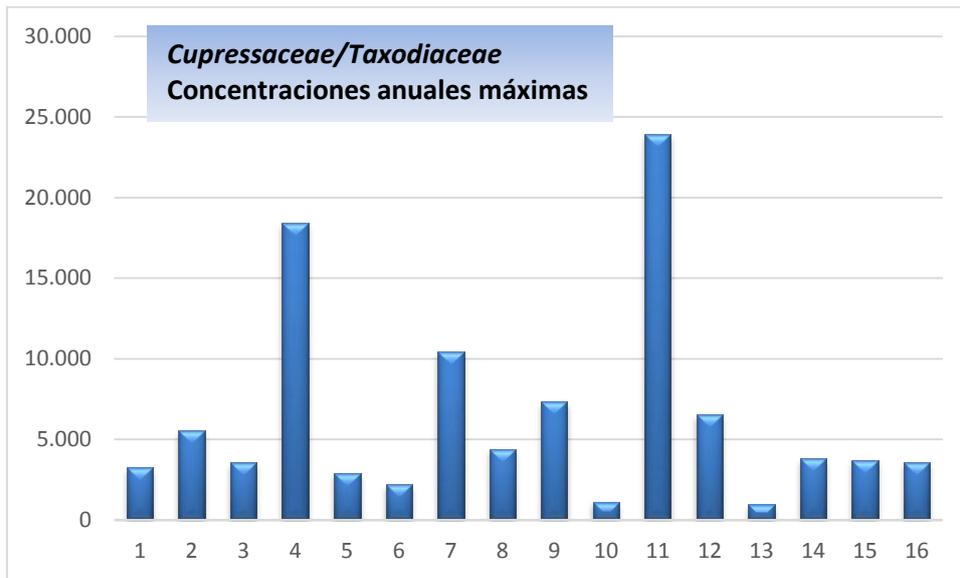
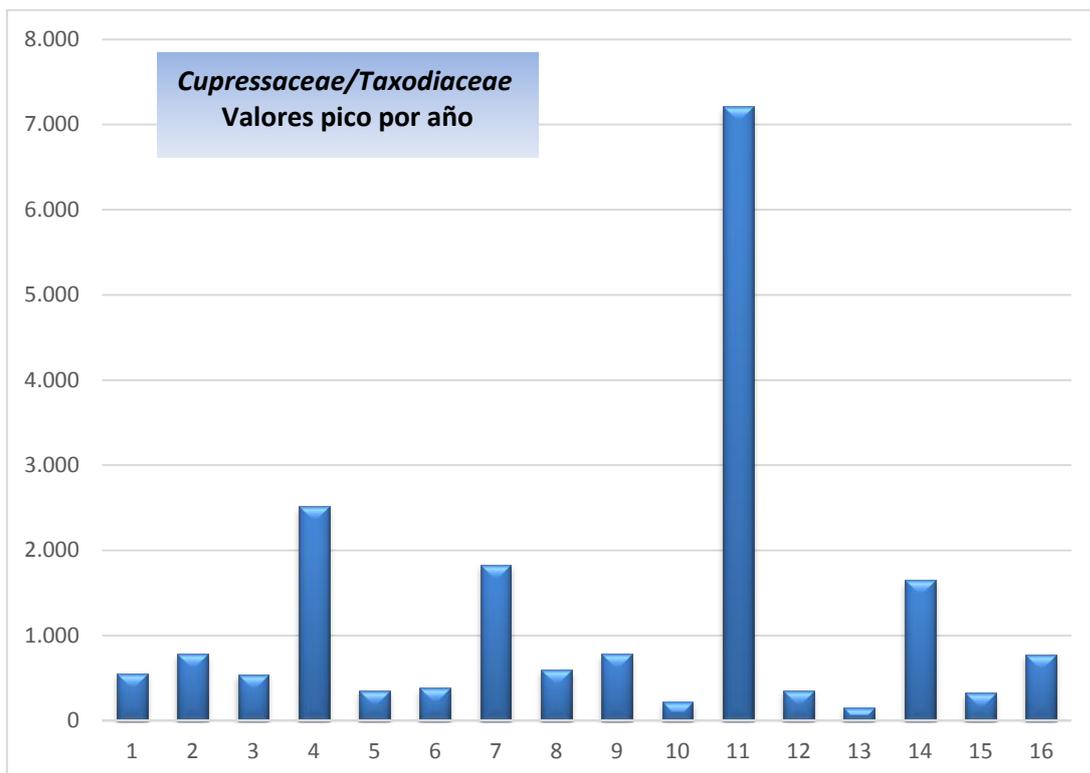


Figura 5.5 Valores pico de Cupressaceae/Taxodiaceae de 2001-2016



5.1.1.2 Periodo Principal de Polinización Cupressaceae/Taxaceae

Periodo principal de polinización del taxón Cupressaceae/Taxaceae con los datos de los recuentos de los años 2001 a 2016. Utilizamos el método Persson y Nilsson y las modificaciones de Jäger.

Resultados del cálculo del Periodo Principal de Polinización (PPP1) del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016

Tabla 5.1 Datos del Periodo Principal de Polinización de Cupresaceae/Taxodiaceae 2001-2016

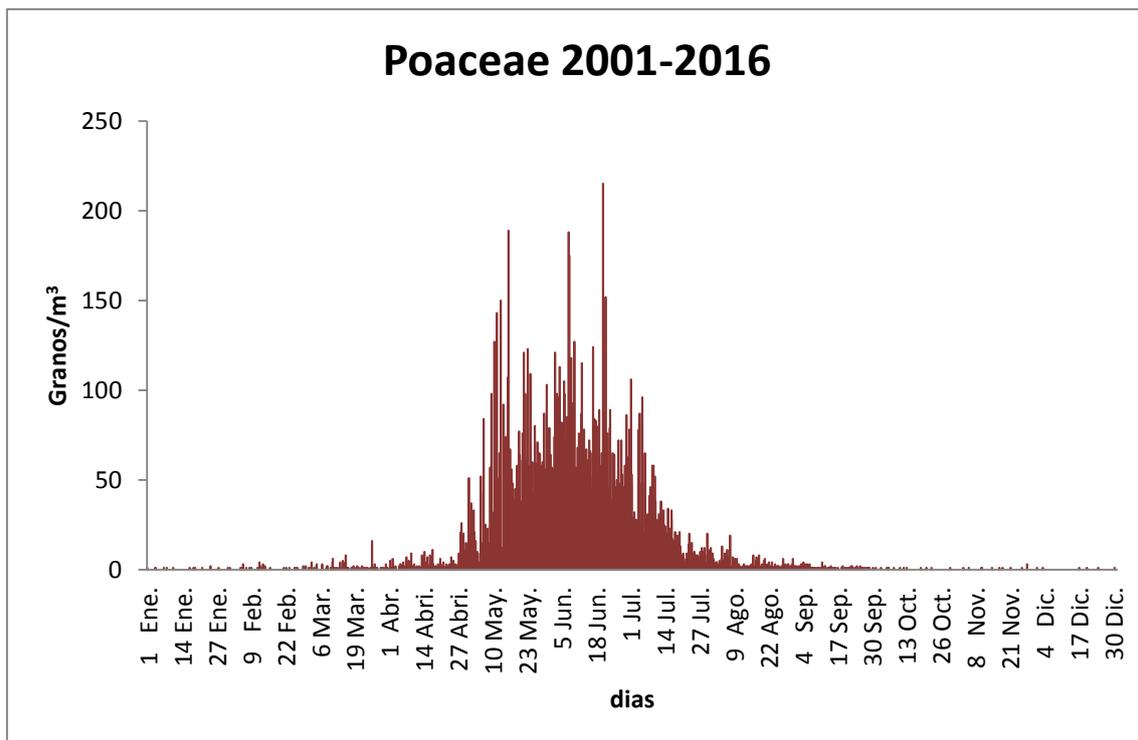
Cupressaceae/ Taxodiaceae					
	Fecha inicio (5% acumulado)	Fecha fin (hasta 95% acumulado)	Duración (días)	Fecha día pico	Valor pico
2001	3 Ene.	22 Mar.	79	7 Ene.	554
2002	31 Dic.	21 Abril	112	22 Mar.	778
2003	19 Ene.	26 Abril	98	12 Mar.	540
2004	9 Ene.	21 Mar.	72	9 Ene.	2.514
2005	11 Feb.	29 Abril	78	12 Mar.	352
2006	8 Feb.	3 Jun.	116	13 Feb.	381
2007	24 Ene.	9 Abr.	76	10 Feb.	1.830
2008	27 Ene.	27 Abril	91	3 Mar.	596
2009	23 Ene.	27 Mar.	64	27 Feb.	785
2010	14 Nov.	2 Ago.	262	17 Mayo	215
2011	6 Feb.	31 Mar.	54	7 Feb.	7.210
2012	23 Feb.	23 Abril	60	22 Mar.	354
2013	3 Ene.	20 Ago.	230	19 Ene.	156
2014	26 Ene.	10 Mayo	105	26 Ene.	1.650
2015	28 Dic.	22 Jun.	177	29 Feb.	325
2016	24 Ene.	17 Mayo	83	25 Ene.	775

NOTA: los años comienzan el 1 de noviembre hasta el 31 de octubre en el caso de las cupresáceas

5.1.2 Datos aerobiológicos del taxón *Poaceae* (Gramíneas) en la atmósfera de Burgos en el periodo 2000-2016.

5.1.2.1 Recuentos del taxón *Poaceae*

Figura 5.6: Concentraciones medias diarias del taxón *Poaceae* de los años 2001-2016 en granos/m³.



5.1.2.2 Periodo Principal de Polinización

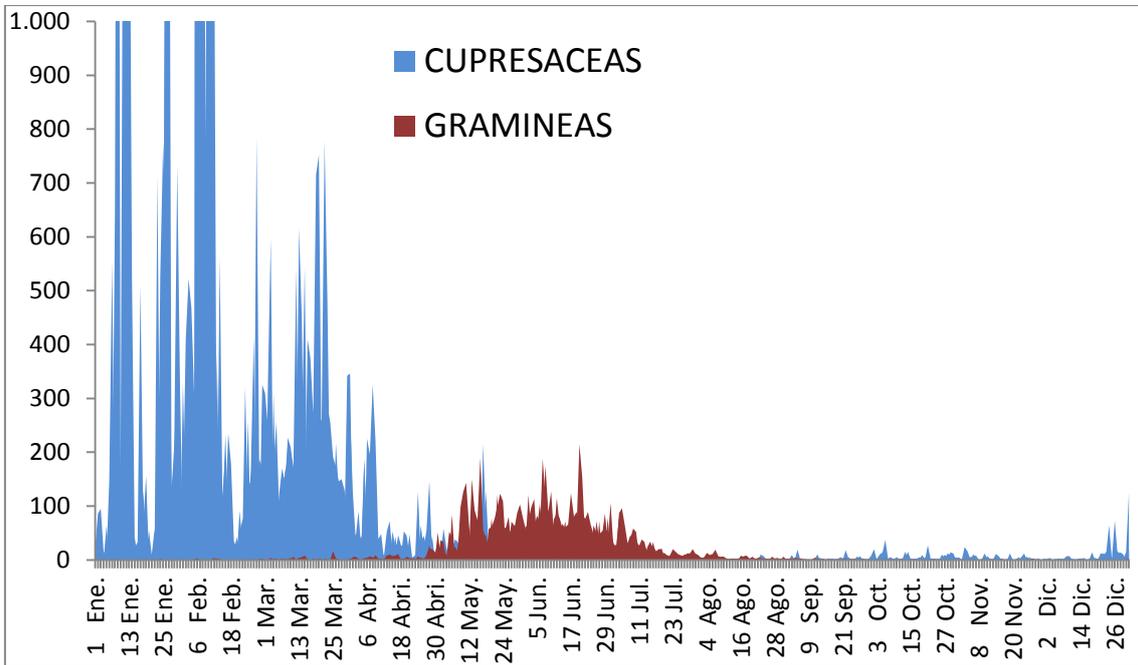
Resultados del cálculo del Periodo Principal de Polinización (PPP1) del taxón *Poaceae* de los años 2001 a 2016

Tabla 5.2 Datos del Periodo Principal de Polinización de Poaceae 2001-2016

Gramíneas/Poaceae					
	Fecha_inicio (5% acumulado)	Fecha_fin (hasta 95% acumulado)	Duración (días)	Fecha día pico	Valor pico
2001	12 Mayo	20 Jul.	69	4 Jun.	63
2002	12 Mayo	20 Jul.	69	16 Mayo	107
2003	8 Mayo	6 Jul.	59	8 Jun.	175
2004	28 Mayo	24 Jul.	57	17 Jun.	124
2005	30 Abril	11 Jul.	72	26 Mayo	80
2006	10 Mayo	6 Jul.	57	16 Mayo	189
2007	8 Mayo	22 Jun.	45	6 Jun.	98
2008	19 Mayo	26 Jul.	68	1 Jul.	106
2009	7 Mayo	1 Jun.	25	20 Mayo	64
2010	19 Mayo	26 Jul.	68	23 Mayo	123
2011	13 Abril	15 Jul.	93	14 Jun.	67
2012	13 Mayo	13 Jul.	61	30 Mayo	103
2013	9 Junio	19 Jul.	40	5 Jul.	96
2014	5 Mayo	4 Ago.	91	3 Jun.	96
2015	6 Mayo	14 Jul.	69	11 Mayo	143
2016	22 Mayo	9 Jul.	48	20 Jun.	215

Para diferenciar las épocas de polinización, en la siguiente figura recogemos de forma comparativa y suprimidos los valores por encima de 1000 granos/m³, los recuentos de los dos taxones

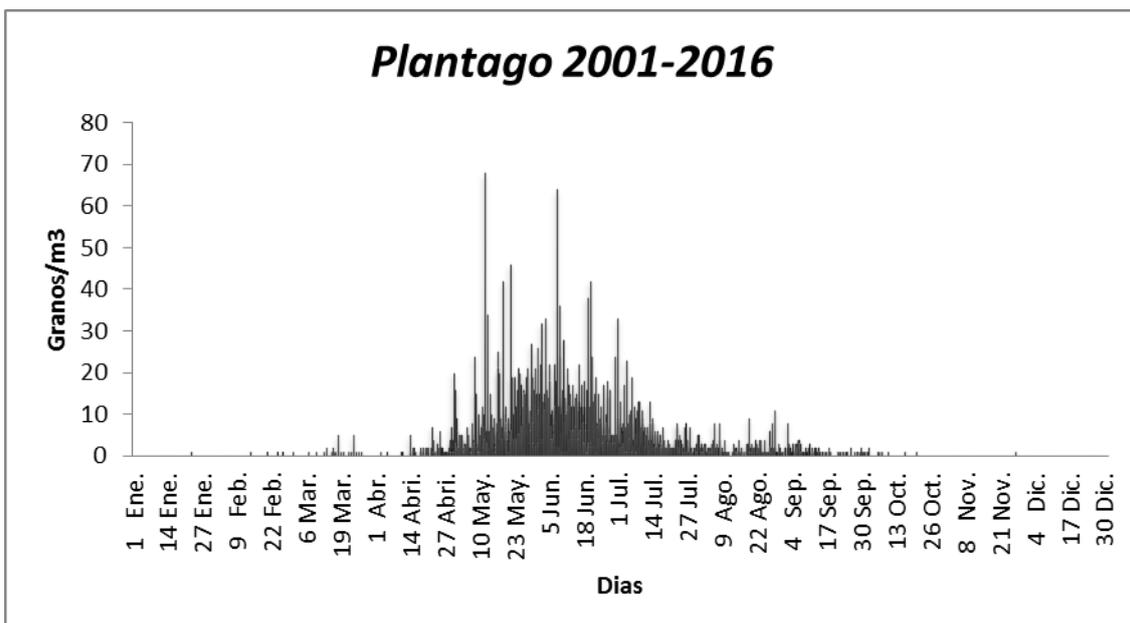
Figura 5.7: Concentraciones medias diarias de los taxones Poaceae (gramíneas) y Cupressaceae/Taxodiaceae (Cupresáceas) de los años 2001-2016 en granos/m³.



5.1.3 Recuentos de los taxones *Plantago*, *Olea*, *Fraxinus* y *Plátanus* de los años 2001-2016

5.1.3.1 *Plantago*

Figura 5.8: Concentraciones medias diarias del taxón *Plantago* de los años 2001-2016 en granos/m³.



5.1.3.2 Familia Oleaceae

Figura 5.9: Concentraciones medias diarias del taxón *Olea* de los años 2001-2016 en granos/m³.

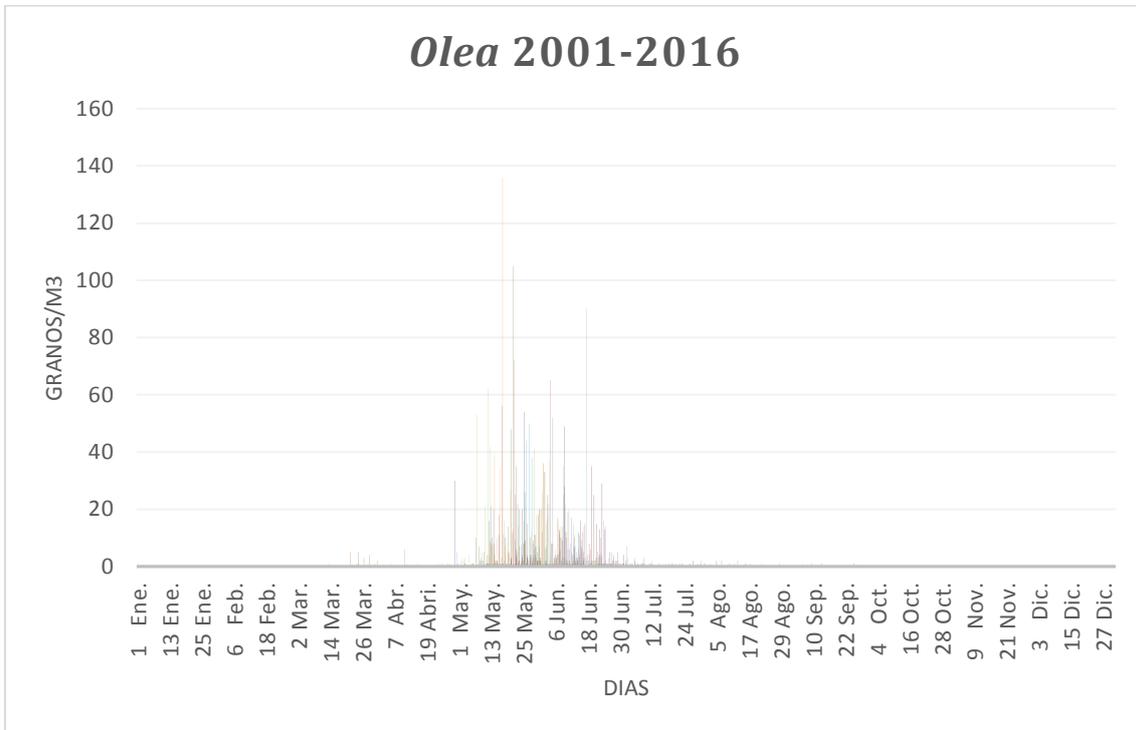


Figura 5.10: Días pico y totales anuales del taxón *Fraxinus* de los años 2001-2016 (menos 2015) en granos/m³.

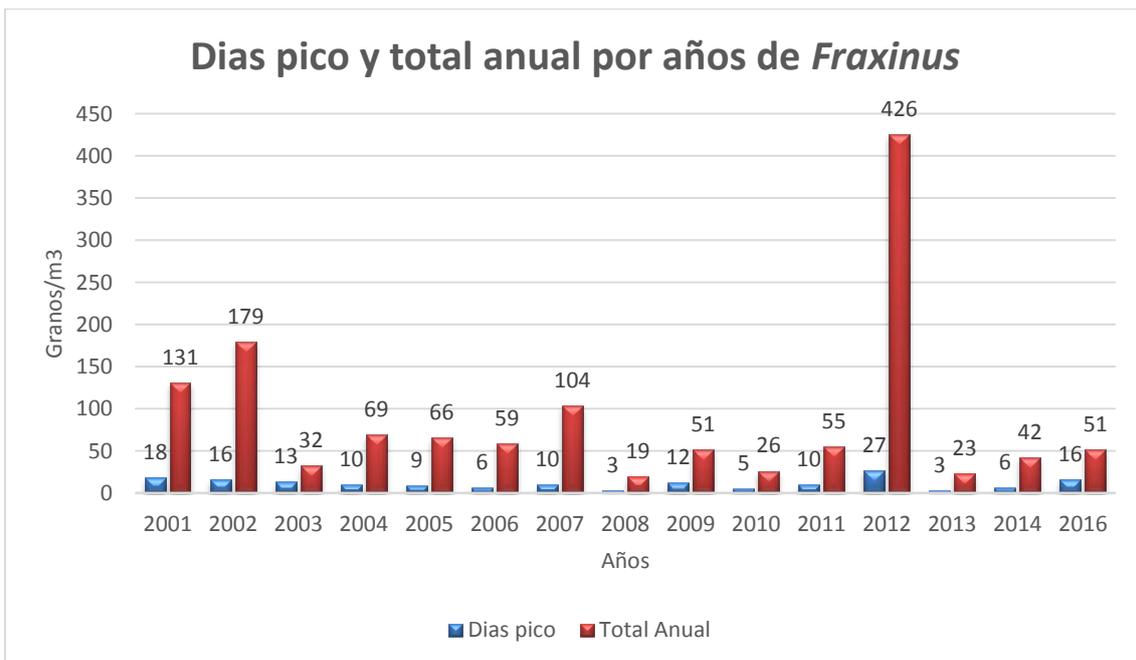


Figura 5.11: Concentraciones medias diarias del taxón *Fraxinus* de los años 2001-2016 (menos 2015) en granos/m³.

