

Lucía Ferrer Clavería

Correlación entre la clínica y la concentración de polen de
Chenopodiaceae/Amaranthaceae
en la ciudad de Zaragoza: estudio
EPOSAL

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Sebastián Ariño, Antonio Francisco
Carnés Sánchez, Jerónimo
Colás Sanz, Carlos

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

**CORRELACIÓN ENTRE LA CLÍNICA Y
LA CONCENTRACIÓN DE POLEN DE
*CHENOPODIACEAE/AMARANTHACE
AE* EN LA CIUDAD DE ZARAGOZA:
ESTUDIO EPOSAL**

Autor

Lucía Ferrer Clavería

Director/es

Sebastián Ariño, Antonio Francisco
Carnés Sánchez, Jerónimo
Colás Sanz, Carlos

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2015



Universidad de Zaragoza
Facultad de Medicina

Tesis doctoral Dra. Lucía Ferrer Clavería 2015



Correlación entre la clínica y la concentración de polen de
Chenopodiaceae/Amaranthaceae en la ciudad de Zaragoza:
"ESTUDIO EPOSAL"



Universidad de Zaragoza

Departamento de Medicina y Cirugía

**Correlación entre la clínica y la concentración de polen de
Chenopodiaceae/Amaranthaceae en la ciudad de Zaragoza:**

“ESTUDIO EPOSAL”

Dra. Lucía Ferrer Clavería

Director:

Dr. Antonio Sebastián Ariño
Facultativo Especialista Neumología
Hospital Clínico de Zaragoza

Co-director:

Dr. Carlos Colas Sanz
Facultativo Especialista Alergología
Hospital Clínico de Zaragoza

Co-director:

Dr. Jerónimo Carnés Sánchez
Director de Departamento de I+D
Laboratorios Leti en Tres Cantos (Madrid)

DR. D. ANTONIO SEBASTIAN ARIÑO, PROFESOR ASOCIADO DE NEUMOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, HAGO CONSTAR:

Qué D^a Lucía Ferrer Clavería ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: ***“Correlación entre la clínica y la concentración de polen de Chenopodiaceae/Amaranthaceae en la ciudad de Zaragoza: Estudio EPOSAL”*** para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad, rigor científico y metodológico adecuado para ser sometido a la lectura y discusión ante el Tribunal designado para el caso.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Zaragoza, a 30 de Septiembre de 2015.

Fdo: Dr. D. Antonio Sebastián Ariño

DR. D. CARLOS COLAS SANZ, JEFE DE SERVICIO DE ALERGOLOGIA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESA DE ZARAGOZA, HAGO CONSTAR:

Qué D^a Lucía Ferrer Clavería ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: ***“Correlación entre la clínica y la concentración de polen de Chenopodiaceae/Amaranthaceae en la ciudad de Zaragoza: Estudio EPOSAL”*** para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad, rigor científico y metodológico adecuado para ser sometido a la lectura y discusión ante el Tribunal designado para el caso.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Zaragoza, a 30 de Octubre de 2015.

Fdo: Dr. D. Carlos Colas Sanz

DR. D. JERONIMO CARNÉS SANCHEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE I+D DE LA UNIDAD DE INMUNOLOGÍA Y ALERGIA DE LABORATORIOS LETI EN TRES CANTOS (MADRID), HAGO CONSTAR:

Qué D^a Lucía Ferrer Clavería ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: ***"Correlación entre la clínica y la concentración de polen de Chenopodiaceae/Amaranthaceae en la ciudad de Zaragoza: Estudio EPOSAL"*** para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad, rigor científico y metodológico adecuado para ser sometido a la lectura y discusión ante el Tribunal designado para el caso.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Zaragoza, a 30 de Octubre de 2015.



Fdo: Dr. D. Jerónimo Carnes Sánchez

A mis padres Toño e Hilda

A mi hermano Choche

A Oscar, Martita y Ana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los directores de tesis el Dr. Carlos Colas, Dr. Jerónimo Carnes y el Dr. Antonio Sebastián por haber apoyado este proyecto y haberme dado la oportunidad de poder realizar esta tesis doctoral, así como por toda su paciencia, comprensión y ayuda.

A José Antonio Domínguez, que se implicó desde el primer día en todo el trabajo de campo, que me enseñó a buscar, reconocer y clasificar a las especies y que sin él este trabajo no hubiese sido lo mismo.

A los Dres. Jesús Pola y Cristina Zapata por su colaboración en el recuento de polen en Zaragoza.

A todos mis compañeros del Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, con los que he sufrido codo con codo la selección y seguimiento de los pacientes y en especial a mis compañeras de residencia las Dras. Sara San Juan de la Parra, Beatriz Rojas-Hijazo y María Teresa Sobrevía Elfau, que me han mostrado su apoyo todos los días dentro y fuera del servicio y han aportado también su granito de arena en la realización de esta tesis.

Al departamento de I+D de laboratorios Leti, que me han ayudado en la realización del estudio inmunológico y en especial a María Ángeles López-Matas y Beatriz Martínez Moral de las que tanto he aprendido en el laboratorio y las que siempre han estado allí para todas mis dudas.

A los pacientes que han participado en este estudio y a los que les he robado parte de su tiempo en llenar cuadernillos y cuestionarios día tras día.

A mis amigos por su paciencia, y en especial a Toñi por todos sus cuidados tanto a mí como a mis niñas en esta última fase de la tesis.

A Oscar por su confianza, comprensión y apoyo. A mis hijas Marta y Ana por haberme dado una inyección de alegría y superación.

A mi madre por su apoyo incondicional, su ayuda y su perseverancia día a día para que terminara esta tesis.

A mi hermano por su constante estímulo y su positividad.