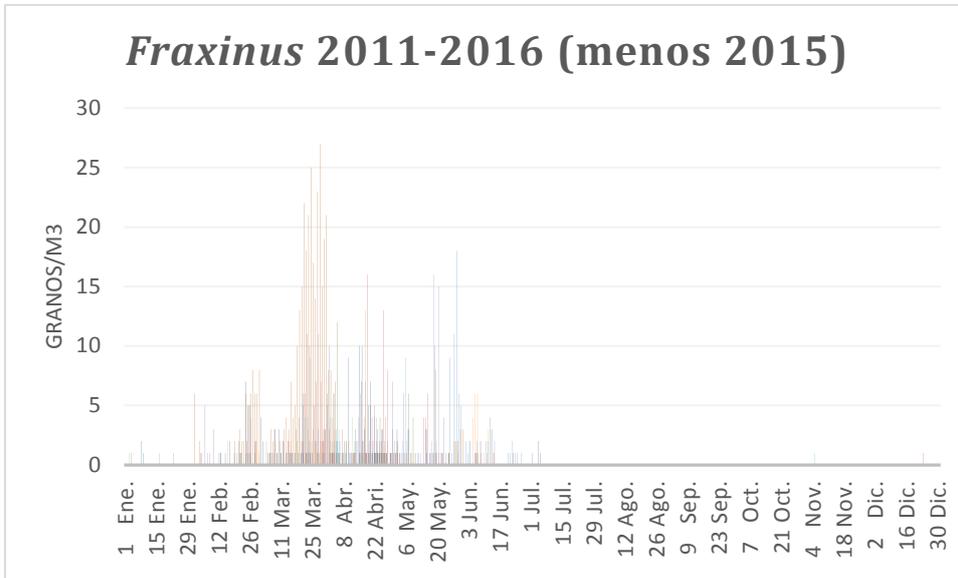
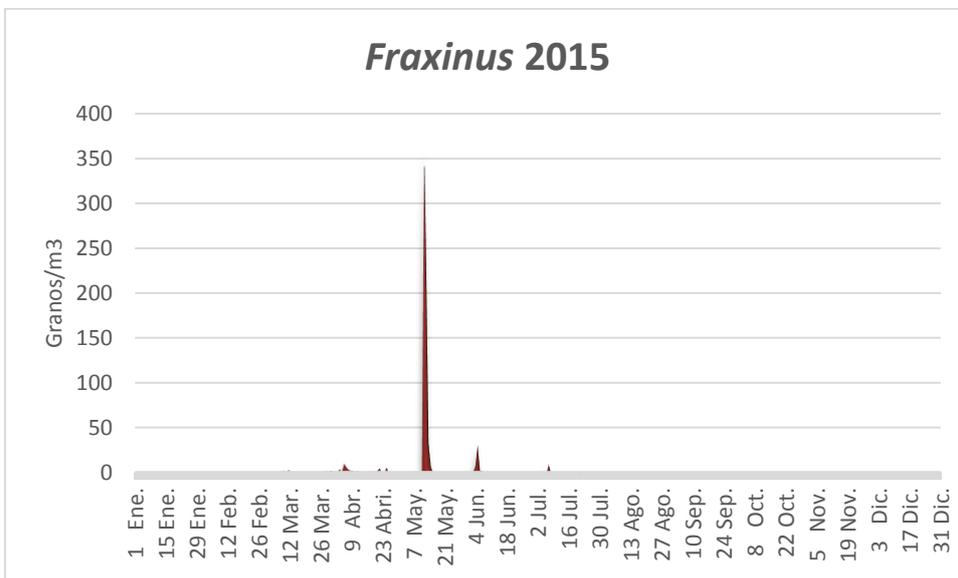


Figura 5.12: Concentraciones medias diarias del taxón *Fraxinus* del año 2015 en granos/m³.



5.1.3.2 *Platanus*

Figura 5.13: Concentraciones medias diarias del taxón *Platanus* de los años 2001-2016 en granos/m³.

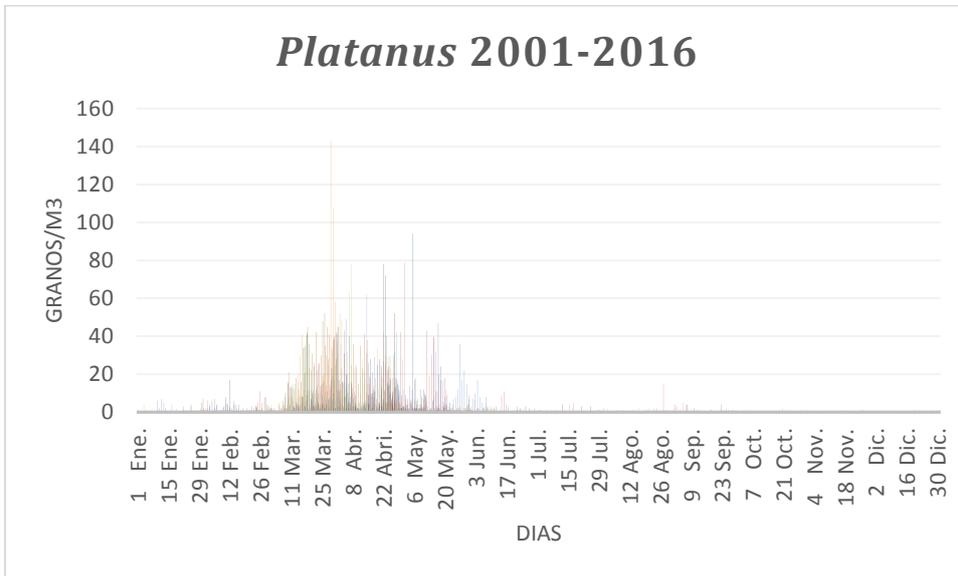
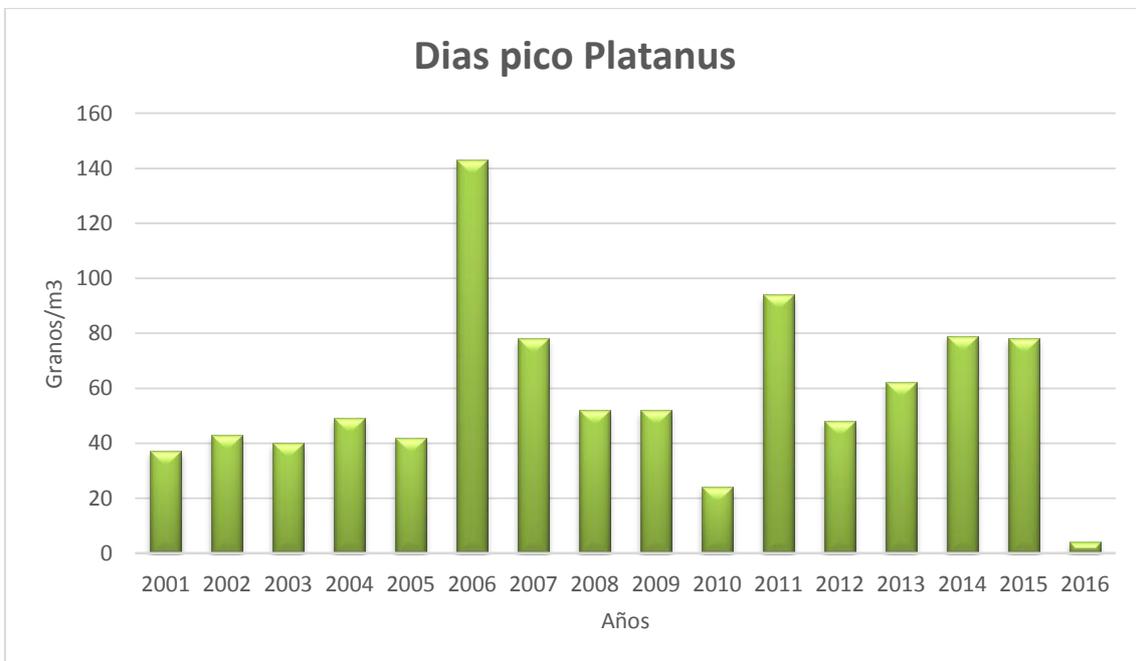


Figura 5.14: Días pico del taxón *Platanus* de los años 2001-2016



5.2. DATOS DESCRIPTIVOS

Se han incluido un total de 96 pacientes, de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión señalados anteriormente.

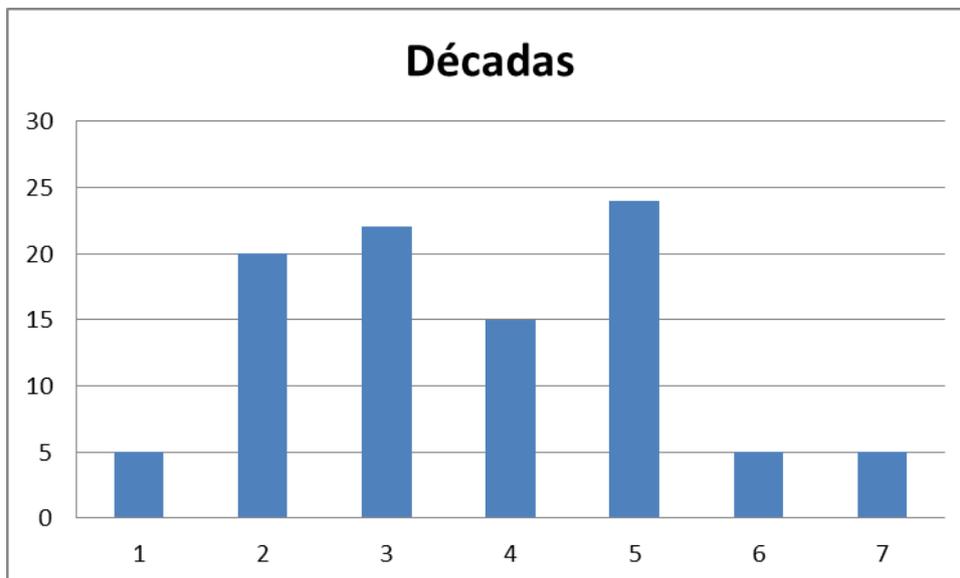
5.2.1. Datos socio demográficos

En nuestra consulta de Alergología se atienden pacientes de todas las edades. Se han incluido 96 pacientes con unas edades comprendidas entre 6 y 74 años. La media y desviación estándar de edad de los pacientes fue de 32.6 +/- 15.6 años (Mínimo: 6, máximo: 74). Mediana (Q1-Q3): 33 (19.5 – 45.5). La mayoría de los pacientes eran mayores de 18 años (tabla 5.3 y figura 5.15).

Tabla 5.3 Edad de diagnóstico

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Missing
Edad (años)	96	32.6 (15.6)	33.0 (19.5, 45.5)	6, 74	0

Figura 5.15 Distribución de pacientes por década de edad



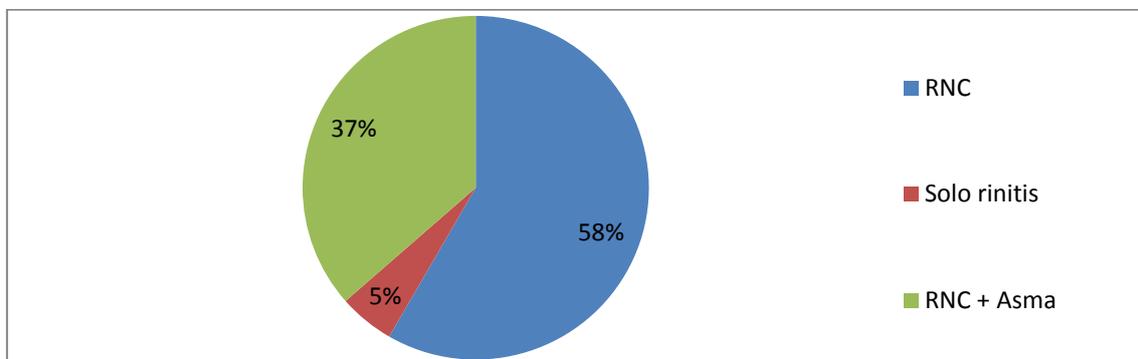
En relación a la distribución en cuanto al sexo, se registró más casos de mujeres (n 57) que de hombres (n 39).

5.2.2. Datos clínicos

Al tratarse de un estudio con individuos sensibilizados a aeroalérgenos, todos los pacientes presentaban sintomatología alérgica respiratoria.

Todos los pacientes padecían rinitis y la mayoría salvo 5, asociaba conjuntivitis. Ninguno de ellos solo conjuntivitis. 35 pacientes (36.5%) asociaban asma bronquial como consecuencia de su sensibilización a ciprés.

Figura 5.16 Distribución de pacientes por síntomas



RNC: rinoconjuntivitis

5.2.3. Diagnóstico alergológico

5.2.3.1. Pruebas cutáneas - Prick test (SPT)

Se consideró un SPT positivo si el DMP (Diámetro medio de la Pápula) era ≥ 3 mm (Bousquet J, 2012)). Por criterio de inclusión todos los pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas a *C arizonica*. y/o *C sempervirens*. También se realizaron pruebas cutáneas a otras cupresáceas: *Juniperus oxycedrus* (Enebro).

Se determinaron pruebas cutáneas a alérgenos de reactividad cruzada (profilina, polcalcina y LTP de melocotón). Los resultados se incluyen en la Tabla 5.4.

También se realizaron pruebas cutáneas frente a una batería de aeroalérgenos habituales en nuestra zona. Incluimos los pólenes de gramíneas en la Tabla 5.4 por el alto porcentaje de sensibilización. En la Tabla 5.5 se recogen el resto de las sensibilizaciones a otros aeroalérgenos. Un mismo paciente podría presentar más de una sensibilización.

Tabla 5.4 Descriptiva de las pruebas cutáneas SPT

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Missing	Positivo n (%)
SPTC <i>Arizonica</i>	96	6.8 (1.9)	7.0 (5.0, 8.0)	3, 12	0	96 (100.0%)
SPT <i>C Sempervirens</i>	96	7.7 (2.8)	7.0 (6.0, 9.0)	4, 20	0	96 (100.0%)
STP Enebro	96	6.1 (1.8)	6.0 (5.0, 7.0)	4, 10	0	96 (100.0%)
SPT Profilina	95	0.6 (2.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 10	0	9 (9.5%)
STP Polcalcina	95	0.6 (1.9)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 10	0	11 (11.6%)
STP LTP	95	0.1 (0.7)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 6	0	3 (3.1%)
STP Gramíneas	96	5,6(5,0)	6,5 (0,0,9,5)	0, 20	0	59 (61,5%)

Tabla 5.5: Otras sensibilizaciones a aeroalérgenos diferentes a las gramíneas

		Total (n=96)
Epitelios	n (%)	42 (43.7%)
Ácaros	n (%)	29 (30.2%)
<i>Olea</i>	n (%)	15 (15.6%)
<i>Plantago</i>	n (%)	12 (13.1%)
<i>Alternaria</i>	n (%)	9 (9.3%)
<i>Platanus</i>	n (%)	6 (3.1%)
Látex	n (%)	2 (1.0%)

34 pacientes (35.41 %) estaba monosensibilizado a cupresáceas, como único polen.

Destaca entre ellos la cosensibilización al polen de gramíneas como la alergia asociada más frecuente, el 61,5% de los pacientes (n 59).

Todos los pacientes con prueba positivan a profilina presentaban prueba positiva a gramíneas.

En relación a la sensibilización a otros pólenes, eran a *Olea*, *Plantago* y *Platanus*. Los pacientes sensibilizados a *Olea* también lo eran a *Fraxinus*.

Las sensibilizaciones a epitelios comprenden las de los gatos, perros, conejos y caballos. De ellas la mayoría estaban monosensibilizados a gatos (n: 25 - 26%)

En cuanto a la alergia alimentaria, recogida en la tabla 5.6 destaca que la gran parte de los pacientes (86.5%) no asociaba ninguna. La más frecuente era la alergia a frutas (tabla 5.7), la cual referían padecer el 6.25% (n: 6) de los pacientes. 3 de ellos estaban sensibilizados a frutas de la familia rosácea con sensibilización a LTP.

Tabla 5.6: Cosensibilizaciones a alérgenos alimentarios

		Total (n=96)
Ninguno	n (%)	83 (86.5%)
Frutas	n (%)	6 (6.25%)
Frutos Secos	n (%)	3 (3.1%)
Crustáceos	n (%)	2 (2.1%)
Anisakis	n (%)	1 (1.0%)
Pescados Planos	n (%)	1 (1.0%)

Tabla 5.7: Sensibilizaciones a frutas

		Total (n=96)
Ninguno	n (%)	83 (86.5%)
Rosáceas con sensibilización a LTP	n (%)	3 (3.1%)
Kiwi	n (%)	2 (2.1%)
Cucurbitáceas (Melón/Sandia)	n (%)	1 (1.0%)

Todos los pacientes sensibilizados a frutas rosáceas lo estaban a LTP y 2 de los 3 que estaban a frutos secos también lo eran a LTP

De los pacientes monosensibilizados a *Cupressus*:

- Ninguno era alérgico a vegetales
- Ninguno estaba sensibilizado a Profilina

5.2.3.2 Determinaciones de IgE específica y componentes moleculares

En cuanto a las pruebas de laboratorio, el suero de un paciente se extravió y no se pudo realizar la cuantificación de la IgE sérica frente al extracto de *C arizonica* ni el análisis molecular. Debido a esta incidencia se completó el diagnóstico convencional únicamente a 95 pacientes. También se recoge en la tabla los pacientes a los que no se les pudo analizar los otros recombinantes. Se consideró la IgE positiva si tenía un valor ≥ 0.35 kU/L y negativa si era inferior. Se realizó determinación de IgE específica al extracto completo de *C arizonica* y a los alérgenos mayoritarios: Cup a 1, Phl p 1 y Phl p 5 y a los panalérgenos: profilina (Phl p 12), polcalcina (Phl p 7) y LTP (Pru p 3 de melocotón). Los resultados se adjuntan en la Tabla 5.8.

92 pacientes (96.8%) tuvieron una IgE específica positiva al extracto total de *C arizonica* y 3 negativa, mientras que en el caso del alérgeno mayoritario Cup a 1 sólo hubo 1 paciente con IgE negativa.

Tabla 5.8: Descriptiva de la IgE

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Perdidos	Positivo n(%)
IgE extracto	95	15.732 (22.421)	6.860 (2.700, 16.400)	0.07, 100.00	1	92 (96.8%)
IgE Cup a1	95	24.536 (29.968)	12.300 (5.100, 28.100)	0.01, 100.00	1	94 (98.9%)
IgE Ph p 1	85	9.648 (17.669)	1.200 (0.000, 9.900)	0.00, 100.00	11	49 (57.6%)
IgE Ph h p 5	85	5.493 (12.831)	0.000 (0.000, 3.900)	0.00, 77.10	11	30 (35.3%)
IgE Phl p 7	86	0.447 (2.445)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 20.60	10	8 (9.3%)
IgE Phl p 12	86	0.133 (0.579)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 4.70	10	7 (8.1%)
IgE LTP	91	0.607 (3.840)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 33.70	5	4 (4.4%)

Al igual que en las pruebas cutáneas, ninguno de los pacientes monosensibilizados a *C arizonica* estaba sensibilizado a Phl p12

5.2.3.3 Determinaciones de IgE específica a Determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada –CCD

En la guía de Alergia Molecular de la EAACI (Matricardi PM, 2016) se propone la determinación de la bromelina (Ana c 2) o el N-glicano purificado de la bromelina MUXF3 en el caso de la reactividad de IgE a polen de múltiples árboles, para descartarla posibilidad de reactividad a CCD.

En relación a ellas hemos determinado posteriormente los CCD mediante a IgE específica a MUXF3 en los pacientes de nuestro estudio con varias sensibilizaciones a árboles (*Olea* y/o *Platanus*) con el siguiente resultado (tabla 5.9):

Tabla 5.9 Determinación de MUXF3 en pacientes polisensibilizados a pólenes de arboles

n 17	Positivas > 0.34 KU/L 1	Negativas 16
------	----------------------------	-----------------

Solo resultado positivo un paciente con MUXF3: 17.20 KU/L con la siguiente determinación IgE extracto de *C arizonica* 23,3KU/L y Cup a 1: 45,2 KU/L.

También analizamos todas las determinaciones a CCD realizadas en nuestro servicio (tabla 5.10). Hasta ahora las hemos solicitado a pacientes en estudio de alergia a picadura de himenópteros y en algunos pocos a polisensibilizados pólenes. Estos resultados pueden ser que no sean aplicables a la población general, pero si a una población de riesgo de sensibilización a CCD que son los que han tenido picaduras de himenópteros independientemente si son o no alérgicos.

Tabla 5.10 Determinación de MUXF3 en nuestro servicio

n 211	Positivas > 0.34 KU/L 47	Negativas 163
-------	-----------------------------	------------------

El porcentaje de pacientes sensibilizados es de un 22.27%, con los condicionamientos previos descritas de tener picaduras de himenópteros en su mayoría y algunos polisensibilizados a pólenes, por lo que no los podemos tomar de referencia de una población en general.

5.3 COMPARACIÓN ENTRE DATOS ANALÍTICOS. RELACIÓN ENTRE IgE Y LAS PRUEBAS CUTÁNEAS (SPT)

Relacionamos las IgEs a extracto completo de *C arizonica* con Cup a1 y las pruebas cutáneas a *C arizonica* y *C sempervirens*

Tabla 5.11 Relación entre la IgE a extracto total y las pruebas cutáneas de cupresáceas y nCup a a 1 dos a dos.

		Pos. IgE extr.	Neg. IgE extr.
Test SPT <i>C arizonica</i>			
Total no-missing	n	92	3
Positivo	n (%)	92 (100.0%)	3 (100.0%)
Missing	n	0	0
Test SPT <i>C sempervirens</i>			
Total no-missing	n	92	3
Positivo	n (%)	92 (100.0%)	3 (100.0%)
Missing	n	0	0
Test IgE Cup a1			
Total no-missing	n	92	3
Positivo	n (%)	92 (100.0%)	2 (66.7%)
Negativo	n (%)		1 (33.3%)
Missing	n	0	0
		Pos. IgE CupA1	Neg. IgE CupA1
Test SPT <i>C arizonica</i>			
Total no-missing	n	94	1
Positivo	n (%)	94 (100.0%)	1 (100.0%)
Missing	n	0	0

Test SPT <i>C sempervirens</i>			
		Pos. SPT Ariz.	Neg. SPT Ariz.
Total no-missing	n	94	1
Positivo	n (%)	94 (100.0%)	1 (100.0%)
Missing	n	0	0

Test SPT <i>C sempervirens</i>			
		Pos. SPT Ariz.	Neg. SPT Ariz.
Total no-missing	n	96	
Positivo	n (%)	96 (100.0%)	
Missing	n	0	

5.4. MEDIDAS DE CORRELACIÓN. COMPARATIVA ENTRE LAS PRUEBAS DE CUPRESÁCEAS

Para determinar la relación existente entre las 3 pruebas que nos permiten decidir si un paciente es alérgico a cupresáceas o no, se ha calculado en primer lugar la correlación entre ellas.

Entre la IgE al extracto completo y la prueba cutánea, tanto a *C arizonica* como a *C sempervirens*, la correlación es estadísticamente significativa, aunque los coeficientes de correlación son relativamente bajos, tal y como se ve en la tabla 5.12. Sin embargo, la relación entre la IgE específica al extracto completo de *C arizonica* y la IgE específica a Cup a 1, además de estadísticamente significativa, alcanza un nivel de correlación muy alto. Debido al reducido número de pacientes con resultado negativo en ambos tests, el grado de concordancia entre ambos diagnósticos, medido por el índice Kappa, da un valor de 0.492.