En especial a mi padre, que me animó a comenzar esta tesis, y al que le debo junto a mi madre todo lo que soy, sin ellos nunca habría llegado hasta aquí.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1.	Conceptos	20
1.2.	Taxonomía.....	24
1.2.1.	<i>Chenopodiaceae</i>	24
1.2.1.1.	<i>C. album L</i>	27
1.2.1.2.	<i>C. vulvaria L</i>	29
1.2.1.3.	<i>C. murale L</i>	30
1.2.1.4.	<i>B. scoparia L</i>	31
1.2.1.5.	<i>A. halimus L</i>	32
1.2.1.6.	<i>A. patula L</i>	33
1.2.1.7.	<i>S. kali L</i>	34
1.2.1.8.	<i>S. vermiculata L</i>	37
1.2.1.9.	<i>S. oppositifolia L</i>	37
1.2.2.	<i>Amaranthaceae</i>	38
1.2.2.1.	<i>A. deflexus L</i>	39
1.2.2.2.	<i>A. muricatus L</i>	40
1.3.	Aerobiología	41
1.3.1.	Morfología del polen y polinización.....	41
1.4.	Alérgenos en <i>Chenopodiaceae</i>	48
1.5.	Reactividad cruzada entre <i>Chenopodiaceae</i> y <i>Amaranthaceae</i>	52
1.6.	Estudio in vitro de las <i>Chenopodiaceae</i> y <i>Amaranthaceae</i>	55
1.7.	Clasificación de rinitis	55
1.7.1.	Documento ARIA	56
1.8.	Clasificación del asma	56

II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
III.	MATERIAL Y METODOS	
3.1.	Diseño del estudio	64
3.2.	Población a estudio.....	64
3.2.1.	Criterios de inclusión y exclusión.....	64
3.2.2.	Recogida de datos clínicos	66
3.2.2.1.	Registro de síntomas	67
3.2.2.2.	Escala analógica visual.....	68
3.2.2.3.	Cuestionario de calidad de vida para rinitis.....	68
3.2.3.	Exploraciones complementarias.....	68
3.2.3.1.	Espirometría forzada.....	68
3.2.3.2.	Medición de óxido nítrico exhalado.....	69
3.2.4.	Extracción sanguínea.....	69
3.3.	Prueba cutánea.....	70
3.3.1.	Metodología de la prueba cutánea.....	71
3.3.2.	Extractos	71
3.3.3.	Recogida de resultados	71
3.4.	Materia prima.....	72
3.5.	Fabricación de extractos.....	73
3.5.1.	Desengrasado de la materia prima.....	73
3.5.2.	Fabricación del extracto.....	73
3.6.	Caracterización de los extractos	74
3.6.1.	Determinación del contenido proteico.....	74

3.6.2. Caracterización antigénica de los extractos.....	75
3.6.2.1. SDS-PAGE.....	75
3.6.2.2. Isoelectroenfoque.....	78
3.6.2.3. Electroforesis bidimensional.....	80
A. Precipitación de extractos.....	80
B. Primera dimensión.....	81
C. Segunda dimensión.....	81
3.6.2.4. Detección de glicoproteínas.....	81
3.7. Perfil alergénico.....	82
3.7.1. Inmunoblotting IgE.....	82
3.7.2. Procesamiento de las imágenes y medida de los alérgenos antigénicamente más relevantes.....	85
3.8. Determinación de IgE específica.....	86
3.8.1. Marcaje de alérgenos con Biotina.....	86
3.8.2. Determinación de IgE específica a <i>S.kali</i> mediante UNICAP100	89
3.8.3. Procedimiento de ensayo manual en UNICAP 100.....	89
3.9. Recuento de polen.....	89
3.10. Fenología de la floración en <i>Chenopodiaceae/Amaranthaceae</i>	90
3.10.1. Selección de especies.....	90
3.10.2. Floración.....	92
3.10.2.1. Método general.....	92
3.10.2.2. Método específico.....	94
3.11. Metodología estadística.....	94

IV. RESULTADOS

4.1.	Características de los pacientes.....	99
4.1.1.	Datos demográficos.....	99
4.1.2.	Recogida de datos clínicos.....	102
4.1.2.1.	Registro de síntomas y polen en el año 2007.....	102
4.1.2.2.	Escala analógica visual.....	104
4.1.2.3.	Cuestionarios de calidad de vida para la rinitis...	105
4.1.3.	Exploraciones complementarias.....	107
4.1.3.1.	Espirometría forzada	107
4.1.3.2.	Medición de óxido nítrico exhalado.....	107
4.2.	Prueba cutánea.....	108
4.2.1.	Resultados de las pruebas cutáneas.....	108
4.3.	Caracterización de extractos.....	111
4.3.1.	Determinación del contenido proteico.....	111
4.3.2.	Caracterización antigénica de los extractos.....	112
4.3.2.1.	SDS-PAGE.....	112
4.3.2.2.	Isoelectrofoque.....	114

4.4.	Perfil alergénico.....	121
4.4.1.	Inmunoblotting IgE.....	121
4.4.2.	Procesamiento de las imágenes y medida de los alérgenos antigénicamente más relevantes.....	122
4.5.	Determinación de IgE específica.....	126
4.5.1.	Determinación de IgE específica a alérgenos con Biotina.....	126
4.5.2.	Determinación de IgE específica a <i>S.kali</i> mediante UNICAP100.....	131
4.6.	Recuento de polen.....	132
4.7.	Fenología de la floración en <i>Chenopodiaceae/Amaranthaceae</i>	133
4.7.1.	Método general de visu.....	133
4.7.2.	Método específico o semicuantitativo de Orshan.....	137
4.7.3.	Comparación del método general y específico de Orshan....	140
4.7.4.	Correlación entre floración y polen.....	143
4.7.5.	Correlación entre floración y síntomas.....	153
V.	DISCUSIÓN	162
VI.	CONCLUSIONES	178
VII.	ANEXOS	181