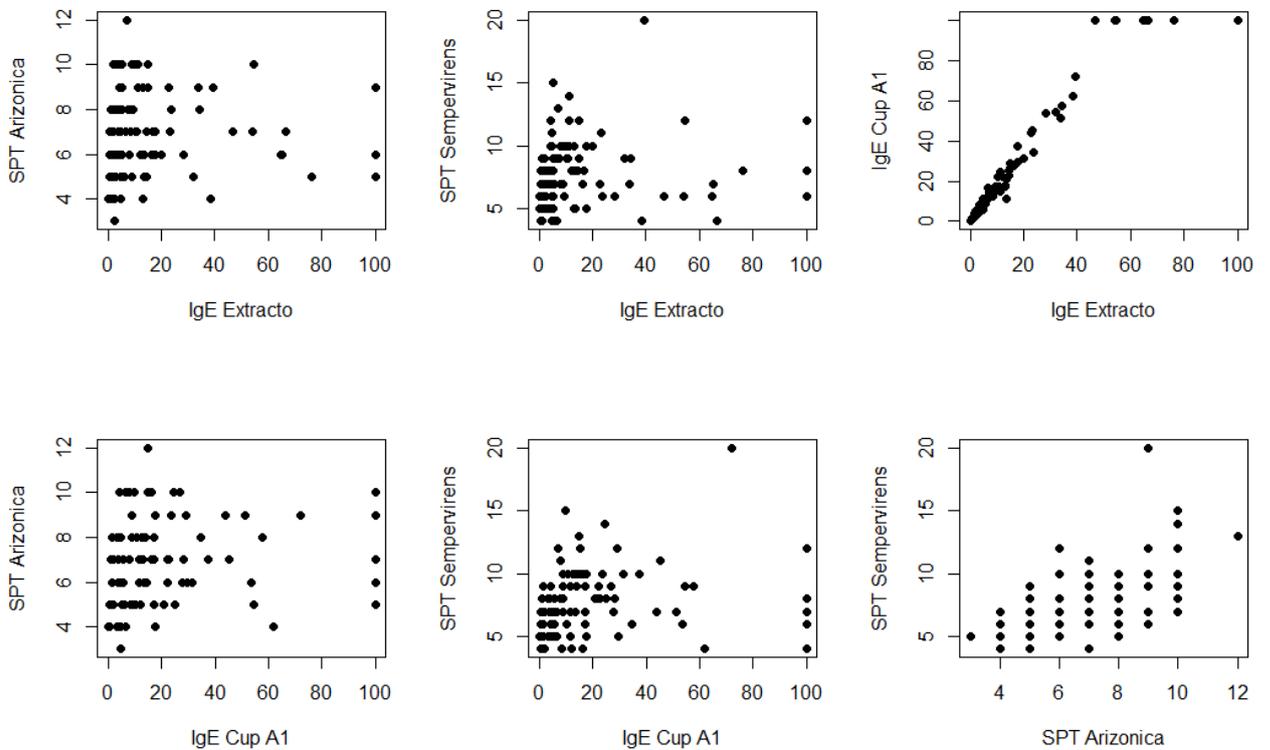
Tabla 5.12: Relación IgE al extracto completo con prueba cutánea e IgE a Cup a 1

	n	Correlación (IC 95%)	p-valor (Correlación)	Kappa (IC 95%)
SPT <i>C arizonica</i> ** y IgE extracto*	95	0.267 (0.069, 0.444)	0.0088	-
SPT <i>C sempervirens</i> ** y IgE extracto*	95	0.299 (0.104, 0.472)	0.0031	-
IgE Cup a1* y IgE extracto*	95	0.977 (0.966, 0.985)	<.0001	0.492 (-0.108, 1.000)
SPT <i>C arizonica</i> ** y IgE Cup a1*	95	0.300 (0.105, 0.473)	0.0029	-
SPT <i>C sempervirens</i> ** y IgE Cup a1*	95	0.310 (0.115, 0.481)	0.0021	-
SPT <i>C sempervirens</i> * y SPT <i>C arizonica</i> **	96	0.650 (0.517, 0.753)	<.0001	-

*Se ha utilizado el logaritmo de la variable para normalizarla.

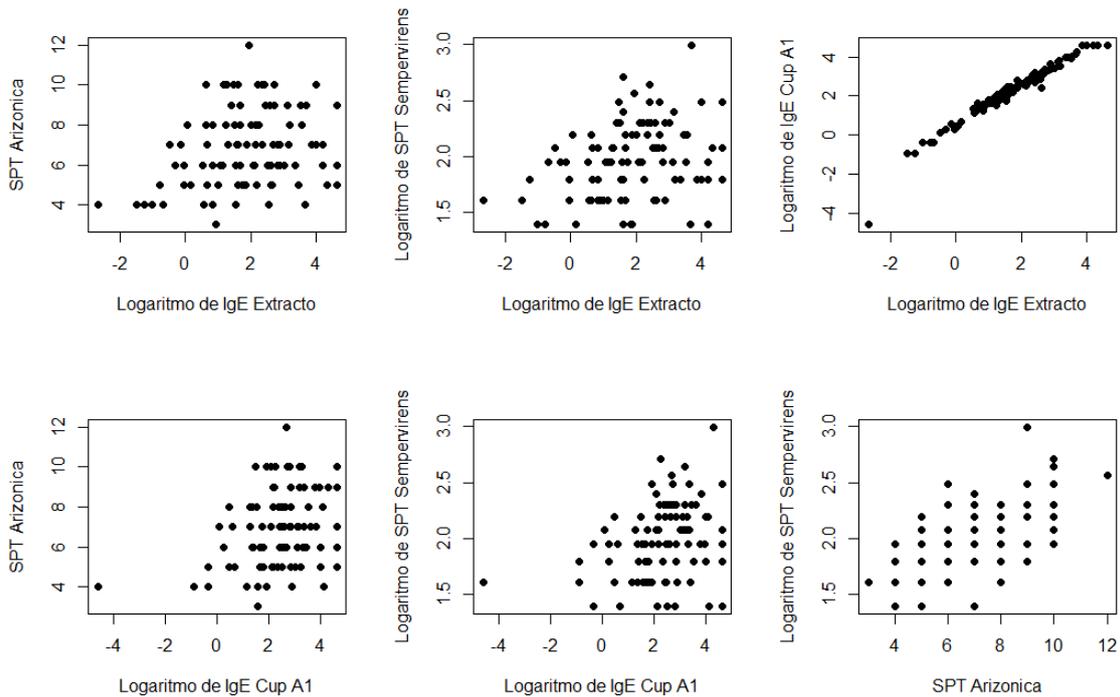
** Al no disponer de negativos en la variable la estimación de la Kappa no es posible.

Figura 5.17: Diagrama de dispersión para los distintos pares de variables de la tabla 5.12



IgE Extracto: IgE a *C arizonica*

Figura 5.18. Diagrama de dispersión para los distintos pares de variables de la tabla 5.12 con el logaritmo de las variables en aquellas que se ha utilizado para el test

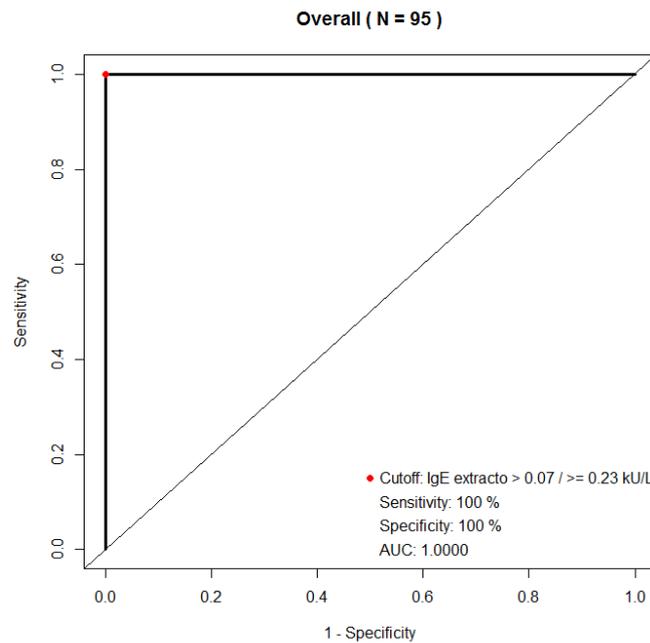


El siguiente paso ha sido utilizar las curvas ROC para determinar la capacidad predictiva de las pruebas diagnósticas convencionales (SPT e IgE frente a extracto completo), tomando como valor de referencia (*gold standard*) el diagnóstico molecular (IgE frente al alérgeno mayoritario Cup a 1). Las curvas ROC nos permiten determinar el punto de corte óptimo en función del binomio sensibilidad / especificidad. El cálculo del área bajo la curva (AUC) nos permite determinar la capacidad predictiva que tiene cada prueba de diagnosticar correctamente a los sujetos alérgicos, en este estudio, a cupressus.

El “Gold Standard” que se ha utilizado para definir los verdaderos pacientes positivos y negativos a cupressus es la prueba IgE Cup a 1, cuando el valor de la prueba era superior o igual a 0.35 kU/L se ha considerado al pacientes positivo y negativo cuando era inferior a 0.35 kU/L.

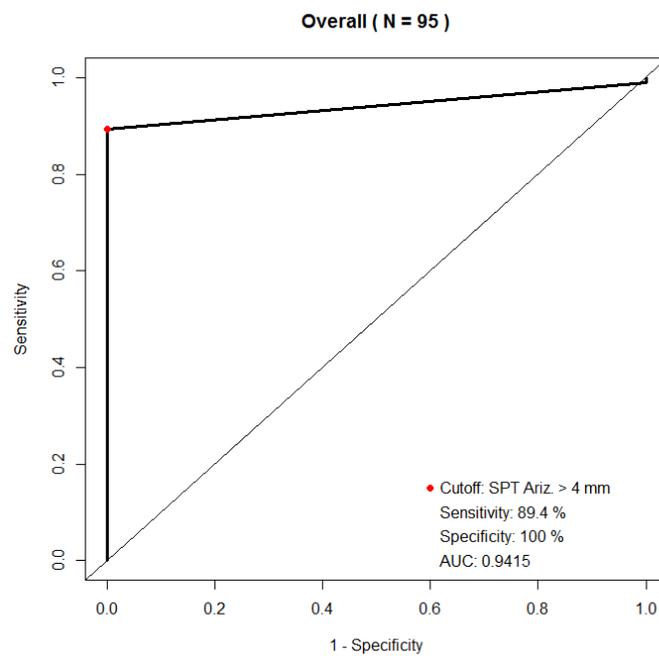
La curva ROC estimada para la variable IgE extracto *C arizonica* presenta una AUC de 1, en otras palabras, presenta una capacidad predictiva perfecta. El punto de corte óptimo con una sensibilidad y especificidad del 100% es considerar a los pacientes ≥ 0.23 kU/L positivos, ya que nos discrimina perfectamente los negativos y positivos de Cup a 1.

Figura 5.19: Curva ROC IgE extracto *C arizonica*



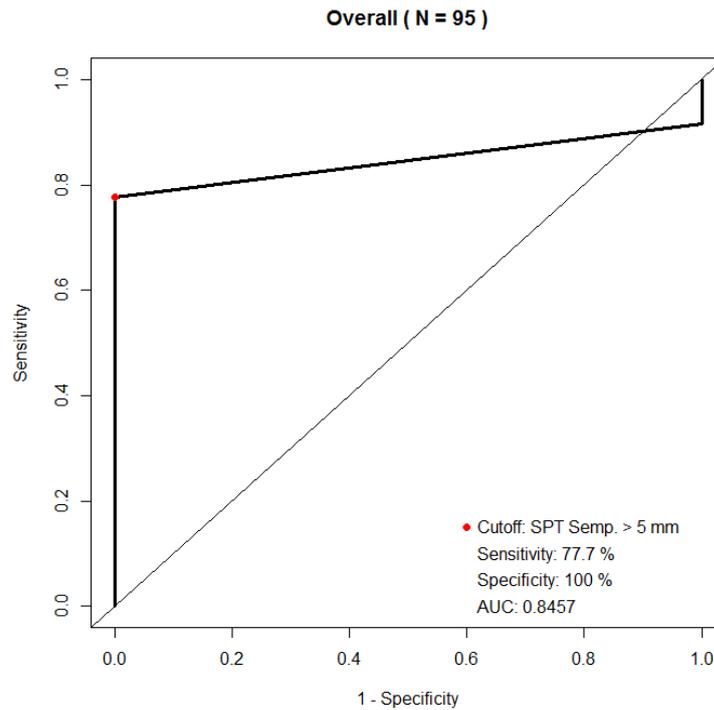
La curva ROC estimada para la prueba cutánea a *C arizonica* presenta una AUC de 0.9415 (IC95%: 0.9056, 0.9774), por lo que presenta una muy buena capacidad predictiva. El punto de corte óptimo estimado es de 4 mm, aquellos pacientes con prueba cutánea a *C arizonica* superior a 4 mm de diámetro de la pápula se consideran positivos, el corte óptimo presenta una sensibilidad del 89.4% y una especificidad perfecta.

Figura 5.20: Curva ROC SPT *C arizonica*



La curva ROC estimada para la prueba cutánea a *C sempervirens* presenta una AUC de 0.8457 (IC95%: 0.7828, 0.9087), por lo que presenta una buena capacidad predictiva. El punto de corte óptimo estimado es de 5 mm, aquellos pacientes con prueba cutánea a *C sempervirens* superior a 5 mm de diámetro de la pápula se consideran positivos, el punto de corte óptimo presenta una sensibilidad del 77.7% y una especificidad perfecta.

Figura 5.21: Curva ROC *C sempervirens*



Las tres AUCs definidas por las curvas ROC son significativamente diferentes a una prueba sin capacidad predictora (caso de AUC: 0.5). Además, se ha realizado una comparación de las AUCs de las tres pruebas 2 a 2 (Ver Tabla 6). Hemos encontrado diferencias significativas entre las AUCs de las tres pruebas:

La AUC de IgE extracto de *C arizonica* es significativamente superior a la de SPT a *C arizonica* ($p < 0.0001$).

La AUC de IgE extracto de *C arizonica* es significativamente superior a la de SPT a *C sempervirens* ($p < 0.0001$).

La AUC de SPT a *C arizonica* es significativamente superior a la de SPT a *C sempervirens* ($p = 0.0017$).

Tabla 5.13: Comparación de las diferentes AUC 2 a 2

		Total con valor de IgE Cup A1 (n=95)
Estimación de las AUCs. Comparaciones 2 a 2 de las AUCs		
IgE Extracto - Prueba sin capacidad predictora	AUC dif. (IC95%)	0.5000 (-, -)
	p-valor	-
SPT <i>C arizonica</i> - Prueba sin capacidad predictora	AUC dif. (IC95%)	0.4415 (0.4056, 0.4774)
	p-valor	<.0001
SPT <i>C Sempervirens</i> - Prueba sin capacidad predictora	AUC dif. (IC95%)	0.3457 (0.2828, 0.4087)
	p-valor	<.0001
IgE Extracto - SPT <i>C arizonica</i>	AUC dif. (IC95%)	0.0585 (0.0226, 0.0944)
	p-valor	0.0014
IgE Extracto - SPT <i>C sempervirens</i>	AUC dif. (IC95%)	0.1543 (0.0913, 0.2172)
	p-valor	<.0001
SPT <i>C arizonica</i> - SPT <i>C sempervirens</i>	AUC dif. (IC95%)	0.0957 (0.0359, 0.1555)
	p-valor	0.0017

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES.

En base a la positividad a la IgE a Cup a 1, nos encontramos hemos clasificado a los 95 pacientes en los cuales la hemos determinado (un paciente no tiene determinación de Cup a 1). En relación a la sensibilización a gramíneas hemos tenido en cuenta la positividad a Phl p1 y/o Phl p5 (n 49) (aunque todos estos pacientes eran positivos a Phl p1). Solo se valorado la sensibilización a aeroalérgenos, no a alimentos.

Presento primero los que tienen detemianción negativa a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5)

- 15 pacientes son monosensibles a Cup a 1. Estos pacientes no presentan sensibilización a gramíneas ni a otros aeroalérgenos (tanto otros pólenes como de otro tipo).
- 3 pacientes presentan IgE a Cup a 1 y negativa a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5) y presentan cosensibilizaciones a otros pólenes, pero no a otros aeroalérgenos no polínicos (epitelios, ácaros, alternaría y látex). Hay otro paciente con las mismas características, pero en los que no figuran los valores de IgE a Phl p 1 ni a Phl p 5.

- 16 pacientes con IgE a Cup a 1 y cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos (otros alérgenos +/- pólenes) con IgE negativa a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5)
- 10 pacientes con IgE a Cup a 1 y cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos (pólenes y otros alérgenos) con IgE no determinada a Phl p 1 y/o 5
- 1 paciente negativo a Cup a 1, negativo a IgE a Phl 1 y 5 pero que presenta cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos.

Ahora los que tiene determinación positiva a gramíneas

- 8 pacientes presentan IgE a Cup a 1 y a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5) pero no presentan cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos.
- 4 pacientes presentan IgE a Cup a 1 y a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5) y presentan cosensibilizaciones a otros pólenes, pero no a otros aeroalérgenos no polínicos.
- 37 pacientes presentan IgE a Cup a 1 y a gramíneas (Phl p 1 y/o Phl p 5) y cosensibilizaciones a otros alérgenos (otros alérgenos +/- pólenes)
- 10 pacientes con IgE a Cup a 1 y cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos (pólenes y otros alérgenos) con IgE no determinada a Phl p 1 y/o 5
- 1 paciente negativo a Cup a 1, negativo a IgE a Phl 1 y 5 pero que presenta cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos.

De los pacientes seleccionados, se registran dos fenotipos como los más frecuentes. Uno es de pacientes monosensibilizados a Cupressus y el segundo sería el de pacientes sensibilizados a Cupressus y gramíneas. En base a la positividad a la IgE a nCup a 1, Phl p1 y Phl p5 (n 83), hemos caracterizado a los pacientes en varios grupos: Tabla 5.17

Tabla 5.14 Caracterización de los pacientes (n83)

n 83	Cup a 1 +7 Phl p1/ Phl p5 -	Cup a 1 +7 Phl p1/ Phl p5 +
Monosensibilizados a cupresáceas	15	0
Cosensibilizados a cupresáceas y gramíneas	0	8
Cosensibilizaciones a otros pólenes, pero no a otros aeroalérgenos no polínicos	3	4
Cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos +/- pólenes	16	37

En los siguientes apartados se analizan las posibles diferencias entre ambos grupos de pacientes.

5.6 COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS A CUPRESACEAS Y PACIENTES SENSIBILIZADOS A CUPRESACEAS Y GRAMÍNEAS

Los resultados de las pruebas cutáneas y de las determinaciones de las IgE específicas no diferencian dos grupos de pacientes: aquellos sensibilizados a cupresáceas y gramíneas y los sensibilizados a cupresáceas y que no lo están a gramíneas. Otros pólenes a los que están sensibilizados nuestros pacientes son a Olivo, *Plantago* y Plátano. La sensibilización a Olivo no tiene relevancia clínica en nuestra zona porque no hay presencia de polen de Oleáceas en nuestra atmósfera. En relación al *Plantago* nos ocurren dos cosas. Una es que su polinización se superpone a las gramíneas, lo que no nos produce una distorsión en los resultados y su relevancia alergológica es a veces discutida por la escasa existencia de monosensibilizados a este polen, lo que dificulta su estudio. Solo hay 6 pacientes sensibilizados a Plátano, que es un polen con escasa presencia en nuestra atmósfera y separada de la polinización de las gramíneas

Para esta comparativa definimos a los pacientes como monosensibilizados cuando son positivos a Cup a1 y negativo a Phl p1 y Phl p5 y a sensibilizados a ciprés y gramíneas cuando son positivos a Cup a1 y positivo a Phl p1 y/o Phl p5. Utilizamos estos valores para aumentar la precisión en relación a los datos obtenidos anteriormente en cuanto a la sensibilidad y especificidad de Cup a1. Phl p1 es considerado el marcador de sensibilización a polen de gramíneas (Pablos I, 2016). Se hace la determinación sobre 83 pacientes del total del 96. Los pacientes perdidos (n 13) son 11 en los que no se analizó Phl p 1 ni 5, 1 en el que no se analizó Cup a 1 y otro con Cup a 1 negativo

Tabla 5.15 Pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas

		Total (n=96)
Pacientes:		
Total no-missing	n	83
Monosensibilizados a cupresáceas (Positivo Cup a1 y Negativo a Phl p1 y p5)	n (%)	34 (41.0%)
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas (Positivo Cup a1 y Positivo a Phl p1 y/o p5)	n (%)	49 (59.0%)
Missing	n	13

Tabla 5.16 SPT en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Missing	p-valor
SPT <i>C arizonica</i>						0.1235
Monosensibilizados a cupresáceas	34	6.5 (2.0)	6.0 (5.0, 7.0)	4, 12	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	7.2 (1.9)	7.0 (6.0, 9.0)	4, 10	0	
SPT <i>C Serpenvilleans</i>						0.3601
Monosensibilizados a cupresáceas	34	7.4 (3.2)	7.0 (5.0, 8.0)	4, 20	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	8.0 (2.6)	8.0 (6.0, 10.0)	4, 15	0	
STP Enebro						0.9774
Monosensibilizados a cupresáceas	34	6.0 (1.9)	5.5 (5.0, 7.0)	4, 10	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	6.0 (1.7)	5.0 (5.0, 7.0)	4, 10	0	
SPT Profilina*						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.0 (0.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 0	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	1.0 (2.6)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 10	0	
STP Polcalcina**						0.0253
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.1 (0.9)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 5	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	1.1 (2.4)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 10	0	
STP LTP*						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.0 (0.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 0	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	0.2 (1.0)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 6	0	
STP Gramíneas*						<.0001
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.3 (1.2)	0.0 (0.0, 0.0)	0, 5	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	9.0 (3.4)	9.0 (8.0, 10.0)	0, 20	0	

*No se ha realizado el test de comparación de medias ya que todos los pacientes del grupo de monosensibilizados a ciprés presentan valores de 0.

**Prueba Wilcoxon

Se ha realizado un test de comparación de medias de SPT entre los dos grupos. Se ha utilizado una prueba Ttest, cuando no ha sido posible asumir normalidad se ha utilizado la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Tabla 5.16).

Tabla 5.17 Resultados test SPT en pacientes mono sensibilizados a cu o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas

		Monosensibilizados cupresáceas (n=34)	Sensibilizados cupresáceas y gramíneas. (n=49)
<i>SPT C arizonica *</i>			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	34 (100.0%)	49 (100.0%)
Missing	n	0	0
<i>SPT C serpenvirens*</i>			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	34 (100.0%)	49 (100.0%)
Missing	n	0	0
<i>STP Enebro*</i>			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	34 (100.0%)	49 (100.0%)
Missing	n	0	0
<i>SPT Profilina</i>			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)		8 (16.3%)
Negativo	n (%)	34 (100.0%)	41 (83.7%)
Missing	n	0	0
	p-valor	0.0186	

		Monosensibilizados cupresáceas (n=34)	Sensibilizados cupresáceas y gramíneas. (n=49)
STP Polcalcina			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	1 (2.9%)	10 (20.4%)
Negativo	n (%)	33 (97.1%)	39 (79.6%)
Missing	n	0	0
	p-valor	0.0234	
STP LTP			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)		2 (4.1%)
Negativo	n (%)	34 (100.0%)	47 (95.9%)
Missing	n	0	0
	p-valor	0.5104	
STP Gramíneas			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	2 (5.9%)	47 (95.9%)
Negativo	n (%)	32 (94.1%)	2 (4.1%)
Missing	n	0	0
	p-valor	<.0001	

*No se ha realizado test de asociación al solo disponer de resultados positivos del test.

Se ha realizado un test de asociación para evaluar la posible relación entre el resultado de los distintos test SPT y estar monosensibilizado a cupresáceas o sensibilizado a cupresáceas y gramíneas. Se ha utilizado la prueba exacta de Fisher, debido a que no se cumplían las condiciones de aplicación de la prueba Chi-cuadrado (Tabla 5.17).

Luego se ha realizado un test de comparación de medias de IgE entre los dos grupos. Se ha utilizado una prueba Test, cuando no ha sido posible asumir normalidad se ha utilizado la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Tabla 5.18).

Tabla 5.18 IgE en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Missing	p-valor
IgE extracto <i>C arizonica</i> *						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	11.941 (16.847)	5.575 (1.890, 13.100)	0.23, 76.40	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	18.884 (26.182)	8.620 (4.060, 17.700)	0.50, 100.00	0	
Logaritmo de IgE extracto*						0.0456
Monosensibilizados a cupresáceas	34	1.545 (1.545)	1.711 (0.637, 2.573)	-1.47, 4.34	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	2.176 (1.274)	2.154 (1.401, 2.874)	-0.69, 4.61	0	
IgE Cup a1*						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	19.767 (26.175)	11.750 (3.900, 22.300)	0.40, 100.00	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	28.411 (32.498)	14.200 (6.700, 34.500)	0.70, 100.00	0	
Logaritmo IgE Cup a1*						0.0516
Monosensibilizados a cupresáceas	34	2.102 (1.525)	2.464 (1.361, 3.105)	-0.92, 4.61	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	2.700 (1.227)	2.653 (1.902, 3.541)	-0.36, 4.61	0	
IgE Ph p 1***						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.003 (0.017)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 0.10	0	<.0001
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	16.734 (20.624)	9.000 (3.000, 20.600)	0.40, 100.00	0	
IgE Ph h p 5**						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.000 (0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 0.00	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	9.529 (15.775)	1.800 (0.000, 9.100)	0.00, 77.10	0	

	n	Media (Desv. estándar)	Mediana (Q1, Q3)	Min, Max	Missing	p-valor
IgE Phl p 7***						0.0362
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.018 (0.103)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 0.60	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	0.771 (3.214)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 20.60	0	
IgE Phl p 12**						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.000 (0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 0.00	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	49	0.233 (0.755)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 4.70	0	
IgE LTP**						
Monosensibilizados a cupresáceas	34	0.000 (0.000)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 0.00	0	
Sensibilizados a cupresáceas y gramíneas	48	1.146 (5.254)	0.000 (0.000, 0.000)	0.00, 33.70	1	

*Para poder asumir normalidad se ha realizado el test de comparación de medias usando el logaritmo de la variable.

**No se ha realizado el test de comparación de medias ya que todos los pacientes del grupo de monosensibilizados a ciprés presentan valores de 0.

***Prueba de Wilcoxon

Se ha realizado un test de asociación para evaluar la posible relación entre el resultado de los distintos tests IgE y estar monosensibilizado a cupresáceas o sensibilizado a cupresácea y gramíneas. Se ha utilizado la prueba exacta de Fisher, debido a que no se cumplían las condiciones de aplicación de la prueba Chi-cuadrado (Tabla 5.19).

Tabla 5.19 Resultados test IgE en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas

		Monosensibilizados Cípcupresáceas. (n=34)	Sensibilizados cupresáceas y gramíneas (n=49)
IgE extracto a <i>C arizonica</i>			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	32 (94.1%)	49 (100.0%)
Negativo	n (%)	2 (5.9%)	
Missing	n	0	0
	p-valor	0.1649	
IgE Phl p 7			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)	1 (2.9%)	7 (14.3%)
Negativo	n (%)	33 (97.1%)	42 (85.7%)
Missing	n	0	0
	p-valor	0.1327	
IgE Phl p 12			
Total no-missing	n	34	49
Positivo	n (%)		7 (14.3%)
Negativo	n (%)	34 (100.0%)	42 (85.7%)
Missing	n	0	0
	p-valor	0.0379	
IgE LTP			
Total no-missing	n	34	48
Positivo	n (%)		4 (8.3%)
Negativo	n (%)	34 (100.0%)	44 (91.7%)
Missing	n	0	1
	p-valor	0.1378	

Por ultimo se ha comparado la positividad a IgE a LTP (rPrup p3) en ambos grupos siendo o no sensibles a algun alimento (Tabla 5.20)

Tabla 5.20 Pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas positivas a IgE LTP (Pru p 3)

		Monosensibilizados cupresáceas. Positivo IgE CAP LTP (n=0)	Sensibilizados cupresáceas y gramíneas. Positivo IgE CAP LTP (n=4)
Sensible a algún alimento			
Total no-missing	n		4
Sí	n (%)		2 (50.0%)
No	n (%)		2 (50.0%)
Missing	n		0

6. DISCUSSION

6.1 INTRODUCCIÓN

Nuestro estudio está realizado en la población de Burgos situada en la parte norte de la meseta de la península Ibérica con un clima mediterráneo continentalizado con contrastes entre el verano y el invierno, lo que hace que las polinizaciones no sean igual a otras áreas de la meseta.

La polinosis es una de la causa más frecuente de alergia respiratoria en nuestra población. De ellas y según lo recogido en estudios previos, las cupresáceas son la segunda causa en relevancia clínica tras las gramíneas. Las cupresáceas es el taxón alergénico que con más cantidad esta en nuestra atmosfera y aparece principalmente en los meses de invierno. Es la causa de las polinosis en estos meses continuándose algunos años en la primera mitad de la primavera

Los pacientes alérgicos al polen de cupresáceas estudiados con la metodología convencional o tradicional, presentan frecuentemente sensibilizaciones a otros pólenes, como ocurre en otras zonas de la península Ibérica. En este contexto, los profesionales nos enfrentamos a menudo con el reto de establecer un diagnóstico lo más certero y preciso posible, reto a veces complejo en su consecución.

La medicina personalizada o de precisión, es un acercamiento al desarrollo de terapias más seguras y efectivas individualizadas, basadas en un conocimiento más profundo de los mecanismos de una enfermedad y las características particulares de cada paciente.

La definición de Medicina de Precisión dada por Passalacqua et al. (Passalacqua G, 2015) podría ser reasumido como un "modelo estructural dirigido a la personalización de la asistencia sanitaria, con decisiones médicas y productos adaptados a un paciente individual en un nivel muy detallado." El lema de la medicina de precisión podría resumirse en "prescribir el tratamiento óptimo para el paciente adecuado".

La medicina de precisión está cada vez más reconocida como el camino a seguir para optimizar la atención al paciente. Introducida en el campo de la oncología, ahora se considera de gran interés en otros ámbitos médicos como la alergia y las enfermedades crónicas de las vías respiratorias, que se enfrentan a una necesidad urgente de mejorar el nivel de control de la enfermedad, mejorar la satisfacción de los pacientes y aumentar la eficacia de las intervenciones preventivas. Se espera que la combinación de atención

personalizada, predicción del éxito del tratamiento, prevención de la enfermedad y participación del paciente en la elaboración del plan de tratamiento haga más eficaz el enfoque terapéutico para las personas que sufren de enfermedades crónicas incapacitantes. Dados los datos emergentes sobre el impacto de la estratificación del paciente en los resultados del tratamiento, se están estableciendo consensos sobre la posición y la implementación gradual de los principios de la medicina de precisión, dentro de los algoritmos existentes para el tratamiento de las enfermedades alérgicas y crónicas de las vías respiratorias (rinosinusitis, rinitis y asma). (Hellings PW, 2017) (Fritzsching B, 2017)

En las enfermedades alérgicas, se han utilizado desde hace tiempo los principios de la medicina de precisión, en particular para los pacientes que reciben ITE. La ITE está adaptada al perfil de sensibilización del paciente y tiene un efecto preventivo de larga duración. La ITE representa un modelo óptimo de terapias personalizadas porque los agentes etiológicos responsables del cortejo sintomatológico se describen a nivel molecular. (Canonica GW, 2015). (Passalacqua G, 2015). Aunque esto es una tecnología que debemos desarrollar muchos más.

Durante la última década se han realizado considerables avances en alergia: un mejor conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades alérgicas y del impacto inmunológico de las terapias; avances tecnológicos que permiten una detección más precisa de los componentes alérgicos individuales; una mejor comprensión de la relación entre resultados de IgE específica, resultados de las pruebas in vivo y conjuntos de datos que permiten un mejor diagnóstico clínico de la alergia.

En la medicina de precisión aplicada a la alergología, el diagnóstico molecular por componentes es un instrumento básico para diagnosticar a los pacientes, valorar su tratamiento ideal y los riesgos que pueden presentar de él.

Cup a 1 es uno de los alérgenos mayores de las cupresáceas y se ha consensuado como componente molecular marcador de la alergia a estas plantas (Matricardi PM, 2016)

Con este trabajo hemos querido valorar en nuestra población la idoneidad de nCup a 1 como marcador de alergia a cupresáceas para incluirlo en futuros algoritmos diagnósticos orientados hacia la elección de los tratamientos adecuados, principalmente

la inmunoterapia, y así aplicar los principios de la medicina de precisión en nuestros pacientes alérgicos.

6.2 INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS AEROBIOLÓGICOS

Los datos de polen se han obtenido por recuento de las muestras diarias polínicas recolectadas con un captador volumétrico tipo Hirst (Burkard) y analizadas usando la metodología estandarizada del Comité de Aerobiología de la SEAIC. Desde el punto de vista clínico el conocimiento de los niveles atmosféricos de los pólenes alérgicos, su estacionalidad, variabilidad anual o interanual, es una información valiosa para la planificación de tratamientos y actividades de los pacientes alérgicos (Subiza, 2001).

Hemos analizado los niveles atmosféricos de los taxones Cupressaceae/Taxodiaceae (cupresáceas) y de Poaceae (gramíneas) por su relevancia en este estudio desde 2001 a 2016 obteniendo una muestra de 16 años que nos parece muy significativa para obtener conclusiones. Es necesario conocer la evolución en el tiempo para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en el periodo de estudio. Es bien conocido que las concentraciones de polen atmosférico presentan gran variabilidad a lo largo del tiempo, en horas, días, estaciones y años; siendo necesario disponer de varios años de datos para calcular los valores de los Periodos Principales de Polinización y evidenciar los cambios en sus tendencias. Además, hemos analizado gráficamente las polinizaciones de los años 2001 a 2016 de los taxones *Olea*, *Plantago* y *Platanus* por los resultados de las SPT de nuestros pacientes.

6.2.1 Taxón Cupressaceae/Taxodiaceae

6.2.1.1 Recuentos

En la figura 5.1 se ven los recuentos superpuestos de los años 2001 a 2016 y mejor en la figura 5.2 en la que hemos suprimido los valores por encima de 1000 granos/m³, donde se puede apreciar de forma gráfica que la mayoría de los recuentos se producen de enero a mediados de abril.

Es el taxón más representativo en los recuentos de Burgos casi todos los años como se ve en la figura 5.3 con los porcentajes anuales de los años 2001 a 2016

Los niveles atmosféricos expresados como granos/m³ y año durante el periodo de estudio, años 2001 a 2016, alcanzan un valor mínimo total que se sitúa en el año 2013

con 956 granos/m³, y un máximo en el 2011 con 23924 granos/m³ (Figura 5.4). Sin duda, la climatología local tiene una clara influencia en los índices polínicos atmosféricos, siendo una de las causas de la variabilidad interanual.

Hay mucha diferencia, al igual que en los valores anuales totales en los recuentos máximos (valor pico) de cada año que oscilan entre 156 granos/m³ de 2013 al de 7210 granos/m³ de 2011 (figura 5.5). Casi todos estos días picos fueron entre los meses de enero a marzo, salvo un año que fue en mayo.

6.2.1.2 Periodo Principal de Polinización de cupresáceas: Periodo de máxima producción de polen Cupressaceae/ Taxodiaceae

La duración de la polinización, según el método Persson y Nilsson, también es muy variada entre 54 y 262 días con una media aproximada de 110 días (Tabla 5.1). Con los datos del Periodo Principal de Polinización la mayoría de los años la polinización comienza en enero, sobre todo y febrero, y menos frecuentemente en noviembre y diciembre. Donde encontramos más variación es en el fin de la polinización. Durante 10 años ocurre en marzo y más en abril, pero en el resto se alarga finalizando en mayo, junio hasta dos años en agosto. Estos años con finales tan tardíos, coinciden con los años en que ha durado más la polinización, en incluso con en el que el día pico fue en mayo (2010). Asociamos esta variabilidad a las condiciones atmosféricas. También relacionamos estas polinizaciones a la familia *Juniperus communis* (Enebro común) que florece de marzo a junio e incluso julio y *Juniperus Thurifera* (Sabina albar) que florece de marzo a mayo (García López, Allué Camacho, 2004). El viento puede trasportar el polen a distancias de cientos de kilómetros y en nuestra provincia hay numerosos enebrales y sabinares a una distancia en línea recta entre 30 y 45 Km. Los datos obtenidos son similares a los recogidos por otras estaciones aerobiológicas de la SEAIC (Moral de Gregorio, 2016).

6.2.2 Recuentos de los taxones Poaceae (gramíneas). Periodo Principal de Polinización

Analizamos la polinización de las gramíneas por ser la sensibilización más frecuente añadida a la de nuestros pacientes alérgicos a cupresáceas y que nos ha servido para fenotiparlos (Figura 5.6).

Como el método de Persson y Nilsson (Tabla 5.2) determinamos que el inicio de la polinización es en mayo, en la mayoría de los años (11 años) en la primera quincena de mayo y el final es variable entre la primera y segunda quincena de julio.

La duración de la polinización es de una media de 62 días. Los días picos varían entre la segunda quincena de mayo y la primera de junio, con algún año a principios de julio.

6.2.3 Comparativa de los Periodos Principales de Polinización de cupresáceas y gramíneas

Comparando los Periodos Principales de Polinización de los taxones Cupressaceae/Taxodiaceae (cupresáceas) y Poaceae (gramíneas) vemos que están separados en el tiempo, las cupresáceas de enero a abril y las gramíneas de mayo a julio.

En la figura 5.7 podemos apreciar la comparación entre las concentraciones medias diarias de los taxones Poaceae (gramíneas) y Cupressaceae/Taxodiaceae (cupresáceas) de los años 2001-2016 en la que vemos de forma gráfica la diferencia en las épocas de polinización. Los periodos principales de polinización están separados salvo en el final de Cupressaceae/Taxodiaceae que se solapa algún año con la polinización de gramíneas, aunque con escasos recuentos de polen.

Esto nos lleva a la importante conclusión que los pacientes pertenecientes al fenotipo positivo para Cup a 1 y Phl p 1/5 presentan una cosensibilización a los dos grupos de pólenes, cupresáceas y gramíneas sin interferencia en su sintomatología por la demostrada separación que hay en los periodos de polinización.

6.2.4 Recuentos de los taxones *Plantago*, *Oleaceae* y *Platanus* de los años 2001-2016

6.2.4.1 *Plantago*

La polinización del taxón *Plantago* se aprecia en la figura 5.8 que se inicia simultáneamente a la de gramíneas en mayo, también coincidiendo la época principal en mayo y junio, similar a lo descrito por otros autores (González-Parrado Z, Valencia-Barrera RM 2014) y persistiendo algo más hasta agosto. No precisa de grandes concentraciones en la atmosfera para ser sintomático como referimos antes (nivel de alerta medio 10-50 gr/m³). Habría que valorar la presencia de Pla 1 1 en la atmósfera para determinar su relevancia (existen pocos pacientes monosensibilizados) ya que no

solo depende del polen de *Plantago* sino también del polen de otras especies de la familia Oleaceae (González-Parrado Z, Fernández-González D, 2014).

6.2.4.2 Familia Oleaceae

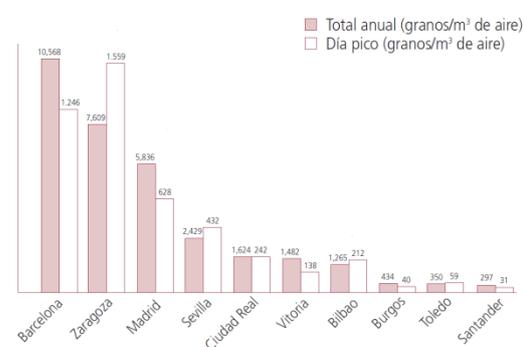
La polinización del taxón *Olea* en nuestra atmosfera es muy escasa en relación con la de otras zonas donde tiene relevancia clínica. La época de polinización se aprecia en la gráfica 5.9 que es mayo y primera mitad de junio, no coincidiendo con la de las cupresáceas.

Analizamos la polinización del taxón *Fraxinus* de los años 2011-2016 por la reactividad cruzada (comparten alérgenos) entre Fresno y Olivo y por qué es un polen que poliniza en invierno-primavera (Figura 5.11). Como se aprecia en la figura 5.10 y 5.11 la polinización es escasa. Separamos el año 2015 (Figura 5.12) porque en ese sí que hay un pico de 2 días en mayo con niveles atmosféricos altos (370 y 230 gr/m³), desconociendo la causa de ello. Salvo en tres años, en resto el polen de *Fraxinus* no supuso más del 1% de todos los pólenes observados y los días picos fueron menores a 30 granos/m³ salvo en 2015. En las localidades con totales anuales superiores a los 300 g/m³ de *Fraxinus* las máximas diarias se sitúan entre los 30-50 granos/m³ que son las que pueden provocar síntomas (Moral de Gregorio, 2016). Nosotros solo tenemos 2 años (2012 y 2015) con recuentos totales mayores de 300 (426 y 799 respectivamente). Solo en el 2015 se alcanzaron, como hemos comentado antes, dos días con recuentos muy altos y dos días más también entre mayo y junio con recuentos sobre 30 granos/m³ (Figura 5.12)

6.2.4.3 Platanus

La polinización de *Platanus* ocurre a principio de la primavera, pero con unas cantidades pequeñas en la atmosfera de nuestra área. El nivel de este polen a partir del cual se considera capaz de producir síntomas, a los sujetos sensibilizados, se sitúa de forma orientativa a partir de 50-130 gr/m³ de aire, lo cual se alcanza en pocos días (figura 5.13). En la figura 5.14 se representa los días pico, estando estos en su mayoría por debajo de los 50 granos/m³.

Figura 6.1 Platanus. Comité de Aerobiología SEAIC de 2003



En la figura 6.1 del estudio del Comité de Aerobiología de 2003, se puede ver los recuentos de pólenes de *Platanus* en el 2003, expresados como totales anuales y día pico; observándose la correlación significativa entre ambas variables y la gran diferencia de los recuentos de Burgos con otras ciudades.

6.2.5 Interpretación de la Polisensibilizaciones

Enfrentados estos datos a los resultados de las SPT nos encontramos que nuestros pacientes en un porcentaje alto están sensibilizados a pólenes de gramíneas pero su polinización no coincide con la de las cupresáceas por lo que atribuimos está a una cosensibilización. Misma situación, aunque en un número mucho menor de pacientes sensibilizados, es la del *Plantago*. El *Plantago* tiene su polinización superpuesta a las gramíneas, por lo que no coincide con la de las cupresáceas. Se ha descrito la reactividad cruzada entre los pólenes de *Plantago* y los de *Olea* y gramíneas (Tormo 2010) (Palomares O, 2005) (Asero R, 2000) (Sousa R, 2014) y la presencia de Pla 1 en las atmosfera con las oleáceas (Gonzalez-Parrado Z, 2014).

En relación con la sensibilización a *Olea* también vemos en su periodo de polinización que no coincide con el de las cupresáceas además que su presencia en la atmosfera es en unas cantidades muy pequeñas. Sobre otra oleácea como es el *Fraxinus*, que poliniza entre invierno y primavera, vemos que también que los recuentos, salvo de forma excepcional, son bajos. Hay algunos autores que han referido una posible reactividad cruzada entre los pólenes de cupresáceas y *Olea* (Guerra F, 1996) y en el estudio del Comité de Aerobiología de la SEIAC en 2003 por área de la púpula.

Muy pocos pacientes, en número de 6, estaban sensibilizados a *Platanus*. Aunque se ha descrito que la presencia de Pla a 1 en la atmósfera parece ser independiente de los recuentos de polen de *Platanus* durante el mismo período, tampoco coincide este aeroalérgeno con la polinización de cupresáceas, si en cambio con *Quercus*, *Betula* o la familia Salicaceae (Fernández-González D, 2010). La baja presencia atmosférica, el escaso número de pacientes, la época de polinización en Burgos (corta y separada de las cupresáceas) y el estudio del Comité de Aerobiología del 2003 nos hacen pensar que las sensibilizaciones a *Platanus* no son relevantes para nuestro trabajo.

Por lo tanto, pensamos que las sensibilizaciones a Oleáceas y *Platanus* son también debidas a una cosensibilización o la reactividad cruzada que por las características

aerobiológicas de nuestra área (periodo de polinización y cantidad en recuentos de polen atmosférico) no interfiere en los resultados de nuestro trabajo.

6.3 VALORACIÓN DE LA APORTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR COMPONENTES MOLECULARES EN LA PRECISIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA AL POLEN DE CUPRESÁCEAS. nCup a 1 COMO MARCADOR DE SENSIBILIZACIÓN GENUINA A CUPRESÁCEAS.

No hay duda que la herramienta principal para evaluar las reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por IgE es la historia del paciente. Los síntomas compatibles con una reacción alérgica sumados a otros factores, como en el caso de la polinosis el ambiente en el que vive, nos orientan hacia un correcto diagnóstico. Las SPT pueden proporcionar información inmediata acerca de la presencia de sensibilización IgE a alérgenos específicos (Bousquet J, 2012). Las pruebas de IgE específica en suero pueden probar sensibilización a extractos alérgicos completos o a componentes alérgicos individuales (Stiefel G, 2012). El inconveniente de las pruebas de sensibilización IgE es que informan de la presencia de IgE específica (sensibilización), no de la presencia clínica de alergia. Sin embargo, cuando son utilizadas por médicos formados en su interpretación en el contexto de una historia clínica completa, son útiles para apoyar el diagnóstico clínico de alergia e identificar los alérgenos causantes de la reacción (Roberts G, 2016).

Nosotros partimos de unos criterios de inclusión que son pacientes diagnosticados en nuestra sección por nosotros con historia clínica de rinoconjuntivitis y/o asma en los meses de polinización de cupresáceas junto con unas SPT positivas a *C arizonica* como a *C sempervirens*. Al analizar la correlación entre las SPT, tanto a *C arizonica* como a *C sempervirens*, y nCup a 1 la correlación es estadísticamente significativa. Por esta razón podemos establecer a nCup a 1 como marcador de sensibilización a polen de cupresáceas en nuestra población.

Con estos resultados avalamos el tamaño de nuestra muestra y los criterios de inclusión que han sido los adecuados para este estudio.

Concluimos que, en nuestra población, la positividad a nCup a 1 es suficiente para el diagnóstico de la alergia a cupresáceas no precisando analizar otros alérgenos de cupresáceas en el momento actual. Nuestra conclusión es igual a la obtenida por Dominguez y col. (Dominguez-Ortega, 2016).

Nos encontramos que los coeficientes de correlación entre *C arizonica* o *C sempervirens* y Cup a 1 son relativamente bajos, tal y como se ve en la tabla 5.12. Pensamos que una de las explicaciones a que los coeficientes de correlación sean relativamente bajos es debido a la variabilidad del prick-test, que como hemos comentado antes, depende de varios factores. Aparte de los técnicos (homogeneidad de los extractos alérgicos), depende de la respuesta biológica del paciente que esta puede ser cambiante: en los pacientes polínicos, la reactividad es mayor en su estación polínica y justo después de ésta (Eriksson NE, 1996) (Oppenheimer JJ, 1993). El contenido proteico del polen de *C arizonica* es muy variable dependiendo cuando se ha recogido, pudiendo repercutir en la calidad de los extractos para SPT (Shahali Y, Allergy, 2009).

6.4 RELACIÓN ENTRE PRUEBA CUTÁNEA A *C arizonica*, sIgE a *C arizonica* e IgE a nCup a 1

Encontramos que todos los pacientes menos 1 con pruebas cutáneas positivas a extracto completo de *C arizonica* estaban sensibilizados a Cup a 1. Esto nos da pie a concluir que nuestros pacientes alérgicos a cupresáceas están sensibilizados a Cup a 1 independientemente que lo puedan a otros alérgenos de este polen. Los valores de IgE para Cup a 1 son mayores que para el extracto completo de *C arizonica*. 2 pacientes positivos para Cup a 1 fueron negativos al extracto completo lo que nos hace pensar que la totalidad de su sensibilización era a Cup a 1.

Valoramos la correlación entre las técnicas diagnósticas convencionales en la alergia al polen de cupresáceas (SPT e IgE frente a extractos completos de *C arizonica*) y la sensibilización a nCup a 1 (componente molecular)

La relación entre la IgE al extracto de *C arizonica* y nCup a 1, además de estadísticamente significativa, alcanza un nivel de correlación muy alto (0.977). Debido al reducido número de pacientes con resultado negativo en ambos test, el grado de

concordancia entre ambos diagnósticos, medido por el índice Kappa, da un valor de 0.492. También la correlación es buena, aunque menor que la anterior entre ambas SPT: *C arizonica* y *C sempervirens*.