VIII. BIBLIOGRAFIA.....	192
Abreviaturas.....	14

ABREVIATURAS

A.deflexus: *Amarantus deflexus*

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*

A. halimus: *Atriplex halimus*

A. latifolia: *Atriplex latifolia*

A. muricatus: *Amarantus muricatus*

A. patula: *Atriplex patula*

A. tenuis: *Alternaria tenuis*

ARIA: Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma

CPA: Células presentadoras de antígeno

C.album: *Chenopodium album*

C. dactylon: *Cynodon dactylon*

C. murale: *Chenopodium murale*

C. sempervirens: *Cupressus sempervirens*

C. vulvaria: *Chenopodium vulvaria*

BSA: Albumina de suero bovino

B.scoparia: *Bassia scoparia*

D. pteronyssinus: *Dermatophagoides pteronyssinus*

E.A.A.C.I: Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica

ELISA: Enzima Inmunoensayo en fase sólida

Fc: Región Fc de la Inmunoglobulina

FC ϵ RI: Receptor específico de alta afinidad

FEV1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FEM: Flujo espiratorio máximo (En Inglés: PEF)

FENO: Determinación de óxido nítrico exhalado

FVC: Capacidad vital forzada

GINA: The Global Initiative on Asthma

GM-CSF: Factor estimulador de granulocitos y macrófagos

HLA: Antígeno mayor de histocompatibilidad

IACS: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

IL: Interleucinas

IPG: tiras de gradiente isoelectrónico proteico

K/Da: kilodalton

KU/L: kilo unidades litro

L. destructor: *Lepidoglyphus destructor*

PBS: tampón fosfato salino (del Inglés: saline buffer phosphate)

PME: Pectin metil esterasa

Ppb: partes por billón

Ppm: partes por millón

Rpm: revoluciones por minuto

PVDF: difluoruro de polivinilo

S. kali: *Salsola kali*

SDS: gel de dodecil sulfato sódico

SEAIC: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

SPRINT: Estudio de la calidad de vida en pacientes con rino-conjuntivitis

S. oppositifolia: *Salsola oppositifolia*

S. vermiculata: *Salsola vermiculata*

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (del Ingés PolyAcrylamida Gel

Electrophoresis)

P. acerifolia: *Platanus acerifolia*

P. judaica: *Parietaria judaica*

P. pratense: *Phleum pratense*

PI: Punto Isoeléctrico

PK: transferencia pasiva del suero

O. europaea: *Olea europaea*

OMS: Organización Mundial de la Salud

RAST: Radioallergoabsorbent test (prueba de detección de anticuerpos IgE)

V: voltaje

W: trabajo

La desertización es cada día más importante en nuestro país y en concreto en nuestra comunidad, Aragón, donde la cuarta parte del suelo está afectado por procesos de desertificación de carácter alto o muy alto, según datos del Ministerio de Medio Ambiente¹. El 28,66% de la superficie de la comunidad, es decir, 13.676 kilómetros cuadrados, el equivalente del territorio que ocupa la provincia de Teruel, se encuentra en esta situación. El nivel de desertización de Aragón únicamente es superado por Andalucía (con una afectación del 58,46% de su suelo), Canarias (88,47%), Castilla-La Mancha (43,68%), Cataluña (41,88%), Murcia (99,09%) y Valencia (93,04%). La provincia de Zaragoza es una de las zonas más afectadas junto con la de Teruel. La aparición de estas áreas cada vez más extensas, el cambio climático y la sequía, favorece el crecimiento y la expansión de plantas que crecen en suelos en transformación como son las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*.

La sensibilización IgE mediada frente a la familia de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* es una causa frecuente de alergia respiratoria en algunas regiones de Europa, Norte América, Australia, área Mediterránea y países Árabes². En España se encuentran en el área centro peninsular con dos zonas predominantes el valle del Ebro y el área de confluencia entre Almería, Albacete y Murcia, que son áreas semidesérticas con una pluviosidad inferior a 300 litros anuales.

En los últimos años se han estado realizando diferentes estudios en la población de Zaragoza para valorar la sintomatología de los pacientes alérgicos a este polen, y el desarrollo de un tratamiento a través de inmunoterapia específica eficaz y segura³. En estos estudios se ha venido observando que pacientes monosensibles a polen de *Chenopodiáceas* presentaban un decalaje entre la sintomatología y la concentración de

este polen, encontrándonos sobre todo las máximas concentraciones de polen en los meses de julio y agosto, mientras que muchos de los pacientes refieren síntomas desde mayo hasta octubre⁴.

En la actualidad existen pocos estudios acerca de la relevancia clínica y alergénica de las diferentes especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, disponiendo únicamente de polen de *C. album* y *S. kali* en el diagnóstico y tratamiento habitual de los pacientes. Además la imposibilidad de diferenciar a microscopia óptica los diferentes pólenes de estas especies, hacen todavía más difícil el estudio de estas plantas y su relevancia clínica.

El objetivo de nuestro estudio es conocer las especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* más relevantes en el área de Zaragoza, así como hacer un seguimiento de la floración de las especies seleccionadas, correlacionarlas con la concentración de polen ambiental y con la sintomatología de pacientes monosensibles durante 6 meses, a lo largo del año 2007. Se llevará a cabo también un estudio *in vitro* para valorar el perfil de alergenicidad de estas especies y su reactividad cruzada.

I. Introducción

1.1. Conceptos

El término **hipersensibilidad** hace referencia a aquellas reacciones del sistema inmunitario en las que la respuesta al inmunógeno ocasiona además, daños a los tejidos propios. Entre las causas habituales que desencadenan las reacciones de hipersensibilidad se encuentran el fallo en el establecimiento de la autotolerancia y las respuestas incontroladas o excesivas frente a antígenos extraños.

Las enfermedades asociadas a fenómenos de hipersensibilidad constituyen un grupo heterogéneo. No obstante, suelen clasificarse en función del tipo de respuesta inmune implicada y de la naturaleza de los mecanismos efectores que causan el daño tisular. Así suelen distinguirse 4 tipos de hipersensibilidad (tabla 1) según la clasificación de Coombs y Gell (1963)⁵.

TIPO	NOMBRE	MECANISMO	Mediadores
I	Inmediata	IgE	Mastocitos y mediadores
II	Citotóxica	IgG ó IgM	Opsonización, fagocitosis
IIa	Citotóxica	IgG ó IgM	Citólisis
IIb	Citotóxica	IgG ó IgM	Estimulación indirecta
III	Inmunocomplejos	IgG	Complemento, leucocitos
IVa	Retardada	Linfocitos Th	Citocinas
IVb	Retardada	Linfocitos Tc	Citotóxicidad

Tabla 1: Tipos de reacciones de hipersensibilidad.

La reacción de hipersensibilidad tipo I, se produce cuando una respuesta de anticuerpos, generalmente IgE, se dirige frente a un antígeno inocuo para un alto porcentaje de la población, como por ejemplo el polen, ácaros o el epitelio de animales. En este tipo de reacción, tras un primer contacto se produce IgE específica como respuesta al inmunógeno. Esta IgE específica se fija a la membrana de mastocitos y basófilos a través de receptores específicos de alta afinidad (Fc ϵ RI). Una segunda exposición al alérgeno da lugar a la interacción de la IgE con el antígeno, produciéndose la agregación de los Fc ϵ RI correspondientes, lo que provoca la activación de mastocitos y basófilos y liberación de los mediadores responsables de las manifestaciones clínicas. Estos mediadores causan vasodilatación con aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, agregación de plaquetas, infiltrado inflamatorio de eosinófilos, aumento de la secreción de moco y estímulo de los nervios sensitivos. Estas acciones, clínicamente se manifiestan según el órgano en el actúen. En la piel producen eritema, lesiones habonosas, angioedema y prurito; broncoespasmo y aumento de la secreción de moco en los bronquios; rino-conjuntivitis en la vía aérea superior y diarrea y vómitos en el tracto digestivo.

La afectación sistémica o anafilaxia se produce cuando los mediadores actúan de forma generalizada afectando a más de 2 órganos.

La producción de IgE depende de su síntesis en las células B y estas a su vez de la presentación del antígeno específico por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) y la cooperación que se produce entre las células B y células Th2. Además, la producción de IgE requiere la liberación de citocinas por parte de las células Th2, y en particular de IL4. La IL4 induce a las células TCD4+ a diferenciarse en células Th2 e inhibe el desarrollo de las células Th1. Una vez que las células Th2 son activadas, liberan

diversas señales moleculares en las células B, que favorecen el cambio de isotipo a IgE⁶.

Localmente, la producción de IgE primero sensibiliza a los mastocitos que hay en la zona de contacto con el antígeno, después entra en el torrente sanguíneo y se une a receptores específicos de basófilos circulantes y mastocitos de los tejidos (figura 1). La IgE es capaz de unirse a los mastocitos y basófilos a través de su fragmento Fc, con alta afinidad.

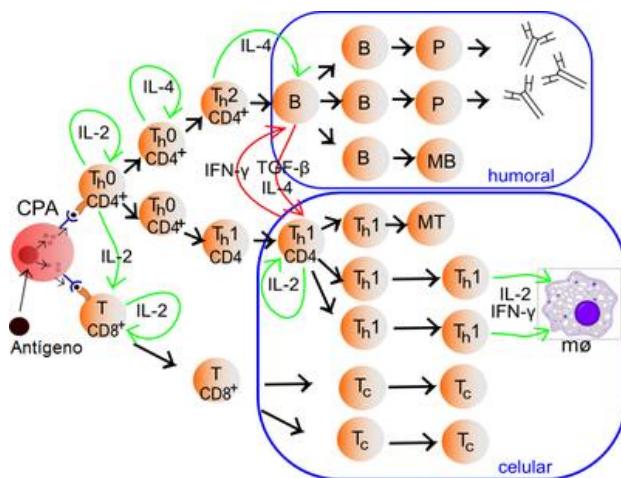


Figura 1: Mecanismo de presentación del antígeno a los linfocitos T.
(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d6/Lymphocyte_activation-es.png/400px)

El contacto inicial del alérgeno con la mucosa, produce una serie de sucesos antes de que se libere la **IgE**. La producción de IgE por las células B depende de las células presentadoras de antígeno (CPA) y la cooperación entre células B y linfocitos Th.

La **IgE** tiene una estructura formada por dos cadenas pesadas, con cinco dominios y dos cadenas ligeras (figura 2 y 3). La característica más relevante de la IgE es su sensibilidad al calor y su capacidad de unirse a mastocitos y basófilos por su receptor de alta afinidad. Aunque la vida media de la IgE libre en suero es solo de unos pocos días, los mastocitos pueden quedar sensibilizados durante muchos meses debido a la

unión IgE- Fc ϵ RI, que protege a la IgE de la digestión por las proteasas. Los niveles de IgE se encuentran elevados en sujetos con alergia y muy elevados en infestaciones parasitarias. La determinación de IgE por si sola no predecirá un estado de alergia, son necesarios factores genéticos y ambientales que juegan un papel muy importante en la expresión clínica de los síntomas.

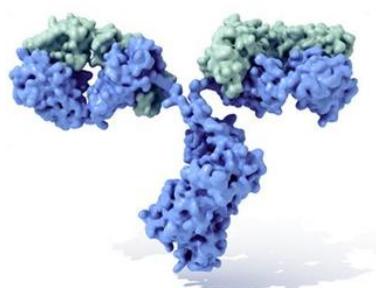


Figura 2: Estructura de la inmunoglobulina IgE.

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Inmunoglobulina.png/320px-Inmunoglobulina.png>)

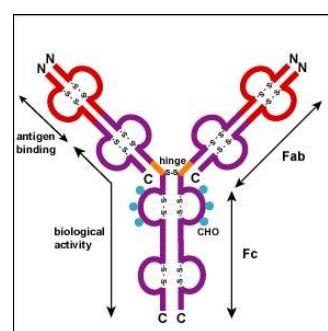


Figura 3: Presenta dos cadenas pesadas con cinco

dominios y una ligera con dos. Dentro de estas se encuentran la región variable y constante. (http://patorial.umayor.cl/inmunodef/ap_inmuno/Image13.jpg).