Entre la IgE al extracto de *C arizonica* y la SPT, tanto a *C arizonica* como a *C sempervirens*, la correlación es estadísticamente significativa, aunque los coeficientes de correlación son relativamente bajos, tal y como se ve en la tabla 5.12. Sin embargo, entre ambas SPT la correlación es alta, aunque al no disponer de negativos en la variable la estimación de la Kappa no es posible.

6.5 PUNTOS ÓPTIMOS DE CORTE EN EL DIAGNÓSTICO TRADICIONAL

Utilizando como Gold Estándar un valor de Cup a 1 positivo de 0.35 kU/L hemos establecidos puntos de corte para la IgE a extracto de *C arizonica* como de las SPT.

6.5.1 Puntos de corte SPT *C arizonica*

El punto de corte óptimo estimado es de 4 mm. Aquellos pacientes con prueba cutánea a *C arizonica* superior a 4 mm de diámetro de la pápula se consideran positivos. El corte óptimo presenta una sensibilidad del 89.4% y una especificidad perfecta.

6.5.2 Puntos de corte SPT *C sempervirens*

El punto de corte óptimo estimado es de 5 mm. Aquellos pacientes con prueba cutánea a *C sempervirens* superior a 5 mm de diámetro de la pápula se consideran positivos. El punto de corte óptimo presenta una sensibilidad del 77.7% y una especificidad perfecta

6.5.3 Puntos de corte sIgE a extracto de *C arizonica*

Para la IgE a extracto de *C arizonica* el punto de corte óptimo con una sensibilidad y especificidad del 100% es considerar a los pacientes ≥ 0.23 kU/L positivos, ya que nos discrimina perfectamente los negativos y positivos del IgE Cup a 1.

6.6 FENOTIPO DE LOS PACIENTES ALÉRGICOS A CUPRESÁCEAS EN NUESTRA ÁREA

6.6.1 Datos sociodemográficos

La edad de diagnóstico fue similar a lo informado en otras series (Bousquet, 1993) (Charpin, 2000), la mayoría por encima de los 18 años con edades mayores que en otros pólenes. Ya se han descrito por estos autores que es probable que requieren intervalos de exposición a cupresáceas mucho más prolongados antes de desarrollar la polinosis y por eso desarrollan la enfermedad a una edad más tardía, como lo referido por Castillo Marchuet (2016). También el grupo de edad se acerca a lo informado por Díaz de la Guardia (2006) en el que el grupo más sensible es entre los 20 y 40 años. Nosotros encontramos a la mayoría de los pacientes en un abanico más amplio, entre los 10 y 50 años.

En cuanto al sexo predominó el femenino a diferencia de trabajo de Granada en que los porcentajes eran similares entre hombres y mujeres (Díaz de la Guardia, 2006)

6.6.2 Características clínicas

Todos los pacientes padecían rinitis y casi todos asociaban conjuntivitis. No hay pacientes que refieran solo conjuntivitis, aunque si la describen como síntoma inicial e intenso con frecuencia (dato no registrado en el estudio). 35 pacientes (36.5%) asociaban asma bronquial, que es un porcentaje alto en comparación con otros trabajos en la que referían la alergia a cupresáceas con baja incidencia de patología bronquial, menos del 20% (Ramírez DA, 1984) (Di Felice G, 1994). Dominguez y col un 47.7% (Dominguez-Ortega, 2016). Otros como García BE y col. en 75 pacientes españoles encuentran un 55% de asmáticos (García BE, 2016) y Caballero en Madrid encuentra asma en 80% de los sensibilizados a cupresáceas, pero la mayoría se trataba de pacientes sensibilizados a otros pólenes (Caballero T, 1996)

En cuanto a la alergia alimentaria cabe destacar que fue escasa a vegetales, ninguna en monosensibilizados como en otras series (Panzani, 2010) Solo 3 pacientes de los cosensibilizados a gramíneas estaba sensibilizado a LTP, lógicamente con alergia a frutas rosáceas ya que usamos extracto de melocotón para su diagnóstico en SPT, aunque con el recombinante Pru p 3 teníamos uno más. También estaban sensibilizados a LTP 2 de los 3 que alérgicos a frutos secos.

En conclusión, podríamos describir a nuestros pacientes con que la alergia polen de cupresáceas en nuestra población es una polinosis de inicio tardío con predominio del sexo femenino. Todos tiene síntomas nasales y casi todos asocian oculares y hay un alto porcentaje de asmáticos en comparación con la polinosis de otros pólenes de arboles.

6.6.3 Resultados de SPT

En relación a las SPT en prick las medias del diámetro de pápula fueron mayores para *C sempervirens* (7.7 mm) en relación a *C arizonica* (6.8 mm) y *J oxycedrus* (6.1 mm). En el trabajo de Moral de Gregorio A y col, los resultados son similares para *C arizonica*. Existe una alta reactividad cruzada entre *C arizonica* y otras cupresáceas ya que todos los pacientes eran positivos a los extractos de los 3 pólenes testados con diámetros de pápula similares (Moral de Gregorio A, 2003).

Obtuvimos unos resultados similares a Bousquet (23-33%) (1993) en pacientes monosensibles a cupresáceas (nosotros 27%), menor que Ramírez un 34% (1984) pero mayores el relación al trabajo de Granada (12.5%) (Díaz de la Guardia C, 2006) y el de Charpin (17%) (2000). Dominguez-Ortega (2016) tienen un 88% de polisensibilizados en su estudio de alérgicos a coníferas en Madrid.

6.7 DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS (UNA ÚNICA SENSIBILIZACIÓN ALERGÉNICA) /POLISENSIBILIZADOS A OTROS PÓLENES Y CUALES SON.

6.7.1 Identificación de las sensibilizaciones según los resultados de SPT

El 65% de los pacientes estaba sensibilizado en SPT a polen de gramíneas. Esto está en concordancia con anteriores trabajos en nuestra zona que refieren que es el polen al que más frecuentes están sensibilizados los pacientes polínicos. Tal y como hemos registrado en las gráficas de polinización y en los PPP, las épocas de polinización son diferentes, por lo que no pensamos que interfieren en los datos de nuestro estudio.

Otras sensibilizaciones a pólenes han sido a Olivo, *Plantago* y *Platanus* y como hemos comentado anteriormente, no pensamos que interfieran en nuestro estudio.

Con estos resultados obtenemos dos poblaciones clínicamente relevantes que serían los alérgicos al polen de cupresáceas monosensibilizados o cosensibilizados a polen de gramíneas

Sobre la sensibilización a otros aeroalérgenos cabe destacar la de animales, en especial el gato y ácaros del polvo. Nuestros pacientes no presentaban síntomas perennes (en caso de sensibilización y contacto con animales) por lo que estos datos no interfieren en nuestro estudio. Similares datos encontramos en la sensibilización a *Alternaria* que en nuestra zona se manifiesta con síntomas también perennes y/o con agravamiento en los meses de verano.

6.7.2 Monosensibilización y cosensibilización según nCup a 1/Phl p1-5

En base a la positividad a la IgE a nCup a 1, Phl p1 y Phl p5 se registran dos fenotipos como los más frecuentes. Uno es de pacientes monosensibilizados a cupresáceas y el segundo sería el de pacientes cosensibilizados a cupresáceas y gramíneas. El 41% estaba monosensibilizados a cupresáceas, lo cual es un porcentaje muy alto en comparación a las series comentadas anteriormente y que se puede explicar por las características de la población incluida: alérgicos a cupresáceas.

6.7.3 Caracterización de los pacientes.

Segun la positividad a la IgE a nCup a 1, Phl p1 y Phl p5, hemos caracterizado a los pacientes en varios grupos (Tabla 5.14) siendo el más abundante de ambos grupos (monosensibilizados y cosensibilizados) el que asocia cosensibilizaciones a otros aeroalérgenos: pólenes y otros alérgenos (epitelios, ácaros, *Alternaria* y látex).

6.8 EVALUACIÓN LA SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA.

6.8.1 Comparativa en las pruebas diagnósticas según los dos fenotipos

Comparamos varias pruebas diagnósticas entre los dos fenotipos

6.8.1.1 Comparativa de las SPT (tabla 5.17)

En las SPT (SPT) no encontramos diferencias entre los dos grupos salvo leves en las SPT de Polcalcina

Los monosensibilizados a Cupressus no lo están a profilina ni a LTP.

6.8.1.2 Comparativa de las IgE específicas (tablas 5.18 y 5.19)

Con la aplicación de recombinantes tenemos una mayor sensibilidad que con las SPT definiendo mejor los fenotipos de los pacientes.

Los resultados son similares a las SPT, los pacientes sensibilizados a LTP y profilina son los del fenotipo con cosensibilización a gramíneas

Por otra parte, nos encontramos valores superiores de la IgE específica el extracto de *C arizonica* y Cup a 1 en pacientes con cosensibilización a gramíneas

Similar resultado que en las SPT cuando analizamos el recombinante de Polcalcina (Phl p 7)

6.8.2 Valoración de los resultados de la sensibilización a alérgenos de reactividad cruzada

6.8.2.1 Profilina

Tanto en las SPT como cuando usamos en diagnóstico molecular vemos que todos los pacientes sensibilizados a Profilina están a polen de gramíneas, con una frecuencia del 8.4% del total de los pacientes y del 14.3% de los cosensibilizados a gramíneas. Esto es lógico para los alérgicos a cupresáceas ya que solo se ha descrito una Profilina en este taxón y es de *C sempervirens*, Cup s 8 (Barderas R, 2004).

Aunque no se ha determinado esta proteína, la alta homología entre las profilinas (75%) nos permite usar la SPT (extracto de polen de Palma) y Phl p 12 como herramientas de diagnóstico de este panalérgeno.

Por lo tanto, pensamos que las sensibilizaciones encontradas a profilina no son debidas a la alergia a cupresáceas.

6.8.2.2 Polcalcina

En relaciona a la Polcalcina, ha sido positiva utilizando la prueba cutánea como el componente molecular Phl p 7.

Nosotros encontramos 11.6 % (n:11) en SPT y un 9.6% (n:8) del total de pacientes sensibilizados a Phl p7. Cabe destacar que uno de estos pacientes, con SPT positivo y sensibilizado a Phl p 7 no lo estaba a gramíneas (Phl p1 y/o Phl p5)

Tinghino R y col (2002), informan que debido a la alta reactividad cruzada de Phl p 7 lo podemos usar como marcador de sensibilización a Polcalcina por su homología con otras proteínas ligadoras de calcio como Jun o 4. Cup a 4 tiene una elevada identidad de secuencia con Jun o 4.

Pico de Coaña y col. (2010) encuentran IgE frente a Cup a 4 en un 9.6% de los pacientes alérgicos a *C arizonica* dato similar al nuestro cuando usamos Phl p7.

6.8.2.3 LTP

Se ha determinado la sensibilización a LTP utilizando LTP de melocotón en SPT siendo positiva en 3 pacientes y con Pru p 3 que ha sido positiva en 4 pacientes. De ellos 2 estaban sensibilizados a alimentos y los otros 2 no (Tabla 5.20). Al igual que con la profilina, eran pacientes del fenotipo con cosensibilización a gramíneas. Pensamos que el resultado es muy pequeño para tenerlo en cuenta, aunque se ha descrito en *C arizonica* un alérgeno similar a la LTP con alergia a melocotón (Sanchez-Lopez J, 2011).

6.8.3 Determinantes de los carbohidratos de reactividad cruzada–CCD

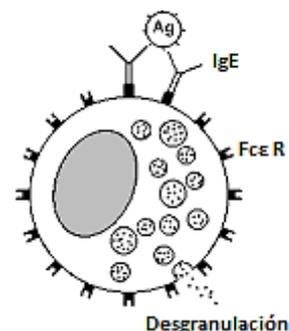
Hasta la fecha, no hay un procedimiento eficiente para clonar y expresar alérgenos recombinantes de cupresáceas en las plataformas de diagnóstico por componentes actuales, y como consecuencia, se usan las formas naturales (alérgeno natural purificado o nativo nCup a 1) con la posible, según autores, falta de especificidad debido a los CCD. En la interpretación de estos resultados, se ha propuesto tener en cuenta otras moléculas glicosiladas tales como nJug r 2, nPhl p 4 o el CCD MUXF3 (Barber D, 2015). Las pruebas de detección de alergia que utilizan varios alérgenos en un único ensayo de IgE (microarrays) son particularmente propensos a la interferencia por CCD.

Hace unos años en relación a *C arizonica*, varios autores comentaron la posible implicación de los CCD en los síntomas alérgicos (Iacovacci P, 2002) y sobre todo en que podrían influir, como panalérgenos como la profilina, en el diagnóstico in vitro e in vivo y en las estrategias de ITE (Afferni C, 1999). Lo que parece claro según los últimos estudios y después de más de 15 años de su conocimiento, es que el papel de los

CCD como responsables de reactividad cruzada clínicamente relevante es controvertido (Vidal C, 2012) (Panzner P, 2014) (Altman, 2016).

Los test in vitro para determinar la IgE son propensos a reactividad cruzada porque los anticuerpos IgE están libres para moverse en el suero y pueden unirse a cualquier estructura compatible en el extracto del ensayo. Por el contrario, las pruebas en las que intervienen células (SPT/test de activación de basófilos) son menos propensas a la reactividad cruzada debido a que la activación celular necesita la presencia de dos pares adyacentes y compatibles de epítomos e IgE. Muchas glicoproteínas contienen un único determinante carbohidratado con reactividad cruzada capaz de fijar IgE, por lo que no sería posible el efecto de puenteo de dos moléculas de IgE acopladas a la membrana celular necesario para inducir la liberación de mediadores por parte de mastocitos y basófilos (Figura 6.2). En

Figura 6.2 Mastocito y su activación en la reacción alérgica tipo I



consecuencia, los resultados diagnósticos derivados de la reactividad CCD deben ser clasificados como falsos positivos en los análisis in vitro de la IgE específica y su escasa (si es que la hay) relevancia clínica. (Fötisch K, 1999) (Van Ree R, 2002) (Malandain H, 2004) (Malandain H, 2005) (Malandain H, 2007) (Mari A, 2008) (Altman F, 2007)

Como solución a este problema se ha propuesto varias opciones (Altman, 2016):

1. Test in vivo, tales como el SPT o la prueba de provocación con alimentos controlada con placebo.
2. Pruebas in vitro tales como el test de activación de basófilos, que no se ve afectada por CCD.
3. Uso de alérgenos recombinantes.
4. Ensayos in vitro con inhibición competitiva con un inhibidor CCD específico (Pâris-Köhler A, 2000).

Como hemos comentado antes y al respecto, la guía de Alergia Molecular de la EAACI (Matricardi, 2016) se propone la determinación de la bromelina (Ana c 2) o el N-glicano

purificado de la bromelina, MUXF3, en el caso de la reactividad de IgE a polen de múltiples árboles, para descartar la posibilidad de reactividad a CCD. Al hacerlo nosotros en 17 pacientes con estas características solo obtuvimos una positividad a MUXF3 en un paciente con un valor alto (17.20 KU/L) pero también con valores altos a Cup a 1: 45,2 KU/L que no dejan duda en el diagnóstico de alérgico a cupresáceas.

No pensamos que los resultados de nuestro estudio se vean interferidos por los CCD por varias razones:

1. En la elección de pacientes se ha recogido pacientes con clínica de polinosis en los meses de polinización de las cupresáceas, sabiendo que los CCD no tiene clara relevancia clínica en la alergia al polen.
2. El otro criterio de inclusión era la positividad de prick test a *C arizonica* y/o *C sempervirens*, teniendo en cuenta que los CCD no interfieren en las SPT.
3. Teniendo en cuenta la premisa que los CCD actuarían como panalérgenos y que sería más frecuente su interferencia en los resultados de las pruebas en pacientes polisensibilizados, cuando hemos analizado los CCD a través de MUXF3 en este grupo los resultados han sido negativos salvo en el paciente anteriormente descrito.

Por lo tanto, los criterios de elección de nuestros pacientes nos ofrecen una muestra adecuada sin interferencias de los CCD a pesar que estemos analizando un alérgeno nativo

Ademas, recientemente Shahaly y col (2017) han descrito que la poligalacturonidasa Cup s 2 podría asociarse con la mayor prevalencia de reactividad de IgE a los extractos de polen de ciprés debido a la interferencia de CCD. Podría interpretarse que la interferencia de CCD la provocan las poligalacturonasas y no las pectatoliasas.

7 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente tesis permiten concluir que

1. En relación a la polinización del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae el inicio de la polinización suele ser en enero. El resto de los resultados son diferentes dependiendo del año. El final es muy variable, incluso alargándose hasta el verano, posiblemente debido a las polinizaciones de *Juniperus* muy abundantes en nuestra zona. La duración puede ser muy amplia, entre 54 y 262 según los años, aunque gráficamente se aprecia que la mayoría de los recuentos es entre enero y final de marzo. Es variable también la fecha del día y su valor pico, casi todos entre los meses de enero a marzo. Todos estos datos es probable que estén influenciados por condiciones climáticas.
2. Encontramos una gran uniformidad en la polinización del taxón Poaceae. El inicio de la polinización suele ser en la primera quincena de mayo. El final a mediados y segunda quincena de Julio. La duración es de un promedio de 61 días. Es variable la fecha del día y su valor pico.
3. Los periodos principales de polinización de los taxones Cupressaceae/Taxodiaceae y Poaceae están separado salvo en el final de Cupressaceae/Taxodiaceae que se solapa algún año con la polinización de gramíneas, aunque con escasos recuentos de polen. Con los resultados de los dos taxones podemos diferenciar ambas polinizaciones.
4. Pensamos que las sensibilizaciones a oleáceas, *Plantago* y *Platanus* son debidas a una cosensibilización o reactividad cruzada entre ellos, que por las características aerobiológicas de nuestra área (periodo de polinización y cantidad en recuentos de polen atmosférico) no interfiere en los resultados de nuestro trabajo.
5. Nuestros pacientes alérgicos a cupresáceas están sensibilizados a Cup a 1 independientemente que lo puedan a otros alérgenos de este polen. Los valores de IgE para Cup a 1 son mayores que para el extracto completo. 2 pacientes

positivos para Cup a 1 fueron negativos al extracto completa lo que nos hace pensar que la totalidad de su sensibilización era a Cup a 1.

6. Hemos validado al alérgeno nativo de *C arizonica* nCup a 1 como marcador de alergia a cupresáceas en nuestra población, como herramienta para incluirlo en futuros algoritmos diagnósticos orientados hacia la elección de los tratamientos adecuados, principalmente hacia la inmunoterapia, y así aplicar los principios de la medicina de precisión en nuestros pacientes alérgicos. Con esto nos evitamos los problemas que surgen al usar extractos completos.
7. Partiendo de la premisa que los CCD no interfieren en las pruebas in vivo (SPT en nuestro trabajo) y que tienen escasa relevancia clínica, seguimos las recomendaciones de la guía de alergia molecular de la EAACI sobre analizar los CCD, con la determinación de MUFX3 en pacientes con polisensibilizaciones a pólenes de árboles. Obteniendo solo positividad en un paciente que presentaba altos niveles en Cup a 1. La elección de nuestros pacientes ha sido la de una muestra adecuada sin interferencias de los CCD a pesar que estemos analizando un alérgeno nativo.
8. Los pacientes sensibilizados a polen de cupresáceas del estudio se caracterizaron por presentar un debut tardío con predominio del sexo femenino. Todos tiene síntomas nasales y casi todos asocian oculares. Hay un alto porcentaje de asmáticos (36.5%) en comparación con la polinosis de otros pólenes de árboles.
9. En base a los resultados de las SPT y usando los componentes moleculares (Cup a 1, Phl p 1 y Phl p 5) obtenemos dos poblaciones clínicamente relevantes que serían los alérgicos al polen de cupresáceas monosensibilizados y los cosensibilizados a polen de gramíneas. El 41% estaba monosensibilizados a cupresáceas, lo cual es un porcentaje muy alto en comparación a las series comentadas anteriormente y que se puede explicar por las características de la población incluida: alérgicos a cupresáceas.