Los **alérgenos** son antígenos de naturaleza proteica, que sensibilizan al hospedador produciendo reacciones alérgicas. Las fuentes alergénicas son diversas e incluyen ácaros del polvo, polen, esporas de hongos, epitelios de animales, drogas y alimentos⁷, entre otras. Los verdaderos antígenos son en su mayoría proteínas o

glicoproteínas de masa molecular en un rango de 5.000-50.000 Daltons, pero también existen algunas moléculas fuera de este rango que han sido identificadas como alérgenos activos⁸.

1.2. Taxonomía

Las *Chenopodiáceas* y *Amarantáceas* son plantas que comparten características botánicas y que presentan un polen indistinguible a microscopia óptica, motivo por el cual se tratan habitualmente en la literatura de forma conjunta. Ambas pertenecen al orden de los *Caryophyllales*, subclase *Dicotyledonia*, clase *Magnolipsida* y subdivisión *Angiospermae*⁹.

El orden de las *Caryophyllales* posee más de 8000 especies diferentes. Se caracterizan por tener flores pequeñas, un ovario unilocular con un rudimento seminal en su base y fruto nuciforme.

1.2.1. *Chenopodiaceae*

La familia de las *Chenopodiaceae* incluye dos subfamilias: *Chenopedioideae* y *Spiroloboideae*. A la primera de ellas pertenecen las plantas del género *Chenopodium*, *Bassia*, *Beta* y *Atriplex*, entre otras. En la subfamilia *Spiroloboideae* destaca el género *Salsola* (tabla 2).

En ella se integran más de 100 géneros, con un total de 1500 especies, que se distribuyen ampliamente por las zonas templadas y subtropicales del globo, ocupando zonas ruderализadas. Son muy resistentes a la sequía y crecen en suelos salinos y secos (bordes de caminos, escombreras,...), por lo que encontramos en la bibliografía numerosos estudios en áreas desérticas como Kuwait, Arabia Saudita, Israel, Emiratos

Árabes y Texas, así como en el sur de Europa. En España se encuentran distribuidas en el área centro peninsular y levante.

Dentro de esta familia nos encontramos plantas de interés alergológico como *Chenopodium album*, *Salsola kali* o *Atriplex halimus*, plantas que se utilizan en la alimentación como la espinaca (*Spinacia oleraceae*), la acelga (*Beta vulgaris cicla*) o la remolacha (*Beta vulgaris*) y también plantas utilizadas en la ornamentación como la *Bassia scoparia* o *Atriplex halimus*. Muchas especies de *Chenopodium* y *Salsola* son consideradas malas hierbas.

Las *Chenopodiáceas* son plantas anemófilas, es decir polinizan por el viento. En cuanto al porte o aspecto general de la planta, pueden ser herbáceas o arbustivas, con una duración anual, es decir, nacen, se desarrollan florecen y fructifican en el mismo año o pueden tener duración perenne viviendo en este caso 3 ó más años. El indumento o superficie puede ser carente de pelo (glabra), o bien glandular (pelos convertidos en glándulas secretoras) o farinosas. La disposición de las hojas en los tallos puede ser dos hojas enfrentadas en cada nudo (opuestas) o pueden sucederse a lo largo del tallo sin orden definido (alternas). La morfología de las hojas es simple, es decir con una extensión continuada. La flor presenta una simetría en más de 2 planos (actinomorfa) y pueden ser hermafroditas o unisexuales.

Familia	Subfamilia	Género	Especie
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodoioideae</i>	<i>Chenopodium</i>	<i>album</i>
			<i>vulvaria</i>
			<i>murale</i>
		<i>Bassia</i>	<i>hyssopifolia</i>
			<i>scoparia</i>
		<i>Sarcobatus</i>	<i>vermiculatus</i>
		<i>Atriplex</i>	<i>halimus</i>
			<i>patula</i>
			<i>canescens</i>
			<i>polycarpa</i>
			<i>lentiformis</i>
			<i>wrightii</i>
			<i>coerifolia</i>
		<i>Eurotia</i>	<i>lanata</i>
		<i>Suaeda</i>	<i>marítima</i>
		<i>Dondia</i>	<i>sussrutescens</i>
		<i>Allenrolfia</i>	<i>occidentales</i>
		<i>Axyris</i>	<i>amaranthoides</i>
		<i>Beta</i>	<i>vulgaris</i>
		<i>Spinacia</i>	<i>oleracea</i>
	<i>Spiroloboideae</i>	<i>Salsola</i>	<i>kali</i>
			<i>vermiculata</i>
			<i>oppositifolia</i>
			<i>soda</i>

Tabla 2: Clasificación de algunas especies de la familia *Chenopodiaceae* de interés alergológico.

Se destacan en color las especies que se han utilizado en este trabajo.

1.2.1.1 *C. album* L.

Es el principal representante de la familia *Chenopodiaceae* desde el punto de vista alergológico. Planta de duración anual, de indumento glabro o farinoso. Es una cizaña de altura entre 20 y 120 cm, con hojas ovado-rómbicas las inferiores y medias, dentadas o enteras, mientras que las superiores son más estrechas ovado-rómbicas, lanceoladas o elípticas. Las flores son hermafroditas reunidas en glomérulos formando inflorescencias espiciformes, con perianto de 5 sépalos soldados hasta la mitad, aquillados y farinosos (figura 4). El androceo tiene 5 estambres, con filamentos de 1 a 1,2 mm y anteras de 0,4 mm, de color amarillo. El ovario presenta 2 estigmas filiformes. Los aquenios son papilosos y las semillas tienen un diámetro de 1 a 1,4 mm horizontales, lenticulares, negras, lisas o ligeramente reticuladas (figura 5). El periodo de floración corresponde a la época veraniega tardía, en general, de junio a octubre. Se le conoce con el nombre común de “cenizo blanco”¹⁰.



Figura 4: Imagen de *C. album*

(<http://www.commanster.eu/commanster/Plants/Flowers/SpFlowers/Chenopodium.album2.jpg>)



Figura 5: Semillas, fruto, hoja y flor de *C. album*.

(<http://www.pfaf.org/Admin/PlantImages/ChenopodiumAlbum.jpg>)

Aparece en zonas ruderализadas, bordes de caminos y cunetas, campos de cultivo, jardines y huertas. Se puede encontrar en toda la península. El grano de polen de *C. album*, al igual que el de todas las *Chenopodiáceas* es aislado, radioisomérico, apolar y pantoporado. Es de pequeño tamaño, 22-28 micras, tiene un perímetro circular y ondulado por la presencia de entre 50 y 70 poros con micropérculos que, en visión polar le dan un aspecto de “pelota de golf” (figura 6). El grosor medio de la exina es de 1,8 micras y la intina es algo más gruesa.

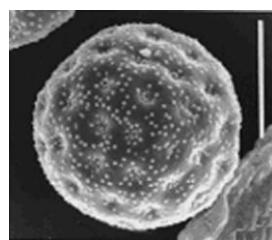


Figura 6: Grano de polen de *Chenopodium album*. Forma esferoidal, con poros en la exina (50-70), y aspecto de “pelota de golf”. (<http://www.bsienvis.nic.in/Polen/Chenopodium%20album.jpg>)

Los estudios que hay sobre la alergenicidad de *C. album* en la literatura, son compartidos con los de *S. kali*, debido a que en un primer momento se centraban en la

familia *Chenopodiaceae*. La alergenicidad de *C. album* es menor que la de *S. kali* y por tanto su interés reside en su reactividad cruzada. Los últimos trabajos sobre *C. album* son de Barderas y cols. en 2002 y 2004, y consisten en la caracterización y clonaje de 3 de sus alérgenos, Che a 1, como alérgeno mayoritario de *C. album* y homólogo de Ole e 1³⁴ y Che a2 y Che a 3¹¹, panalergenos pertenecientes a la familia de las profilinas polcalcinas.

1.2.1.2. *C. vulvaria L.*

C. vulvaria, comúnmente conocido como “sardinero”, “vulvaria” o “blet pudent”. Su nombre hace referencia a su olor fétido cuando se frota, debido a la trimetilamina que desprende. Planta anual, de 10 a 60 cm, farinosa, postrada o ascendente, con hojas romboidales, enteras o subenteras, no más largas que el doble de su anchura. Flores con 5 tépalos, en glomérulos que se agrupan en panículas cortas, terminales o axilares (figura 7A y 7B). Semillas pardo-oscuras, horizontales en el fruto. Florece de junio a noviembre. Crece en herbazales nitrófilos de bordes de caminos, campos de cultivos, estercoleros, proximidades de establos y terrenos removidos.



Figura 7 (A y B): A.- Imagen de *C. vulvaria*

(http://www.maltawildplants.com/CHNP/Pics/CHNVU/CHNVU-Chenopodium_vulvaria_t.jpg) B.-

Detalle de la flor (http://rafelin71.files.wordpress.com/2010/05/chenopodium_vulvaria_10.jpg)

1.2.1.3. *C. murale L.*

El epíteto latino “*murale*” significa muro o pared, y alude a que la planta suele crecer en inmediaciones de muros o paredes, además de en cunetas, bordes de caminos, campos abandonados, jardines, huertas, costas buitreras y querencias de animales. El *C. murale* es una planta de 10 a 90 cm, erecta o ascendente, de ordinario muy ramificada, verde olivácea, a veces amarillenta o teñida de rojo, farinácea (figura 8A y 8B). Los tallos no son angulosos y sus hojas, dentadas irregularmente, son variables de triangular a subromboidal, algo farináceas de joven. Inflorescencia terminal o axilar, compuesta por cimas con ramificaciones divaricadas, foliosas y glomérulos pequeños. Las flores son hermafroditas o, a veces femeninas. Tiene 5 sépalos soldados en su mitad inferior, con una quilla pronunciada cerca del ápice y verde o rojiza en el dorso. Posee 5 estambres y 2 estigmas con un pericarpio con quillas prominentes, fuertemente adherido. Las semillas de 1,2 a 1,4 mm de diámetro son todas horizontales, negras, de contorno redondeado y poseen un margen con quilla aguda. Se la conoce también como “cenizo común”, “cenizo negro”, “salao verde” o “pie de ganso”. Florece de mediados de verano a otoño.



Figura 8 (A y B): A.- Imagen de *C. murale*

(<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-murale/imagenes/rama.jpg>). B.- Detalle de las hojas (http://www.floradecanarias.com/imagenes/chenopodium_murale.jpg).

1.2.1.4. *B. scoparia L.*

La *B. scoparia* es una planta anual de hasta 150 cm, de tallo erecto y ramoso, pelosa al menos en las ramas floridas. Sus hojas son linares o linear lanceolatadas, enteras y planas, las basales generalmente trinervias y las superiores uninervias, todas glabras o pelosas especialmente en el envés, con el margen glabro con cilios de hasta 35 mm, que son más abundantes en la base. Los glomérulos contienen de 1-3 flores, provistos de una bráctea semejante a las hojas (figura 9B). Inflorescencia ramosa y paniculiforme. Piezas del perianto glabras, aunque pestañosas en los márgenes apicales. Las flores hermafroditas presentan un ala dorsal triangular en la fructificación, ovalada o en forma de giba; sin embargo las flores masculinas tienen alas reducidas o inexistentes. Contiene semillas de 1,6 x 1,2 mm, ovado-elípticas (figura 9A). Se cultiva como ornamental. Se la conoce con el nombre común de “albahaca larga”, “ceñiglo de jardín”, “emperadores”, “mirabel” o “pinito de Cádiz”, entre otros. Florece de julio a diciembre.