10. En relación a las sensibilizaciones a alérgenos de reactividad cruzada profilina, polcalcina y LTP, encontramos que:
- a. Los monosensibilizados a cupresáceas no lo están a profilina ni a LTP.
 - b. En relación a la polcalcina, encontramos un 11.6 % en SPT y un 9.6% del total de pacientes sensibilizados a Phl p7 incluyendo monosensibilizados

8 INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

8.1 RELACION DE LAS TABLAS RESEÑADAS EN EL TEXTO

INTRODUCCIÓN

1.1 Principales Moléculas alergénicas de árboles.....	34
1.2 Principales moléculas alergénicas de las malezas.....	36
1.3 Valoración de la exactitud diagnóstica de ImmunoCAP ISAC 112 en alergia al polen.....	55
1.4 Niveles orientativos de alerta en granos/m ³ (SEAIC).....	63
1.5. Alérgenos de Cupressaceae y Taxodiaceae en relación con su actividad biológica, peso molecular en kDa y porcentaje de homología comparado con la secuencia de Cup a1, Jun a 2 o Cup a 3 respectivamente.....	90

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Medicación a evitar previa a la realización de los test cutáneos.....	107
4.2 Batería de alérgenos para las pruebas cutáneas.....	109
4.3 Batería accesoria de alérgenos de árboles y malezas.....	109
4.4 Batería de alérgenos específicas del estudio.....	110

RESULTADOS

5.1 Datos del Periodo Principal de Polinización de Cupresaceae/Taxodiaceae 2001-2016.....	123
5.2 Datos del Periodo Principal de Polinización de Poaceae 2001-2016.....	125
5.3 Edad.....	130
5.4 Descriptiva de las pruebas cutáneas SPT.....	132

5.5: Otras sensibilizaciones a aeroalérgenos diferentes a las gramíneas.....	132
5.6: Cosensibilizaciones a alérgenos alimentarios.....	133
5.7: Sensibilizaciones a frutas.....	133
5.8: Descriptiva de la IgE.....	134
5.9 Determinación de MUXF3 en pacientes polisensibilizados a pólenes de arboles.	135
5.10 Determinación de MUXF3 en nuestro servicio.....	135
5.11 Relación entre la IgE a extracto total y las pruebas cutáneas de cupresáceas y nCup a 1 dos a dos	136
5.12 Relación IgE al extracto completo con prueba cutánea e IgE a Cup a 1.....	138
5.13: Comparación de las diferentes AUC 2 a 2.....	143
5.14 Caracterización de los pacientes.....	144
5.15 Pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas.....	145
5.16 SPT en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas.....	146
5.17 Resultados test SPT en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas.....	147
5.18 IgE en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas.....	149
5.19 Resultados test IgE en pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas.....	151
Tabla 5.20 Pacientes monosensibilizados a cupresáceas o sensibilizados a cupresáceas y gramíneas positivas a IgE LTP (Pru p 3).....	152

8.2 RELACION DE LAS FIGURAS RESEÑADAS EN EL TEXTO

INTRODUCCIÓN

1.1 La reacción de hipersensibilidad tipo I o alérgica.....	21
1.2 Localización de la provincia de Burgos en la Península Ibérica.....	26
1.3 Grano de polen maduro.....	29
1.4 Formación del tubo polínico.....	30
1.5 Marcadores de diagnóstico y alérgenos de reactividad cruzada de polen de árboles.....	38
1.6 Inmunoanálisis en fase sólida para la cuantificación de IgE específica.....	48
1.7. Distribución mundial de la alergia a polen de cipres.....	66
1.8 Plantaciones forestales en Castrojeriz (Burgos).....	68
1.9 Fruto de <i>Cupressus arizonica</i>	68
1.10 <i>Cupressus leylandii</i>	68
1.11 <i>Cupressus sempervirens</i>	68
1.12 Distribución del enebro de la miera <i>Juniperus oxycedrus</i> L subsp. <i>badia</i> . en la provincia de Burgos.....	70
1.13 Distribución del enebro de la miera <i>Juniperus oxycedrus</i> L. subsp. <i>oxycedrus</i> en la provincia de Burgos.....	70
1.14 Distribución de la Sabina albar (<i>Juniperus thurifera</i>) en la provincia de Burgos...71	
1.15 Sabinas del Arlanza.....	71
1.16 y 1.17 Sabina albar (<i>Juniperus thurifera</i>).....	72
1.18 Polen de Cupressaceae-Taxaceae.....	74
1.19 Recuentos de pólenes de Cupressaceae en 2003.....	76

1.20 Pólenes relevantes en los pacientes con rinoconjuntivitis alérgica en Alergológica 2015, Alergológica 2005 y Alergológica 92.....	78
1.21 Porcentajes de pacientes con rinoconjuntivitis sensibilizados a los pólenes más frecuentes según comunidades autónomas en Alergológica 2015 y 2005.....	79

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Lanceta.....	100
4.2 Prick test.....	108
4.3 Lectura de Prick test.....	108
4.4 Burkard en Hospital General Yagüe.....	112
4.5 Burkard en Hospital Universitario de Burgos.....	112
4.5 Burkard y material para la identificación de polen.....	113
4.6 Nuestro material para la identificación de pólenes.....	114
4.7 Microscopio para la identificación de pólenes.....	114

RESULTADOS

5.1 Concentraciones medias diarias del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016 en granos/m ³	120
5.2 Concentraciones medias diarias del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016 en granos/m ³ (sin valores por encima 100gr/m ³).....	121
5.3 Porcentajes anuales del total de pólenes del taxón Cupressaceae/Taxodiaceae de los años 2001 a 2016.....	121
5.4: Concentraciones anuales máximas de Cupressaceae/Taxodiaceae 2001- 2016...122	
5.5 Valores pico de Cupressaceae/Taxodiaceae de 2001-2016.....	122
5.6: Concentraciones medias diarias del taxón Poaceae de los años 2001-2016 en granos/m ³	124

5.7: Concentraciones medias diarias de los taxones Poaceae (gramíneas) y Cupressaceae/Taxodiaceae (Cupresáceas) de los años 2001-2016 en granos/m ³	126
5.8: Concentraciones medias diarias del taxón <i>Plantago</i> de los años 2001-2016 en granos/m ³	126
5.9: Concentraciones medias diarias del taxón <i>Olea</i> de los años 2001-2016 en granos/m ³	127
5.10: Días pico y totales anuales del taxón <i>Fraxinus</i> de los años 2001-2016 (menos 2015) en granos/m ³	127
5.11: Concentraciones medias diarias del taxón <i>Fraxinus</i> de los años 2001-2016 (menos 2015) en granos/m ³	128
5.12: Concentraciones medias diarias del taxón <i>Fraxinus</i> del año 2015 en granos/m ³	128
5.13: Concentraciones medias diarias del taxón <i>Platanus</i> de los años 2001-2016 en granos/m ³	129
5.14: Días pico del taxón <i>Platanus</i> de los años 2001-2016.....	129
5.15 Distribución de pacientes por década de edad.....	130
5.16 Distribución de pacientes por síntomas.....	131
5.17: Diagrama de dispersión para los distintos pares de variables de la tabla 5.12....	138
5.18. Diagrama de dispersión para los distintos pares de variables de la tabla 5.12 con el logaritmo de las variables en aquellas que se ha utilizado para el test.....	139
5.19: Curva ROC IgE Extracto <i>C arizonica</i>	140
5.20: Curva ROC SPT <i>C arizonica</i>	141
5.21: Curva ROC <i>C sempervirens</i>	142

DISCUSIÓN

6.1 <i>Platanus</i> Comité de Aerobiología de 2003.....	159
---	-----

6.2 Mastocito y su activación en la reacción alérgica tipo I.....169

9 ANEXOS

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO:

Aplicación y utilidad del diagnóstico basado en componentes moleculares en pacientes alérgicos a polen de cupresáceas

INVESTIGADOR:

Dr. Pedro Carretero Aníbarro

CENTRO:

Servicio de Alergología. Hospital Universitario de Burgos

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar.

Este proyecto ha sido revisado por el Comité Ético del Hospital Universitario de Burgos

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en sus cuidados médicos

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este proyecto de investigación se desarrollará en el Servicio de Alergología del Hospital Universitario de Burgos y su objetivo es mejorar el diagnóstico de pacientes alérgicos a polen de cupresáceas.

Su participación en el ensayo implica la realización de pruebas diagnósticas de rutina, es decir, procedimientos utilizados en la práctica clínica habitual. Estas pruebas diagnósticas incluyen la prueba de punción cutánea de alérgenos y una extracción de sangre. También se recogerán algunos datos de su historia clínica como datos demográficos, otras alergias o antecedentes personales. Usted podrá tener acceso a los resultados de las pruebas una vez estén analizadas

CONFIDENCIALIDAD

La información suya que se incluya en el proyecto se tratará siempre de forma confidencial y los datos serán siempre tratados de manera anónima, no incluyendo ninguna información que permita su identificación. De esta forma, el acceso a su información personal quedará restringido al personal médico que le trate, al Comité

Ético de Investigación Clínica y a las autoridades competentes que pudieran solicitar dicho acceso. En todo caso, estarán sometidos al deber de secreto inherente a su profesión Si usted acepta participar en este proyecto, deberá firmar un consentimiento informado para autorizar que parte de sus datos clínicos puedan ser incluidos en una base de datos para su análisis

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Aplicación y utilidad del diagnóstico basado en componentes moleculares en pacientes alérgicos a polen de cupresáceas

Yo (Nombre y apellidos).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con el Dr. PEDRO CARRETERO ANIBARRO

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) Cuando quiera
- 2) Sin tener que dar explicaciones
- 3) Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras de sangre para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad (quedando excluidos los análisis genéticos)

Firma del paciente:

Nombre:

Fecha:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

SUBROGADO A MENORES

TÍTULO DEL ESTUDIO: Aplicación y utilidad del diagnóstico basado en componentes moleculares en pacientes alérgicos a polen de cupresáceas

Yo (Nombre apellidos).....NIF.....en calidad de
.....(Relación con el participante) de..... (Nombre y apellidos del
participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con el Dr. PEDRO CARRETERO ANIBARRO

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- 1) Cuando quiera
- 2) Sin tener que dar explicaciones
- 3) Sin que esto repercuta en los cuidados médicos.

Ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio y da su consentimiento para el acceso y utilización de sus datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras de sangre para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad (quedando excluidos los análisis genéticos)

Firma del representante legal:

Nombre: del representante legal

Fecha:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

10 REFERENCIAS BILIOGRAFICAS

A

- Aceituno E, del Pozo V, Minguez A, Arrieta I, Cortegano I, Cardaba B, Gallardo S, Rojo M, Palomino P, Lahoz C (2000). Molecular cloning of major allergen from *Cupressus arizonica* pollen: Cup a 1 *Journal Clin Exp Allergy*; 30(12):1750-1758
- Adams RP, Bartel JA, Price RA (2009). A new genus, *Hesperocyparis*, for the cypresses of the new World. *Phytologia* 91:160–185
- Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Di Felice G, Tinghino R, Mari A, Pini C (1999). Role of carbohydrate moieties in IgE binding to allergenic components of *Cupressus arizonica* pollen extract. *Clin Exp Allergy*. Aug; 29(8):1087-94.
- Agarwal MK, Swanson MC, Reed CE, Yunginger JW (1984). Airborne ragweed allergens: Association with various particles sizes and short ragweed plant parts. *J Allergy Clin Immunol*; 74: 687-693
- Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J (1998). Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* (Orl.) Hämet-Ahti) pollen. *Clin Exp Allergy*; 28: 1384-1388.
- Alcazar P, Galan C, Carinanos P, Dominguez-Vilches E (1999). Diurnal variation of airborne pollen at two different heights. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 9: 89-95.
- Alejandre, J.A.; Escalante, M.J ; García-López, J.M.; Marín, L.; Mateo, G.; Molina, C.; Montamarta, G.; Patino, S. & Valencia, J. (2006). Corología del enebro de la miera (*Juniperus oxycedrus* L.) en la provincia de burgos
<http://www.pfcyl.es/sites/default/files/eventos/70.pdf>
- Alejandre, J.A.; Escalante, M.J.; García-López, J.M.; Mateo, G.; Molina, C.; Montamarta, G. & Pinto, M.A. (2006). Corología de la Sabina albar (*Juniperus thuriferal.*) en la provincia de Burgos
<http://www.pfcyl.es/sites/default/files/eventos/120.pdf>.
- Alergológica 1992. (1995). Factores Epidemiológicos Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España. Madrid: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia e Inmunología y Abello,.

Alergológica 2005 (2006). Factores Epidemiológicos Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España en 2005. Madrid: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Luzán 5, SA ediciones,

Alergológica 2015 (2017). Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica Editado por Draft Grupo de Comunicación Healthcare. Solo formato digital en la actualidad.

Alisi C, Afferni C, Iacovacci P, Barletta B, Tinghino R, Butteroni C, Puggioni EM, Wilson IB, Federico R, Schininà ME, Ariano R, Di Felice G, Pini C (2001). Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen. *Allergy*;56(10):978-84

Allue Camacho C, GarciaLopez JM (2015). Patrimonio Botánico del Parque Natural Montes Obarenses San Zadornil. Burgos España Iberdrola SA

Altmann F (2007). The Role of Protein Glycosylation in Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*;142:99-115.

Altmann F (2016). Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int.*;25(4):98-105.

Andersen, T.B. (1991). A model to predict the beginning of the pollen season. *Grana*.30: 269-275.

Andre C, Dumur JP, Hrabina M, et al (2000). *Juniperus ashei*: the gold standard of the Cupressaceae. *Allerg Immunol.*;32:104-6.

Ariano R. *Allergia respiratoria al polline di Cupressaceae* (1988). *Folia Allergol Immunol Clin*; 35: 275-284.

Arilla MC, Ibarrola I, Garcia R, de la Hoz B, Martinez A, Asturias JA (2004). Quantification of the major allergen from cypress (*Cupressus arizonica*) pollen, Cup a 1, by monoclonal antibody-based ELISA. *Int Arch Allergy Immunol*;134:10–6.

Armentia A , Asensio T, Subiza J, Arranz M L, Martín Gil F-J, Callejo A (2004). Living in Towers as Risk Factor of Pollen Allergy. *Allergy* 59 (3), 302-305.

Armentia A, Martín S, Barrio J, Martín B, García JC, Vega JM, Sánchez A, Fernández P, Corell A (2015). Value of microarray allergen assay in the management of eosinophilic oesophagitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. Jan-Feb;43(1):73-80

Armentia A, Sanchís E, Montero JA (2016). Component-resolved diagnostics in vernal conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Oct;16(5):498-504

Asam C, Hofer H, Wolf M, Aglas L, Wallner M (2015). Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective. *Allergy*;70:1201-1211

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Casarini M (2000). *Allergy*. Nov;55(11):1059-62. Detection of allergens in plantain (*Plantago lanceolata*) pollen.

Asero R (2002). Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to "new" airborne allergens. *Allergy*; 57: 1063-1066.

Asero R (2011). Hypersensitivity to pollen panallergens (profilin and polcalcin) detected in vitro and in vivo: a comparative analysis. *J Investig Allergol Clin Immunol*.;21(4): 323–4

Asero R, Mistrello G, Amato S (2016). IgE Reactivity to Polcalcins Varies According to Pollen Source. *J Investig Allergol Clin Immunol*.;26(6):362-365.

B

Barnes C, Schreiber K, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy P (2000). Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 84: 47-54.

Bacsi A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I (2006). Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases. *J Allergy Clin Immunol*. Oct; 118(4): 844–850

Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R (2008). Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*; 63: 1550-1558.

Barnes C, Schreiber K, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J (2000). Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol.*; 84:47–54. PubMed: 10674565.

Barber D, De la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R (2008). Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*; 63: 1550-1558.

Barber D, De la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colas C, Dávila I, Tabar AI, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R (2009). Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clinical Experimental Allergy*, 39: 1764-1773.

Barberini S, Della Rocca G, Danti R, Zanoni D, Mori B, Ariano R, Mistrello G (2015). Different allergenicity of pollen extracts of three Mediterranean cypress species accounted for cytological observations. *Eur Ann Allergy Clin Immunol. Sep*;47(5):149-55.

Barderas R, Villalba M, Rodríguez R (2004). Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem.*;385(8):731-737. doi:10.1515/BC.2004.089

Barletta B, Tinghino R, Corinti S, et al (1998). Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen allergens. Identification of crossreactive periodate-resistant and sensitive epitopes with monoclonal antibodies. *Allergy.*;53:586-93

Bartra J (2015). Las Taumatinas como panalérgenos Ponencia Alergoaragon <http://www.alergoaragon.org/2015/segunda1.html>

Bass D, Baldo B, Pham NH (1991). White cypress pine pollen: An important seasonal allergen source in rural Australia [1]. *Med J Aust.*;155(8):572.

Behrendt H, Becker W (2001). Localization, Release and Bioavailability of Pollen Allergens: the Influence of Environmental Factors *Current Opinion in Immunology* 13:709-715,.

Behrendt H, Friedrichs KH, Krämer U, Hitzfeld b, Becker WM, Ring J. The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases. In Johansson SGO eds. *Progress in Allergy and Clinical Immunology 3*. Stockholm: Hogrefe & Huber Publishers, 1995; 83-89.

Belmonte J, Canela M, Guàrdia R, Guàrdia RA, Sbai L, Vendrell M, Cariñanos P, Díaz de la Guardia C, Dopazo A, Fernandez D, Gutiérrez M, Trigo MM Aerobiological dynamics of Cupressaceae pollen in Spain, 1999, 1992-98. *Polen* 10:25-36

Belmonte J. Introducción. En: *Polinosis*. eds. Cadahía A, Valero AL, Barcelona: MRA Ediciones S.L.; 2002:7-16.

Behrendt H, Becker WM, Friedrichs KH, Darsow U, Tomingas R. Interaction between Aeroallergens and Airborne Particulate Matter. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;99(2-4):425-428

Benítez FM1, Camacho AL, del Cuvillo Bernal A, de Medina PL, García Cózar FJ, Romeu ME. Determination of allergenic load and pollen count of *Cupressus arizonica* pollen by flow cytometry using Cup a1 polyclonal antibody. *Cytometry B ClinCytom*. 2014 Jan;86(1):63-9

Belmonte, J., Canela, M., Guardia R., Guardia, R. A., Sbai, L., Vendrell, M., Cariñanos, P., Díaz de la Guardia, C., Dopazo, A., Fernández, D., Gutiérrez, M. & Trigo, M. M. 1999. Aerobiological dynamics of the Cupressaceae pollen in Spain 1992-1998. *Polen* 10: 27-38.

Belmonte, J., Roure, J. M., Colás, C., Duce, F., García, R. M., Laborda, M. & Portillo, J. 2001. *Aerobiología de Aragón*. División de Alergia de CBF-LETI, S. A. Barcelona (España). 157 págs

Bistoni O, Emiliani C, Agea E, Russano AM, Mencarelli S, Orlacchio A, Spinozzi F (2005) Biochemical and immunological characterization of pollen-derived beta-galactosidase reveals a new cross-reactive class of allergens among Mediterranean trees. *Int Arch Allergy Immunol* 136(2):123-133.

Black JH. Cedar hay fever. *J Allergy*. 1929;1:71. Blackley CH. *Experimental Researches on the Nature and Causes of Catarrhus Aestivus*. London: Bailliere, Tindal & Cox, 1873

- Bobolea I, Barranco P, Sastre B, Fernandez-Nieto M, del Pozo V, Quirce S (2011) Seasonal eosinophilic bronchitis due to allergy to *Cupressus arizonica* pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 106(5):448–449. doi:10.1016/j.anai.2011.02.004
- Bostock J. Case of a Periodical Affection of the Eyes and Chest. *Med Chir Trans.* 1819;10(Pt 1):161-165
- Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Global Allergy and Asthma European Network; Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012; Jan;67: 18–24.
- 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.
- Bousquet J, Knani J, Hejjaoui A, Ferrando R, Cour P, Dhivert H, Michel FB (1993) Heterogeneity of atopy. I. Clinical and immunologic characteristics of patients allergic to cypress pollen. *Allergy* 48(3):183–188
- Boutin-Forzano S, Gouitaa M, HammouY, Ramadour M, Charpin D (2005) Personal risk factors for cypress pollen allergy. *Allergy* 60(4):533–535. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00744.x
- Breiteneder H, Radauer CA. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-830.
- Bryant RH, Emberlin JC, Norris-Hill J. Vertical variation in pollen abundance in North-Central London. *Aerobiología* 1989; 5: 123-137
- Bucholtz GA, Lockey RF, Serbousek D. Bald cypress tree (*Taxodiumdistichum*) pollen, an allergen. *Ann Allergy.* 1985;55(6):805-810.
- Burge HA. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:544–52. [PubMed: 12373259]

C

Caballero T, Romualdo L, Crespo JF, Pascual C, Muñoz Pereira M, Martín Esteban M (1996). Cupressaceae polinosis in the Madrid area. *Clinical and Experimental Allergy*; 26: 197-201.

Cabrera-Freitag P, Goikoetxea MJ, Beorlegui C, Gamboa P, Gastaminza G, Fernández-Benítez M, Ferrer M, Blanca M, Sanz ML (2011). Can component-based microarray replace fluorescent enzymeimmunoassay in the diagnosis of grass and cypress pollen allergy? *ClinExpAllergy*. Oct;41(10):1440-6.

Cabrera M, Martínez-Cócera C, Boluda L, Subiza JL, Subiza J, Jerez M, Fernández-Caldas E (1998). Immunochemical quantitation of pollen aeroallergens in Madrid, Spain. *Allergy*; 53 (Suppl.43): 21 (A).

Cabrera M, Martínez-Cócera C, Boluda L, Tejada J, Subiza JL, Subiza J, et al (2000). Presencia de aeroalergenos de gramíneas en la atmósfera de Madrid. *Alergol Inmunol Clin*; 15 (Extr 3): 16(A).

Cabrera M, Martínez-Cócera C, Fernández-Caldas E, Carnes Sánchez J, Boluda L, Tejada J et al (2002). *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol*; 128: 123-9.

Caimmi D, Raschetti R, Pons P, Dhivert-Donnadieu H, Bousquet PJ, Bousquet J, Demoly P (2012) Epidemiology of cypress pollen allergy in Montpellier. *J Investig Allergol Clin Immunol* 22(4): 280–285

Caimmi D, Barber D, Hoffmann-Sommergruber K, Amrane H, Bousquet P, Dhivert-Donnadieu H, Demoly P (2013) Understanding the molecular sensitization for cypress pollen and peach in the Languedoc-Roussillon area. *Allergy* 68(February): 249–251
138.

Canini A, Giovinazzi J, Iacovacci P, Pini C, Grilli-Caiola M. (2004). Localisation of a carbohydrate epitope recognised by human IgE in pollen of Cupressaceae. *J Plant Res.*;17:147-53.

- Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, et al. (2013) A WAO-ARIA-GA2LEN Consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *WAOJ* 6:17:1-17.
- Canonica GW, Bachert C, Hellings P, Ryan D, Valovirta E, Wickman M, et al. (2015). Allergen Immunotherapy (AIT): a prototype of precision medicine. *World Allergy Organ J*;8:31
- Carretero Aníbarro P., Juste Picón S., García González F., Alloza Gómez P., Pérez, Giménez R., Blanco Carmona J., Reinares Ten C., Vicente Serrano J., Bascones O. (2005). Pólenes alergénicos y polinosis en la ciudad de Burgos *Alergol Inmunol Clin*; 20: 90-94
- Casquete-Román E, Rosado-Gil T, Postigo I, Pérez-Vicente R, Fernández M, Torres HE, Martínez-Quesada J (2009). Contribution of molecular diagnosis of allergy to the management of pediatric patients with allergy to pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol.*;19(6):439-45
- Casquete-Román E, Rosado-Gil T, Postigo I, Guisantes JA, Fernández M, Torres HE, Martínez-Quesada J (2012). Profilin cross-reactive panallergen causes latex sensitization in the pediatric population allergic to pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol. Sep*;109(3):215-9
- Castillo Marchuet MJ (2016) Tesis doctoral: Alergia a cupresáceas en la población del Valles Occidental.
- Cavagni G, Caffarelli C, Spattini A, Riva G (2003). IgE-mediated allergic rhinitis and conjunctivitis caused by *Calocedrus decurrens* (incense cedar). *Allergy.*;58(11):1201-1202.
- Charpin D, Hugues B, Mallea M, Sutra J-P, Balansard G, Vervloet D (1993) Seasonal allergic symptoms and their relation to pollen exposure in Southeast France. *Clin Exp Allergy* 23:435–439
- Charpin D (2000). Epidemiology of cypress pollen allergy. *Allerg Immunol* 32:83–85
- Charpin D, Calleja M, Pichot C, Penel V, Hugues B, Poncet P (2013). Cypress pollen allergy *Rev Mal Respir. Dec*; 30(10):868-78.

Charpin D, Pichot C, Belmonte J, Sutra JP, Zidkova J, Chanez P, Shahali Y, Sénéchal H, Poncet P. (2017). Cypress Pollinosis: from Tree to Clinic. *Clin Rev Allergy Immunol.* Apr 11. doi: 10.1007/s12016-017-8602-y

Chapman MD (1998). Allergens. En: Roitt IM and Delves PJ, eds. *Encyclopedia of Immunology.* 2ª ed. London: Academic Press;. vol.1, p. 1-6

Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés (2000). A Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*; 106(3):409-418.

Chevalier, J. y Gheerbrant, A. (2009) *Diccionario de los símbolos.* Barcelona: Herder S.A.

Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. *Introducción en la captación e identificación de los pólenes.* SEAIC-Almirall Prodesfarma: 6-9.

Connell JT (1969) Quantitative intranasal pollen challenges. 3. The priming effect in allergic rhinitis. *J Allergy.* Jan;43(1):33-44.

Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, del Moral A, López E, Lombardero M, del Pozo V, Lahoz C (2004). Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy.* May;59(5):485-90.

Cuesta-Herranz J, Lázaro M, de las Heras M, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, Hernandez J, Cuesta C (1998). Peach allergy pattern: experience in 70 patients. *Allergy.* Jan;53(1):78-82.

Cuesta-Herranz J1, Lázaro M, Martínez A, Figueredo E, Palacios R, de-Las-Heras M, Martínez J (1999). Pollen allergy in peach-allergic patients: sensitization and cross-reactivity to taxonomically unrelated pollens. *J Allergy Clin Immunol.* Sep;104(3 Pt 1):688-94.

Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS (2000). Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol*; 164: 3878-86

D

D'Amato G, Cocco G, Melillo G (1981). Immunological effects induced by biological natural aerosols (pollen and spores). *Z ErkrAtmungsorgane.*;157(3):281-286

D'Amato G, Gentili M, Russo M, Mistrello G, Saggese M, Liccardi G, Falagiani P (1994). Detection of *Parietaria judaica* airborne allergenic activity: comparison between immunochemical and morphological methods including clinical evaluation. *Clin Exp Allergy*; 24: 566-574.