Figura 9 (A y B): A.- Detalle de *B. scoparia* floreciendo (<http://www.lygeum.es/wp-content/uploads/2008/07/bassia1.jpg>). B.- Imagen en el campo (http://www.maltawildplants.com/lqfx/Thumbs_new/BSSC-Bassia_scoparia_t0.jpg)

1.2.1.5. A. halimus L.

A. halimus, es un arbusto de hasta 2,5 m, ramoso desde la base con corteza grisácea blanquecina y ramillas angulosas. Sus hojas son deltoideo-orbiculares de 10-30 x 5-20 mm y muy variables, atenuadas en la base y de corto pecíolo, generalmente obtusas (figura 10A). Presenta inflorescencia paniculiforme compacta y afila. Sus bractéolas fructíferas alcanzan hasta 6-8 mm, de reniformes a suborbiculares, enteras o dentadas, de obtusas a acutiúsculas, con el dorso liso (figura 10B). Las semillas alcanzan un diámetro de 0,9 a 1,1 mm, de forma orbicular, comprimida lateralmente. Habita en suelos arcillosos, limosos o arenosos, pero siempre con un cierto grado de salinidad. Se la conoce también como “orgaza”, “osagra”, “salobre blanco”, “sosa”, “sosera”, “marisma”, “armuelle”, “salgada”,....

Se cultiva frecuentemente como planta ornamental por el vistoso aspecto plateado de sus hojas, su resistencia a la sequía, a la intensa insolación y a la salinidad. En la península desde la época árabe, se utiliza para formar setos por su resistencia a la poda y también como planta forrajera. Florece a final del verano y principio del otoño.



Figura 10 (A y B): A.- Planta de *A. halimus* con sus hojas en tono plateado (http://www.intersemillas.es/uploads/revegetacion/atriplex_halimus.jpg) y B.- detalle de la flor (http://www.murciaregion.net/chenopodiaceae/fotos/atriplex_halimus_flor.jpg)

1.2.1.6. A. patula L.

Es una planta anual de hasta 120cm, glabra. Los tallos son generalmente erectos, verdosos o blanquecinos (figura 11A). Presenta hojas subrómico lanceoladas, con base cuneada que se acentúa en pecíolo, de lóbulos laterales dirigidos generalmente hacia el ápice foliar, nunca hacia la base. Inflorescencia paniculiforme, afila o con escasas hojas báslas (figura 11B). Las bractéolas fructíferas son herbáceas, sesiles, de hastado-rómbicas a subdeltoideo-lanceoladas, excepcionalmente tubuladas, cuneadas en la base, con los márgenes libres y el dorso liso o tuberculado. La semilla tiene 1,5 – 2,9 mm de diámetro, suborbicular, radícula lateral u oblicua. Aparece en terrenos removidos o zonas ruderalizadas, en suelos salinos o no. Se la conoce también como “armuelle silvestre”.



Figura 11 (A y B): A.- Imagen de la planta de *A. patula*.

(<http://www.nawwal.org/~mrgoff/photojournal/2004/fallwin/pictures/09-09p5spearscale.jpg>) B.-

Detalle de la hoja (<http://herbalfood.ru/wp-content/uploads/2011/07/lebeda-raskidistaya.jpg>)

1.2.1.7. *S. kali L.*

Pertenece a la subfamilia de las *Spiroloboideae*. Se le denomina también *Salsola pestifer* o cardo ruso (*Russian thistle*), y es una maleza conocida comúnmente como “capitana (Aragón)”, “barrilla espinosa”, “barrilla puntosa”, “rodadera”, “espantalobos (Soria)”. *S. kali* es una hierba anual, de tallo erecto, de indumento glabro o hirsurto, con pelos aracnoideos en las axilas de las hojas. Ramificada desde la base con tallos y ramas con estrías purpúreas o verdosas. Sus hojas son finas, de forma linear –subulada, rígidas y terminan en una fina espina (figura 12A). Las flores tienen 5 sépalos, cuatro de ellos libres. Las anteras miden 0,5 -1 mm y las semillas de 2 a 2,5 mm (figura 12B). Los sépalos de 2,5 a 4 mm, ovalados, agudos, más o menos rígidos, con o sin nervio medio y acaban en un cono mucronato, alado o aquillado transversalmente en la fructificación. Su ovario es subgloboso- lenticular. Los aquenios miden de 2 a 2,5 mm.

El nombre de *Salsola* procede del latín *sallere*, que significa salar, lo que hace referencia a su alta tolerancia a vivir en suelos salinos. El nombre *kali* procede del árabe *qalí* que significa sosa, debido a que su ceniza se empleaba desde la época bíblica para elaboración de jabón por la alcalinidad de sus tejidos¹² y fabricación de vidrio.

Su hábitat son suelos removidos o barbechos y arenas litorales, muy típica de suelos salinos y regiones semidesérticas. A finales de verano, la planta se seca y el tallo se rompe a ras del suelo, convirtiéndose en una planta rodadora que es empujada por el viento dispersando entre 20,000 y 50,000 semillas en su recorrido. Es frecuente verla acumulada a miles en los barrancos y vallas de las autopistas. La polinización se realiza entre los meses de junio a octubre, alcanzándose las mayores cotas durante el mes de agosto y septiembre¹³.



Figura 12 (A y B): A.- Planta de *S. kali* en estado vegetativo

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/03/Salsola_kali_habito.jpg/250px-) B.-

Detalle del inicio de la polinización (<http://waste.ideal.es/fotos/salsolakali42.jpg>)

Se caracteriza por tener un grano de polen de pequeño tamaño de 27 a 30 micras. El perímetro es subpoligonal y tiene un número de poros de aproximadamente unos 35. Los poros están delimitados por bandas de exina que subdividen la superficie en zonas hexagonales y pentagonales. La exina de estos pólenes tiene un téctum continuo con microespículas o pequeñas granulaciones que cubren toda la superficie y son visibles a microscopio (figura 13). El grosor medio de la exina es de más de 2 micras, siendo la intina mayor.



Figura 13: Forma esferoidal del polen de *S. kali*.