D'Amato G. Sampling airborne pollen and airborne allergenic activity. En: Basomba A y Sastre J eds (1995). Postgraduate courses and practical workshops; Syllabus. Valencia ECACI-95;;: 322-24.

D'Amato G (2000). Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*; 30: 628-636.

D'Amato G (2001). Airborne paucimicronic allergen-carrying particles and seasonal respiratory allergy. *Allergy*; 56: 1109-11

Danti R, Della Rocca G, Calamassi R, Mori B, Mariotti Lippi M. (2011). Insights into a hydration regulating system in *Cupressus* pollen grains. *Ann Bot.* Aug;108(2):299-306. doi: 10.1093/aob/mcr144. Epub 2011 Jun 17.

Depreux N, Quilez E, Roger A, Basagaña M (2016). Component-Resolved Diagnosis: Impact on Indications for Therapy in Patients With Respiratory Allergy and Sensitization to Multiple Pollens in Catalonia, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol.*;26(6):396-398. doi: 10.18176/jiaci.0111.

Deviller P, Pauli G (1997). Cross-reactions involving plant allergens. *Clin Rev in Allergy Immunol*; 15: 405-13.

De Weger LA, Beerthuisen T, Hiemstra PS, Sont JK. (2014) Development and validation of a 5-day-ahead hay fever forecast for patients with grass-pollen-induced allergic rhinitis. *Int J Biometeorol.* Aug;58(6):1047-55. doi: 10.1007/s00484-013-0692-5.

Díaz de la Guardia, C. (2006). Aerobiological and allergenic analysis of Cupressaceae pollen in Granada (Southern Spain). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(1): 24-33 [<http://hdl.handle.net/10481/32708>]

Di Felice G, Caiaffa MF, Bariletto G, Allerni C, Di Paola R, Mari A, et al (1994). Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen: Characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components. *J Allergy Clin Immunol*; 94: 547-555.

Dirksen A, Osterballe O. (1980) Common components in pollen extracts. *Allergy*. Oct;35(7):611-6.

Dreborg S, Backman A, Basomba A. Skin test used in type I allergy testing. Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical immunology. *Allergy* 1989;1-59:Supl. 10.

Domínguez-Ortega J, López-Matas MÁ, Alonso MD, Feliú A, Ruiz-Hornillos J, González E, Moya R, Carnés J (2016). Prevalence of allergic sensitization to conifer pollen in a high cypress exposure area. *Allergy Rhinol (Providence)*. Jan 1;7(4):200-206. doi: 10.2500/ar.2016.7.0183.

Durham OC (1946). The volumetric incidence of airborne allergens. IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpolation of results. *J Allergy*;17:79-86.

E

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

Ebo DG, Hagendores MM, Bridts CH et al (2004). Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy*; 34: 137-144.

Eriksson NE, Holmen A (1996). Skin prick tests with standardized extracts of inhalant allergens in 7099 adult patients with asthma or rhinitis: crosssensitizations and

relationships to age, sex, month of birth and year of testing. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 6: 36-46.

F

Fein BT, Kamin PB (1962). A 10 years survey of hay fever plants and important atmospheric allergens in the San Antonio, Texas, metropolitan area. *Allergy*; 33: 141.

Feo Brito F, Galindo Bonilla PA, García Rodríguez R, Gómez Torrijos E, Fernández Martínez F, Fernández-Pacheco R, Delicado Gallego A (1998). Pólenes alergénicos en Ciudad Real: Aerobiología e incidencia clínica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 13: 79-85.

Fernández Javier (2017) Libro de Alergia Básica mra ediciones

Fernández E, Gamboa P, Antépara I, Fernández de Corres L, Ansótiegui I, Etxenagusia M, et al (1998). Influence of pollution in the pollinosis prevalence. *Allergy*; 53 (Suppl.43): 35(A).

Fernandez-Caldas E, Swanson MC, Pravda J, Welsh P, Yunginger JW, Reed CE (1989). Immunochemical Demonstration of Red Oak Pollen Aeroallergens outside the Oak Pollination Season. *Grana.*;28(3):205-209

Fernández-González D, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, Valencia-Barrera RM, Camazón-Izquierdo B, De Nuntiis P, Mandrioli P (2010). Platanus pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. *Clin Exp Allergy. Nov*;40(11):1701-8

Fernandez-Rivas M, González-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sánchez-Monge R, Salcedo G et al (2003). Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p3, in the Spanish population. *J Allergy ClinImmunol*; 112: 789-795.

Ferreiro M, Dopazo A, Aira MJ (2002). Incidence of pollinosis in the city of A Coruna: correlation with aerobiological data. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 12: 124-129.

- Ferreiro Arias M., Núñez Orjales R., Rico Díaz M.^a A., T. Soto Mera, R. López Rico (1998). Pólenes alergénicos y polinosis en el área de La Coruña. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 2: 98-101
- Ferrer M, Sanz ML, Sastre et al (2009). Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 19(suppl 1):19-24.
- Ford SA, Baldo BA, Panzani R et al (1991). Cypress (*Cupressus sempervirens*) Pollen Allergens: Identification by Protein Blotting and Improved Detection of Specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 95: 178-83.
- Fötisch K, Altmann F, Haustein D, Vieths S (1999). Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. Sep;120(1):30-42
- Frenguelli, G. (2003). Pollen Structure and morphology. *Postepy Dermatologii i Alergologii*; XX:200-4.
- Frenz DA. (2001). Interpreting atmospheric pollen counts for use in clinical allergy: allergic symptomology. *Ann Allergy, Asthma Immunol.*;86(2):150-158.
- Fritzsching B (2017). Personalized Medicine in Allergic Asthma: At the Crossroads of Allergen Immunotherapy and "Biologicals". *Front Pediatr*. Feb 17;5:31.
- Fuertes-Rodríguez CR, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, Valencia-Barrera RM, Fernández-González D (2007). Effect of air temperature on forecasting the start of Cupressaceae pollen type in Ponferrada (Leon, Spain). *Ann Agric Environ Med.*;14(2):237-42.
- Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, et al (2005). Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and competitive inhibition of its immunoglobulin E-binding capacity by latex C-serum. *Clin Exp Allergy.*;35(2):234-243. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02167.x.

G

Galán C, Alcázar P, Oteros J, García-Mozo H, Aira MJ, Belmonte J, Diaz de la Guardia C, Fernández-González D, Gutierrez-Bustillo M, Moreno-Grau S, Pérez-Badía R, Rodríguez-Rajo J, Ruiz-Valenzuela L, Tormo R, Trigo MM, Domínguez-Vilches E (2016). Airborne pollen trends in the Iberian Peninsula. *Sci Total Environ*. Apr 15;550:53-9

Galan I, Prieto A, Rubio M, Herrero T, Cervigon P, Cantero JL, Gurbindo MD, Martinez MI, Tobias A (2010). Association between airborne pollen and epidemic asthma in Madrid, Spain: A case-control study. *Thorax* 65(5):398–402. doi:10.1136/thx.2009.118992

Gastaminza G, Lombardero M, Bernaola G, et al (2009). Allergenicity and crossreactivity of pine pollen. *Clin Exp Allergy*.;39(9):1438-1446. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03308.x.32,248

García BE, Martínez-Aranguren R, Bernard Alonso A, Gamboa P, Feo Brito F, Bartra J, Blanca-López N, Gómez F, Alvarado MI, Fernández J, Alonso MD, Gonzalez-Mancebo E, Moya C, Parra A, Terrados S, Sola L, Goikoetxea MJ, Sanz ML (2016). Is the ISAC 112 Microarray Useful in the Diagnosis of Pollinosis in Spain? *J Investig Allergol Clin Immunol*.;26(2):92-9. doi: 10.18176/jiaci.0052.

García JJ, Trigo MM, Cabezudo B, Recio M, Vega JM, Barber D, et al (1997). Pollinosis due to Australian pine (*Casuarina*): an aerobiologic and clinical study in southern Spain. *Allergy*; 52: 11-17.

García González JJ (2002). Reacciones alérgicas a nuevos pólenes. *Alergol Inmunol Clin*; 17 (Extr. 2): 62-65. 27.

García López JM, Allué Camacho C (2004). Plantas silvestres de la provincia de Burgos. Burgos España Ed Caja Burgos

Geller-Bernstein C, Waisel Y, Lahoz C (2000). Environment and sensitization to cypress in Israel. *AllergImmunol (Paris)*; 32: 92-3.

Giorato, M.; Lorenzoni, F.; Bordin, A.; De Biasi, G.; Gemignani, C.; Schiappe M. y Marcer G. (2000). Airborne allergenic pollens in Padua: 1991-1996. *Aerobiologia*; 16: 453-64

Goikoetxea MJ, Sanz ML, García BE, Mayorga C, Longo N, Gamboa PM; Immunology Committee of SEAIC, Barber D, Caballero Molina T, de la Calle Toral A, Escribano Mora L, García Martínez JM, Labrador M, López Hoyos M, Martínez Quesada J, Monteseirin Mateo J (2013). Recommendations for the use of in vitro methods to detect specific immunoglobulin E: are they comparable? *J Investig Allergol Clin Immunol.*;23(7):448-54;

Gong X, Wang Q, Lu S, Suzuki M, Nakajima D, Sekiguchi K, Miwa M (2017). Size distribution of allergenic cry j 2 released from airborne *Cryptomeria japonica* pollen grains during the pollen scattering seasons. *Aerobiologia*; 33(1):59–69

González Delgado P (2017). Sección II - Capítulo 5 Alérgenos moleculares. Libro de Alergia Básica mra ediciones ISBN: 9788496504325

Gonzalez Galán I, Devesa Alcaraz JA, Ramos Maqueda S, Rodríguez Mesa P (1998). Pólenes alérgicos y polinosis en Badajoz. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 13: 63-69.

Gonzalo-Garijo MA, Tormo-Molina R, Muñoz-Rodríguez AF, Silva-Palacios I (2006). Differences in the spatial distribution of airborne pollen concentrations at different urban locations within a city. *J Investig Allergol Clin Immunol.*;16(1):37-43.

González Minero FJ, Candau P, Tomás C, Morales J (1998). Airborne grass (Poaceae) pollen in southern Spain. Results of a 10-year study (1987-96). *Allergy*; 53: 266-274.

González-Parrado Z, Fernández-González D, Camazón B, Valencia-Barrera RM , Vega-Maray AM , Asturias JA , Monsalve RI , Mandrioli P (2014). Molecular aerobiology – Plantago allergen Pla 1 in the atmosphere. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol 21, No 2, 383–390

González-Parrado Z, Valencia-Barrera RM, Vega-Maray AM, Fuertes-Rodríguez CR, Fernández-González D (2014). The weak effects of climatic change on Plantago pollen concentration: 17 years of monitoring in Northwestern Spain. *Int J Biometeorol. Sep*;58(7):1641-50.

Grant Smith E (1984). Sampling and identifying Allergenic Pollens and Moulds. Volume I&II Blewstone Press. San Antonio, Texas,.

Gross GN, Zimburean JM, Capra JD (1978). Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar allergen. *Scand J Immunol*; 8: 437-41.

Grote M, Vrtala S, Niederberger V, Valenta R, Reichelt R (2000). Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol.*; 105:1140– 5.

Grote M, Vrtala S, Niederberger V, Wiertmann R, Valenta R, Reichelt R (2001). Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: A mechanism common to a variety of grass (*Poaceae*) species revealed by electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol*, Volume 108: 109-115.

Guerin B, Kanny G, Terrasse G, Guyot JL, Moneret-Vautrin DA (1996). Allergic rhinitis to thuja pollen. *Int Arch Allergy Immunol.*;110(1):91-94.

Guerra F, Daza JC, Miguel R, Moreno C, Galán C, Domínguez E, Sánchez Guijo P (1996). Sensitivity to Cupressus: allergenic significance in Córdoba (Spain). *J Investig Allergol Clin Immunol*. Mar-Apr;6(2):117-20

H

Hart JA (1987). A clastic analysis of conifers: preliminary results. *J Arnold Arboretum*; 68: 269-307

Hart ML, Wentworth JE, Bayley JP (1994). The effects of trap height and weather variables on recorded pollen concentrations at Leicester. *Grana*; 33: 100-103.

Hauser M et al (2010). Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol.*;6(1):1.

Hellings PW, Fokkens WJ, Bachert C, Akdis CA, Bieber T, Agache I, Bernal-Sprekelsen M, Canonica GW, Gevaert P, Joos G, Lund V, Muraro A, Onerci M, Zuberbier T, Pugin B, Seys SF, Bousquet J; ARIA and EPOS working groups (2017). Positioning the Principles of Precision Medicine in Care Pathways for Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis - an EUFOREA-ARIA-EPOS-AIRWAYS ICP statement. *Allergy*. Mar 17

Helander ML, Savolainen J, Ahlholm J (1997). Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy*; 52:1207-14.

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

Hidalgo PJ, Galan C, Dominguez E (2003). Male phenology of three species of Cupressus: Correlation with airborne pollen. *Trees*, 17:336–344

Hirst JM. An automatic volumetric spore trap (1952). *Ann Appl Biol*; 39:257-265.

Honda K, Saito H, Fukui N, Ito E, Ishikawa K (2013). The relationship between pollen count levels and prevalence of Japanese cedar pollinosis in Northeast Japan. - *AllergolInt* - September 1,; 62 (3); 375-80

Horiguchi S, Saito Y (1964). Discovery of Japanese Cedar Pollinosis in Nikko, Ibaraki Prefecture. *Arerugi*.;13:16-18.

Hugues B, Didierlaurent A, Charpin D (2006) Cross-reactivity between cypress pollen and peach: A report of seven cases. *Allergy* 61(10):1241–1243

Hyde HA, Adams KF (1958). An atlas of airborne pollen grains. London: MacMillan,

I

Iacovacci P, Afferni C, Butteroni C, Pironi L, Puggioni EM, Orlandi A, Barletta B, Tinghino R, Ariano R, Panzani RC, Di Felice G, Pini C (2002). Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. *ClinExp Allergy*. Nov;32(11):1620-7.

Ibrahim AR, Kawamoto S, Nishimura M, et al (2010). A new lipid transfer protein homolog identified as an IgE-binding antigen from Japanese cedar pollen. *BiosciBiotechnolBiochem.*;74(3):504-509. doi:10.1271/bbb.90685.

Ibrahim AR, Kawamoto S, Mizuno K, Shimada Y, Rikimaru S, Onishi N, Hashimoto K, Aki T, Hayashi T, Ono K (2010). Molecular Cloning and Immunochemical Characterization of a New Japanese Cedar Pollen Allergen Homologous to Plant Subtilisin-Like Serine Protease. *JournalWorld Allergy Organ J*; 3(1):262-265

Ibrahim AR, Kawamoto S, Aki T, Shimada Y, Rikimaru S, Onishi N, Babiker EE, Oiso I, Hashimoto K, Hayashi T, Ono K (2010) Molecular cloning and immunochemical characterization of a novel major Japanese cedar pollen allergen belonging to the aspartic protease family. *Int Arch Allergy Immunol* 152(3):207–218.

Inomata N, Okazaki F, Moriyama T, Nomura Y, Yamaguchi Y, Honjoh T, Kawamura Y, Narita H, Aihara M (2014) Identification of peamaclein as a marker allergen related to systemic reactions in peach allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 112(2):175–177 . doi:10.1016/j.anai.2013.11.003e173

Inomata N, Miyagawa M, Aihara M (2015) Identification of orange Peamaclein as a new allergen in orange allergy. EAACI Online Library, 34th EAACI meeting, Barcelona, Spain Abstract (June 6, 2015)

Inuo C, Kondo Y, Tanaka K, Nakajima Y, Nomura T, Ando H, Suzuki S, Tsuge I, Yoshikawa T, Urisu A (2015) Japanese cedar pollen-based subcutaneous immunotherapy decreases tomato fruit-specific basophil activation. *Int Arch Allergy Immunol* 167(2):137–145.

Ishida T, Muai K, Yasuda T, Satou T, Sejima T, Kitumura K (2000) Oral allergy symptom in patients with Japanese cedar pollinosis. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 103:199–203

Ishizaki T, Koimuzi K, Ikemori et al (1987). Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy*; 58: 265-70.

J

Jäger S. (1995). Recommendations for methodology for routinely performed monitoring of airborne pollen. En: Basomba A y Sastre J eds. Postgraduate courses and practical workshops; Syllabus. Valencia ECACI-95;: 329-30.

Jäger, S.; Nilsson, S.; Berggren, B.; Pessi, A.M.; Helander, M. y Ramford, H. (1996). Trends in home airborne tree pollen in the Nordic countries and Austria, 1980-1993: A comparison between Stockholm, Trondheim, Turku and Vienna. *Grana*. 35: 171-178

Jato, V.; Rodríguez-Rajo, F.J.; Alcázar, P.; De Nuntiis, P.; Galán, C. y Mandrioli, P. (2006). May the definition of pollen season influence aerobiological results? *Aerobiologia*; 22: 13–25.

K

Kahn IS GE (1931). Hay Fever and Asthma Due to Red Cedar (*Juniperus virginiana*) and to Mountain Cedar (*Juniperus sabinoides*). *South Med J*;24:729-730.

Kamijo S, Takai T, Kuhara T, Tokura T, Ushio H, Ota M, Harada N, Ogawa H, Okumura. Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity in vivo. *J Immunol* 2009; 183(10):6087–6094.

Kawamoto S, Fujimura T, Nishida M, et al (2002). Molecular cloning and characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant isoflavone reductase family. *ClinExp Allergy*.;32:1064-1070.

Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, et al (1997). Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*; 27: 246-251.

Kondo Y, Tokuda R, Urisu A, Matsuda T (2002) Assessment of cross-reactivity between Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and tomato fruit extracts by RAST inhibition and immunoblot inhibition. *Clin Exp Allergy* 32(4):590–594

Konishi S, Ng CF, Stickley A, Nishihata S, Shinsugi C, Ueda K, Takami A, Watanabe C (2014) Particulate matter modifies the association between airborne pollen and daily medical consultations for pollinosis in Tokyo. *Sci Total Environ* 499:125–132

L

- Lacovacci P, Afferni C, Barletta B et al (1998). *Juniperus oxycedrus*: A new allergenic pollen from the Cupressaceae family. *J Allergy Clin Immunol* ; 101: 755-61.
- La Motta N, Musarra A, Gangemi S Marotta G, Bagnato GF, Purello D'Ambrosio F (1998). Parietaria pollen modifications induced by air pollution. *Allergy*; 53 (Suppl.43): 20 (A).
- Landa-Pineda CM, Guidos-Fogelbach G, Marchat-Marchau L, López-Hidalgo M, Arroyo-Becerra A, Sandino Reyes-López CA (2013). Profilins: allergens with clinical relevance. *Rev Alerg Mex. Jul-Sep*;60(3):129-43.
- Lewis WH, Vinay P, Zenger VE (1983) Airborne and allergenic pollen of North America. Press JH (ed). Baltimore, p 254
- Lierl MB, Hornung RW (2003). Relationship of outdoor air quality to pediatric asthma exacerbations. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 90: 28-33.
- Lind T, Ekeboom A, AlmKübler K, Östensson P, Bellander T, Löhmus M (2016). Pollen Season Trends (1973-2013) in Stockholm Area, Sweden. *PLoS One*. Nov 29;11(11):e0166887. doi: 10.1371/journal.pone.0166887.
- Lindqvist A., et al (1995). Quantitative measurement of allergen-specific IgE antibodies applied in a new immunoassay system. In: Basomba A, Hernandez F de Rojas. editors. *UniCAPTM.ECACI'95*. Bologna: MonduzziEditore~1995:195-200.
- Little DP (2006). Evolution and circumscription of the true cypresses (Cupressaceae: Cupressus). *Syst Bot*, 31:461–480

M

- Malandain H (2004). IgE antibody in the serum--the main problem is cross-reactivity. *Allergy*. Feb;59(2):229;
- Malandain H (2005). IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. Apr;37(4):122-8.

Malandain H (2005). IgE-reactive carbohydrate epitopes – classification, cross-reactivity, and clinical impact (2nd part). *Eur Ann Allergy Clin Immunol*; 37: 247–256.

Malandain H, Giroux F, Cano Y (2007). The influence of carbohydrate structures present in common allergen sources on specific IgE results. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*;39:216-220.

Malik P, Singh AB, Babu CR, Gangal SV (1990). Head-high, airborne pollen grains from different areas of metropolitan Delhi. *Allergy*; 45: 298-305.

Mandrioli P, De Nuntiis P, Ariatti A, Magnani R (2000). Cypress in Italy: landscape and pollen monitoring. *Allerg Immunol (Paris)*; 32: 116-21.

Marcos C, Rodriguez FJ, Luna I, Jato V, Gonzalez R (2001). Pinus pollen aerobiology and clinical sensitization in northwest Spain. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 87: 39-42.

Marin-Rodriguez MC, Smith DL, Manning K, Orchard J, Seymour GB (2003). Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol Biol*; 51(6):851–7. PMID: 12777045

Mari A, Di Felice G, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Sallusto F, et al (1996). Assessment of skin prick test and serum specific IgE detection in the diagnosis of Cupressaceae pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*; 98: 21-31.

Mari A, Di Felice G, Afferini C, et al (1997). Cypress allergy: an underestimated pollinosis. *Allergy*.;52:355-6.

Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, Giani M, Pirrotta L, Zuidmeer L, Bethell D, van Ree R (2008). Evaluation by double-blind placebo controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. *Allergy*; 63: 891–896.

Martinez S, Gouitaa M, Tummino C, Chanez P, Charpin D (2015) The cypress/citrus syndrome. *Rev Fr Allergol* 55(4):305–307. doi:10.1016/j.reval.2014.12.008

Martínez-Cócerca C, Subiza Garrido-Lestache FJ, Sellers Fernández G, Farr I (2000). Estudio epidemiológico de la rinitis alérgica en la consulta de alergología. Relación de la sintomatología estacional con los niveles de polen atmosférico. *Alergol Inmunol Clin*; 15 (Extr.3): 116-117(A).

- Matricardi PM y col (2016). EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* May;27 Suppl 23:1-250.
- Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Brooks EG. (2000) Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen. *J Immunol.* Feb 15;164(4):2188-92.
- Migueres M, Dávila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lhéritier-Barrand M, Incorvaia C, Ciprandi G (2014). Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clin Transl Allergy.* May 1;4:16.
- Miki-Hirosige H, Nakamura S, Yasueda H, Shida T, Takahashi Y (1994). Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex Plant Reprod.*;7(2):95-100. doi:10.1007/BF00230577
- Moral A, Senent C, Cabañes N et al (1998). Pólenes alergénicos y polinosis en Toledo durante 1995-1996. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín;* 13: 126-34.
- Moral de Gregorio (2003). Aerobiología y polinosis por Cupresáceas en España *Alergol Inmunol Clin;* 18 (Extraordinario Núm.3):24-44
- Moral de Gregorio A, Senent Sanchez C, Garcia Gomez E, Perez Badia R (2016). Familia Cupressaceae. *Manual de Alergopalinología, Plantas, Pólenes y Proteínas.* Toledo
- Moral de Gregorio A (2017). Comité Aerobiología. Nota informativa a la prensa Comité de Aerobiología SEAIC.
- Muilenberg ML, Skellenger WS, Burge HA, Solomon WR. Particle penetration into the automotive interior (1991). I. Influence of vehicle speed and ventilatory mode. *J Allergy Clin Immunol.*;87(2):581-585. doi:10.1016/0091-6749(91)90018-J.
- Muñoz Pereira M, Subiza J, Gavilán MJ, Barjau C (2000). ¿Es posible establecer una curva dosis-respuesta entre los recuentos de pólenes de gramíneas y síntomas de rinitis? *Alergol Inmunol Clin;* 15 (Extr. 3): 17-18(A).

Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, et al (1986). Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol*; 77: 616-623.

N

Nakamura S, Sato F, Nakamura N (2004). Immunocytochemical localization of cry j 1 and cry j 2 - the allergenic proteins of Japanese cedar pollen - in the germinated pollen. *Japanese Journal of Palynology*; 50(1):15–22

Niederberger V, Pauli G, Grönlund H, Fröschl R, Rumpold H, Kraft D et al (1998). Recombinant birch pollen allergens (rBet v1 and rBet v2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol*; 102: 579-591.

Nieto A, Mazón A, Boquete M, Carballada F, Asturias JA, Martínez J, Martínez A (2002). Assessment of profilin as an allergen for latex-sensitized patients. *Allergy*. Sep;57(9):776-84.

Nilsson S, Persson S (1981) Tree pollen spectra in the Stockholm region (sweden), 1973–1980, *Grana*, 20:3, 179-182, DOI: 10.1080/00173138109427661

O

Okamoto Y, Horiguchi S, Yamamoto H, Yonekura S, Hanazawa T (2009). Presentsituation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergol Int.*;58(2):155-162. doi:10.2332/allergolint.08-RAI-0074

Oppenheimer JJ, Nelson HS (1993).Seasonal variation in immediate skin test reactions.*Ann Allergy*; 71: 227-9.

Ordman D (1945). Cypress pollinosis in South Africa. *S AfrMed J.*;19:142–146

Okuda M (2003) Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91(3):288–296. doi:10.1016/S1081-1206(10)63532-6

P

Pablos I, Wildner S, Asam C, Wallner M, Gadermaier G (2016). Pollen Allergens for Molecular Diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep.* Apr;16(4):31. doi: 10.1007/s11882-016-0603-z.

Palacín A, Rivas LA, Gómez-Casado C, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, Blanco C, Carrillo T, Cuesta-Herranz J, Bonny JA, Flores E, García-Alvarez-Eire MG, García-Núñez I, Fernández FJ, Gamboa P, Muñoz R, Sánchez-Monge R, Torres M, Losada SV, Villalba M, Vega F, Parro V, Blanca M, Salcedo G, Díaz-Perales A (2012). The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One.*;7(9)

Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodríguez R (2005). 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin ExpAllergy.* Mar;35(3):345-51.

Panzani R, Ariano R, Mistrello G (2010). Cypress pollen does not cross-react to plant-derived foods. *Eur Ann Allergy ClinImmunol.* Jun;42(3):125-6

Panzner P, Vachová M, Vítovcová P, Brodská P, Vlas T (2014). A comprehensive analysis of middle-European molecular sensitization profiles to pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*;164:74–82

Pâris-Köhler A, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B (2000). In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J AllergyClinImmunol.* Feb;105(2 Pt 1):339-45.

Parnia S, Brown J, Frew AJ (2002). The role of pollutants in allergic sensitization and the development of asthma. *Allergy*; 57: 1111-1117.

Pauli G (2000). Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: The role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol*; 123: 183-95

Papadopoulos NG, Agache I, Bavbek S, Bilo BM, Braido F, Cardona V et al (2012). Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clin Transl Allergy*;2:21.

- Passalacqua G, Canonica GW. AIT (allergen immunotherapy): a model for the “precision medicine”. *ClinMol Allergy* 2015;13:24.
- Payasi A, Sanwal GG (2003). Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry.*; 63(3):243–8. PMID: 12737974
- Payasi A, Misra PC, Sanwal GG (2004). Effect of phytohormones on pectate lyase activity in ripening *Musaacuminata*. *Plant PhysiolBiochem.*; 42(11):861–5. PMID: 15694279
- Perez-Badia R, Rapp A, Vaquero C, Fernandez-Gonzalez F (2011). Aerobiological study in east-central Iberian Peninsula: Pollen diversity and dynamics for major taxa. *Ann Agric Environ Med*, 18(1):99–111
- Pichler U, Hauser M, Wolf M, Bernardi ML, Gadermaier G, Weiss R, Ebner C, Yokoi H, Takai T, Didierlaurent A, Razaiani C, Briza P, Mari A, Behrendt H, Wallner M, Ferreira F (2015). Pectate lyase pollen allergens: sensitization profiles and cross-reactivity pattern. *PLoS One*. May 15;10(5).
- Pico de Coana Y, Parody N, Fuertes MÁ, Carnés J, Roncarolo D, Ariano R, Sastre J, Mistrello G, Alonso C (2010). Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from *Cupressus arizonica*. *BiochemBiophys Res Commun*;401(3):451-7
- Pirquet C von (1906). Allergie. *Munch Med Wochenschr.*;30:1457-1458.
- Pola Pola J (2003). Alergia a pólenes de Quenopodiáceas. *Alergol Inmunol Clin*; 18 (Extraordinario Núm.3):39-44
- Pola Pola J, Subiza Garrido-Lestache F.J, GarciaMenaya JM, Porcel Carreño SL (2015). Pólenes de interés en Alergología en nuestro medio En Davila IJ, Jauregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM (Ed.). *Tratado de Alergología* 254-256. Majadahonda (Madrid) España. Ergon
- Pomés A, Villalba M (2007). Alérgenos. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. *Tratado de Alergología*. Madrid: Ergon. p: 1-26.
- Popescu FD (2014). Molecular biomarkers for grass pollen immunotherapy. *World J Methodol*. Mar 26;4(1):26-45. doi: 10.5662/wjm.v4.i1.26. eCollection 2014.

Prado N, Alché Jde D, Casado-Vela J, Mas S, Villalba M, Rodríguez R, Batanero E (2014). Nanovesicles are secreted during pollen germination and pollen tube growth: a possible role in fertilization. *Mol Plant. Mar*;7(3):573-7

R

Raddi P, Moricca S, Andréoli C (2000). Cypress pollen: botanic aspects in fourteen cypress species and prospects for research. *AllergImmunol (Paris)*.;32(3):125-127.

Ramirez DA (1984). The natural history of mountain cedar pollinosis. *J Allergy ClinImmunol*.;73(1 PART 1):88-93. doi:10.1016/0091-6749(84)90489-5.

Ramírez DA (2000). The natural history of Mountain cedar pollinosis. *Allerg Immunol*; 32: 86-91

Riediker M, Monn C, Koller T, Stahel WA, Wüthrich B (2001). Air pollutants enhance rhinoconjunctivitis symptoms in pollen-allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 87: 311-318.

Rivas-Martínez S (1983) *Pisos bioclimáticos de España Lazaroa*, 5: 33-43

Rodríguez D, Davila I, Sánchez E, Barber D, Lorente F, Sánchez J (2011). Relationship between airborne pollen counts and the results obtained using 2 diagnostic methods: allergen-specific immunoglobulin E concentrations and skin prick tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*.;21(3):222-8.

Rodriguez-Pérez R (2003), Fernández Crespo J, Rodríguez J, Salcedo G. Profilin is a relevant melón allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy síndrome. *J Allergy Clin Immunol*; 111:634-639.

Roberts G, Ollert M, Aalberse R, Austin M, Custovic A, DunnGalvin A, Eigenmann PA, Fassio F, Grattan C, Hellings P, Hourihane J, Knol E, Muraro A, Papadopoulos N, Santos AF, Schnadt S, Tzeli K (2016). A new framework for the interpretation of IgE sensitization tests. *Allergy*. Nov;71(11):1540-1551.

Rusznak C, Devalia JL, Davies RJ (1994). The impact of pollution on allergic disease. *Allergy*; 49: 21-27.

S

- Sack S, Golan HG (1942). The Relationship Between Clinical Symptoms and Pollen Count in Pollinosis. *J Allergy*.;13(3):296-299.
- Sakaguchi M, Inouye S, Taniai M, Ando S, Usui M, Matuhasi T (1990). Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy*.;45(4):309-312. doi:10.1111/j.1398-9995.1990.tb00501.x.
- Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichi R, Tsunoda T, Osawa Y, et al (2010). Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol*;151:255e61.
- Sánchez-López J, Asturias JA, Enrique E, Suárez-Cervera M, Bartra J (2011). Cupressus arizonica pollen: a new pollen involved in the lipid transfer protein syndrome? *J Investig Allergol Clin Immunol*.;21(7):522-6.
- Sastre J (2010). Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exper Allergy*;40(10):1442-60.
- Scadding G1, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG, Gevaert P, Guilemany J, Kalogjera L, Lund V, Mullol J, Passalacqua G, Toskala E, van Drunen C (2011). Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *ClinTransl Allergy*. Jun 10;1(1):2.
- Schäppi GF, Taylor PE, Pain MCF, Cameron PA, Dent AW, Staff IA, et al (1999). Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy*; 25: 633-641.
- Schappi GF, Taylor PE, Staff IA, Rolland JM, Suphioglu C (1999). Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy*.; 54:478–83.
- Schwietz LA1, Goetz DW, Whisman BA, Reid MJ (2000). Cross-reactivity among conifer pollens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. Jan;84(1):87-93.
- Serrano C, Valero A, Picado C (2005). Asma y polinosis Polinosis II mra ediciones sl España

Shahali Y, Pourpak Z, Moin M, Mari A, Majd A. (2009). Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen. *Allergy*.;3:1773–1779.

Shahali Y, Pourpak Z, Moin M, Mari A, Majd A. (2009). Immunoglobulin e reactivity to Arizona cypress pollen extracts: Evidence for a 35-kDa allergen. *Allergy Eur J Allergy ClinImmunol.*;64(11):1687-1688

Shahali Y, Sutra JP, Peltre G, Charpin D, Sénéchal H, Poncet P. (2010). IgE Reactivity to Common Cypress (*C. sempervirens*) Pollen Extracts: Evidence for Novel Allergens. *World Allergy Organ J.*;3(8):229-234

Shahali Y, Sutra JP, Charpin D, et al. (2012) Differential IgE sensitization to cypress pollen associated to a basic allergen of 14 kDa. *FEBS J.*;279(8):1445-1455.

Shahali Y, Sutra JP, Fasoli E, D'Amato A, Righetti PG, Futamura N, Boschetti E, Sénéchal H, Poncet P (2012) Allergomic study of cypress pollen via combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteome* 77:101–110.

Shahali Y, Brazdova A, Calleja M, Charpin D, Sénéchal H, Poncet P (2013). Indoor, long-term persistence of cypress pollen allergenic potency: a 10-month study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Nov;111(5):428-30. doi: 10.1016/j.anai.2013.08.017. Epub 2013 Sep 18.

Shahali Y, Nicaise P, Brazdova A, Charpin D, Scala E, Mari A, Sutra JP, Chollet-Martin S, Senechal H, Poncet P (2014) Complementarity between microarray and immunoblot for the comparative evaluation of IgE repertoire of French and Italian cypress pollen allergic patients. *Folia Biol (Praha)* 60(4):192–201

Shahali Y, Sutra JP, Hilger C, Swiontek K, Haddad I, Vinh J, Guilloux L, Charpin D, Sénéchal H, Poncet P. (2017) Identification of a polygalacturonase (Cup s 2) as the major CCD-bearing allergen in *Cupressus sempervirens* pollen. *Allergy*. Nov;72(11):1806-1810. doi: 10.1111/all.13191.

Shea KM, Truckner RT, Weber RW, Peden DB (2008). Climate change and allergic disease. *J Allergy ClinImmunol.*;122(3):443-453.

Skjoth CA, Sikoparija B, Jäger S, EAN-Network (2013) Pollen sources. In: Sofiev M, Bergmann KC (eds) Allergenic pollen: A review of the production, release, distribution and health impacts. Springer Science and Business Media, Dordrecht

Sneller MR, Hayes HD, Pinnas JL (1993). Pollen changes during five decades of urbanization in Tucson, Arizona. *Ann Allergy*; 71: 519-524.

Sousa R, Osório H, Duque L, Ribeiro H, Cruz A, Abreu I (2014). Identification of *Plantago lanceolata* pollen allergens using an immunoproteomic approach. *J Investig Allergol Clin Immunol.*; 24(3):177-83.

Spieksma FT, Charpin H, Nolard N, Stix E (1980). City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). IV. Summer weed pollen (*Rumex*, *Plantago*, *Chenopodiaceae*, *Artemisia*), 1976 and 1977. *Clin Allergy*. May;10(3):319-29. Related Articles, Links

Spieksma FT, Nikkels BH, Dijkman JH (1995). Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various sizes fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clin Exp Allergy*; 25: 234-239.

Spieksma FT, Nikkels AH (1999). Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy*; 54: 235-241.

Sposato B, and Scalese M (2013). Prevalence and real clinical impact of *Cupressus sempervirens* and *Juniperus communis* sensitisations in Tuscan “Maremma”, Italy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 41: 17–24,.

Stiefel G, Roberts G (2012). How to use serum specific IgE measurements in diagnosing and monitoring food allergy. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*; 97: 29–36.

Stringari G et al (2014). The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol*. 134(1):75–81.

Solomon WR, Burge HA, Muilenberg ML (1983). Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J Allergy Clin Immunol*; 72: 443-447.

Solomon WR (1984). Aerobiology of pollinosis. *J Allergy Clin Immunol.*;74(PART 1):449-461.

Suarez-Cervera M, Takahashi Y, Vega-Maray A, Seoane-Camba JA (2003). Immunocytochemical localization of Cry j 1, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) in *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* (Cupressaceae) pollen grains. *Sex Plant Reprod*; 16:9–15.

Suárez-Cervera M, Castells T, Vega-Maray A, Civantos E, del Pozo V, Fernández-González D, Moreno-Grau S, Moral A, López-Iglesias C, Lahoz C, Seoane-Camba JA (2008). Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains *Ann Allergy Asthma Immunol.* Jul;101(1):57-66. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60836-8.

Suárez Cervera M, Vega-Maray A, Seoane-Camba JA (2008). Biología celular del polen: factores de biodiversidad. En: *Polinosis III: Polen y Alergia*. eds. Valero AL, Cadahía A. Madrid: MRA Ediciones S.L.;;13-19.

Subiza E, Subiza J, Jerez M (1986). Palinología En: Basomba A. et al eds. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Vol IV. Madrid, SEAIC-Lab Bayer,; 211-56 10.

Subiza E., Subiza J., Jerez M (1989). Introducción a la aerobiología de las gramíneas en los climas de España. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 4: 45-50.

Subiza J, Jerez M, Subiza E (1992). Introducción a la aerobiología de las gramíneas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 7: 151-161.

Subiza J, Cabrera M, Valdivieso R, Subiza J-L, Jerez M, Jiménez JA, et al (1994). Seasonal asthma caused by airborne *Platanus* pollen. *Clin Exp Allergy*; 24: 1123-1129.

Subiza J (1995). Pollen counts as a tool for clinical research. In: Basomba A and Sastre J eds. *Postgraduate courses and practical workshops; Syllabus*. Valencia ECACI-95.: 305-311.

Subiza J, Jerez M, Jiménez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Valera S, Subiza E (1995). Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol*; 96: 15-23.

Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A, Fernández J, Jerez M, Ferreiro M (1998).
Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 13: 45-58.

Subiza J., Jerez M., Gavilán M.^a J., Varela S., Rodríguez R., Narganes M.^a JJiménez, J. A., Tejada Cazorla J., Fernández Pérez C., Cabrera M y Subiza E (1998). ¿Cuáles son los pólenes que producen polinosis epidémica en el medio urbano de Madrid? *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín*, Abril Vol. 13, Núm. 2, pp. 107-119

Subiza J (2001). Cómo interpretar los recuentos de pólenes. *Alergol Inmunol Clin*; 16: 59-65

Suvunrunsi R, Sullivan TJ (1982). Isolation and characterization of mountain cedar allergen. *J Allergy ClinImmunol*: 69: 126

Suzuki M, Komiyama N, Itoh M, Itoh H, Sone T, Kino K, Takagi I, Ohta N (1996). Purification, characterization and molecular cloning of Cha o 1, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *MolImmunol*. Mar-Apr;33(4-5):451-60.

Swoboda II, Grote M, Verdino P, Keller W, Singh MB, De Weerd N, Sperr WR, Valent P, Balic N, Reichelt R, Suck R, Fiebig H, Valenta R, Spitzauer S (2004). Molecular characterization of polygalacturonases as grass pollen-specific marker allergens: expulsion from pollen via submicronic respirable particles. *J Immunol*. May 15;172(10):6490-500

T

Taketomi EA1, Sopelete MC, de Sousa Moreira PF, de Assis Machado Vieira F (2006). Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Braz J Otorhinolaryngol*. Jul-Aug;72(4):562-7.

Tanihara S, Oki I, Ojima T, Nakamura Y, Yanagawa H (1999). Process and current status of the epidemiologic studies on cedar pollinosis in Japan. *J Epidemiol.*;9(1):20-26.

Taniguchi Y, Ono A, Sawatani M, Nanba M, Kohno K, Usui M, et al (1995). Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy*.; 50:90–3. PMID: 7741195

Tavira Muñoz J, Tormo Molina R, Muñoz Rodríguez AF, Silva Palacios I, Gonzalo Garijo M^aA (1998). Calendario polínico de la ciudad de Cáceres. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*; 13: 288-293.

Tas J (1965) . Hay Fever Due To the Pollen of *Cupressus Sempervirens*. *Allergy*.;20(5):405-407. doi:10.1111/j.1398-9995.1965.tb03073.x

Taylor PE, Flagan RC, Miguel AG, Valenta R, Glovsky MM (2004). Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin Exp Allergy*.; 34:1591–6.

Thomas P, Deutinger P, Heubl G, Strube D, Przybilla B (1996). Influence of gaseous pollutants on pollen viability, germination and protein release. *Journal of allergy and clinical immunology* 97: 218 -218

Tinghino R, Twardosz A, Barletta B, Puggioni EMR, Iacovacci P, Butteroni C, Afferni C, Mari A, Hayek B, Di Felice G, Focke M, Westritschnig K, Valenta R, Pini C. J (2002). Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens. *Allergy Clin Immunol.*, 3 14-320

Tomassen MM, Barrett DM, van der Valk HC, Woltering EJ (2007) Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. *J Exp Bot* 58(5):1151–1160.

Tormo-Molina R Gonzalo-Garijo MA, Silva-Palacios I, Muñoz-Rodríguez AF (2010). General trends in airborne pollen production and pollination periods at a Mediterranean site (Badajoz, southwest Spain). *J Investig Allergol Clin Immunol*.

Truong van ut C, Trébuchon F, Birnbaum J, Agell M, Navarro-Rouimi R, Gentile G, Charpin D (2012) Knowledge and behavior of patients with allergic rhinitis during a consultation with primary care in general practitioner. *Rev Fr Allerg* 52(6):429–436

Tuppo L, Alessandri C, Pomponi D, Picone D, Tamburrini M, Ferrara R, Petriccione M, Mangone I, Palazzo P, Liso M, Giangrieco I, Crescenzo R, Bernardi ML, Zennaro D,

Helmer- Citterich M, Mari A, Ciardiello MA (2013) Peamaclein—a new peach allergenic protein: Similarities, differences and misleading features compared to Pru p 3. *Clin Exp Allergy* 43(1):128–140. doi:10.1111/cea.12028

V

Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D, et al (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med.* Feb 1;175(2):377-85.

Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grondlund H (1999). The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRDand CRIT). *ClinExp Allergy*; 29: 896-904.

Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy (2007). *J Allergy ClinImmunol.* Apr;119(4):826-30.

Valenta R, Twaroch T, Swoboda I (2007). Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J InvestigAllergolClinImmunol.*;17Suppl 1:36-40

Van Ree R (2002). Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*; 129: 189–197.

Varela Losada S. Polinosis por Platanus (2003). *Alergol Inmunol Clin*; 18 (Extraordinario Núm.3):81-85

Varela S, Subiza J, Subiza JL, Rodríguez R, García B, Jerez M, et al (1997). Platanus pollen as an important cause of pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*; 100: 748-754.

Velloso A, Pérez C, Martín E, Fernández M, Rubio M (2002). Alergia a pólenes en Madrid: frecuencia de polisensibilizados en adultos. *Alergol Inmunol Clin*; 17 (Extr. 2): 248-249(A).

Vidal C, Dopazo A, Aira MJ (2001). Parietaria pollinosis in an Atlantic area: clinical and palynological data. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 11: 107-111.

Vidal C, Sanmartín C, Armisén M, Rodríguez V, Linneberg A, Gonzalez-QuintelaA (2012). Minor interference of cross-reactive carbohydrates with the diagnosis of

respiratory allergy in standard clinical conditions. *Int Arch Allergy Immunol.*;157(2):176-85. doi: 10.1159/000324447. Epub 2011 Oct 6

Vidal C, Enrique E, Gonzalo A, Moreno C, Tabar AI (2014); Expert Clinical Participants. Diagnosis and allergen immunotherapy treatment of polysensitized patients with respiratory allergy in Spain: an Allergists' Consensus. *Clin Transl Allergy.* Nov 7;4:36. doi: 10.1186/2045-7022-4-36.

Villalba Díaz M., Barber Hernandez D., Pomés A (2015). Alérgenos. 133-150. En Davila JJ, Jauregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM (Ed.). *Tratado de Alergología* 254-256. Majadahonda (Madrid) España. Ergon

Vinciger S, Smets E (2001). The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy*; 56: 1129-1136.

Vinckier S, Smets E (2001). The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy.*;56(12):1129-1136.

Vohlonen I, Terho EO, Koivikko A, Vanto T, Holmén A, Heinonen OP. (1989). Reproducibility of the skin prick test. *Allergy.* Nov;44(8):525-31.

W

Wang Q, Nakamura S, Lu S, Xiu G, Nakajima D, Suzuki M, Sakamoto K, Miwa M (2012). Release behavior of small sized daughter allergens from *Cryptomeria japonica* pollen grains during urban rainfall event. *Aerobiologia* 28(1):71–81.

Wark PA, Simpson J, Hensley MJ, Gibson PG. (2002) Airway inflammation in thunderstorm asthma. *Clin Exp Allergy.*; 32:1750–6. [PubMed: 12653167]

Weber RW. (2001) Cross-reactivity of plant and animal allergens. *Clin Rev Allergy Immunol.* Oct;21(2-3):153-202.

Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, Stapel SO, Bruijnzeel-Koomen CA, Aalberse RC et al. (2002). IgE to Bet v1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol.*; 110: 435-442.

Wilson JM, Platts-Mills TAE (2018) Meat allergy and allergens. *Mol Immunol.* Apr 20. pii: S0161-5890(18)30097-X. doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.018.

Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, S. M. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *PlantMol Biol*. 1989; 14(1):17–28.

Wopner N, Dissertori O, Ferreira F, Lackner P (2007). Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*; 27:29-44.

Y

Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, Shida T (1983). Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol*, 71(1 Pt1):77–86

Yasueda H, Saito A, Sakaguchi M, Ide T, Saito S, Taniguchi Y, Akiyama K, Inouye S (2000). Identification and characterization of a group 2 conifer pollen allergen from *Chamaecyparis obtusa*, a homologue of Cry j 2 from *Cryptomeria japonica*. *ClinExp Allergy*.; 30: 546-50.

Yli-Panula E, Takahashi Y, Rantio-Lehtimäki A (1997). Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne grass-pollen antigens. *Allergy*; 52: 541-546.

Z

Ziska LH, Gebhard DE, Frenz DA, Faulkner S, Singer BD, Straka JG (2003). Cities as harbingers of climate change: Common ragweed, urbanization, and public health. *J Allergy Clin Immunol*; 111: 290-295.