(http://www.aqua.org.au/AQUA/Pollen/polen_images/gayler/14salsola_kali.jpg)

Desde el punto de vista inmunológico, *S. kali* posee antígenos propios que no están en ninguna otra especie. El primer trabajo que se realizó para estudiar alérgenos de esta planta, fue llevado a cabo por Shafiee en 1981. Se aislaron dos glicoproteínas de un peso molecular de 39 y 42 KDa, posteriormente se comprobó que eran isoformas de la misma proteína y se denominaron Sal p1 siguiendo la nomenclatura para alérgenos¹⁴. A partir de aquí se han realizado diferentes estudios de caracterización de alérgenos, observándose hasta 28 bandas en el extracto de *S. Kali*¹⁵, habiéndose identificado y caracterizado hasta la fecha 5 alérgenos.

Sal k1 fue el primer alérgeno identificado, pertenece a la familia de las pectin metil esterasa y puede ser considerado el alérgeno mayoritario de *S. kali*^{16, 44}, siendo responsable del 80% de los casos de sensibilización frente a *S. kali*. Más recientemente han sido descritos otros 4 alérgenos más; un homólogo de la proteína quinasa denominado como **Sal k2** que es una proteína de 36 KDa; **Sal k3** a través de la fracción de una proteína de 85 KDa (39 KDa+45 KDa), identificando a la primera de ellas como un fragmento de la cobalamino-independiente-metionin sintasa³⁷; **Sal k4** con sus dos isoformas perteneciendo al grupo de las profilinas de 14 KDa de peso molecular³⁸ y **Sal k5** de 18 KDa como un homólogo de Ole e1³⁹.

1.2.1.8. *S. vermiculata L.*

S. vermiculata, es un subarbusto de hasta 1 metro, muy irregularmente ramificado. Pelos de tamaño desigual, denticulados, dispuestos con intensidad irregular. Hojas alternas de hasta 12 mm, lineares, semicilíndricas dilatadas en la base con braquiblastos en las axilas (figura 14A y 14B). Se la conoce como “barrilla”, “caramillo”, “sisallo”, “herba de cristal”, “sosa blanca”,... Forma parte de las comunidades de matorrales nitrófilos o halonitrófilos, es decir, que se asientan sobre los suelos ricos en nitrógeno y sales debido a los excrementos del ganado o a los cultivos. Por eso se pueden ver los sisallos en ribazos, parideras, zonas de paso de ganados y zonas humanizadas en general, en comarcas cálidas y con cierta aridez. Sus formaciones se llaman “*sisallares*” y son típicas de las zonas esteparias. Es una especie muy abundante en el Valle del Ebro.



Figura 14 (A y B): A.- Imagen de *S. vermiculata* (http://www.floradecanarias.com/imagenes/salsola_vermiculata.jpg) B.- Detalle de su flor (http://www.floradecanarias.com/imagenes/salsola_vermiculata3.jpg)

1.2.1.9. *S. oppositifolia L.*

Arbusto de hasta 2,5 m, erecto, glabro, aunque de ordinario con escasos pelos axilares. Ramas opuestas más o menos blanquecinas. Tiene hojas de hasta 25mm, opuestas, semicilíndricas o subtrígonas, carnosas, sésiles, sin lóbulo basal. Las brácteas

inferiores miden hasta 17 mm, subtrígonas, con margen escarioso en la base, similares a las hojas, las superiores son más pequeñas y con margen escarioso. Sus flores en espiga laxa, son solitarias en la axila de cada bráctea (figura 15A). Presenta alas de periantio de hasta 9 x 15 mm. Las anteras miden de 1,5 a 2,2 mm (figura 15B). Sus semillas son horizontales. También se la conoce como “zagua”, “barrilla zagua”, “sosa” o “salado negro”. Florece desde mayo a octubre y cuando el invierno es bueno casi todo el año.



Figura 15 (A y B): A.- *S. oppositifolia* en flor

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e0/Salsola_oppositifolia.JPG/250px-.JPG). B.-

Detalle de una rama con sus estambres y sacos llenos de polen

(<http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRLkQhRktjzzjpsIDVYeku6R8bXt4->)

1.2.2. Amaranthaceae

La familia de las *Amaranthaceae* comprende 65 géneros con 900 especies diferentes. Algunas especies se cultivan por su interés ornamental como el *Amaranthus caudatus* por sus inflorescencias rojas y péndulas, y otras se utilizan en la alimentación como *Amaranthus gaggeticus* (tampala) con hojas de gran tamaño y comestibles. Las semillas de amaranto fueron usadas por los pueblos aztecas como alimento y para adornar figuras rituales; y en la Norteamérica precolombina se usaba el *Amaranthus*

retroflexus para fabricar harina y bebidas calientes. En la actualidad la planta continúa cultivándose después de un largo periodo de abandono y es muy apreciada por sus propiedades nutricionales, además posee la particularidad de no contener gluten. El amaranto es muy resistente a los climas fríos y secos, y crece en suelos muy pobres. China es uno de los mayores productores de amaranto.

De la familia de las *Amaranthaceae* hemos escogido dos, el *Amaranthus deflexus* y *Amaranthus muricatus*, al ser las más representativas en el hábitat de Aragón⁶⁴.

1.2.2.1. *A. deflexus L.*

El *A. deflexus* es una planta de 30 a 70cm de altura, originaria de América del Sur. Tiene ramas postradas con pequeñas hojas triangulares y forma unas espigas más o menos en la parte superior de la planta (figura 16). Se diferencia de los otros *Amaranthus* por su pequeña medida, aunque es una hierba perenne. Como todas las especies del género, vive en lugares muy alterados, incluso urbanos. Florece de mayo a noviembre.



Figura 16: Detalle de *A. deflexus*

(http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT9FjQUVt_dG7CDezDpDm6FQSsvWvecvAix7y1A3bsKa6D)

1.2.2.2. *A. muricatus L.*

El *A. muricatus* es también una especie originaria de América del Sur. Se la conoce también con el nombre de “*yerba meona*”, “*paiquillo*” o “*ataco*”.

Se trata de una planta hemicriptófita glabra, con tallos postrados o ascendentes. Las hojas son lineal-lanceoladas de ápice redondeado y mucronato con base cuneada y atenuada en pecíolo de 1-2 cm de largo (figura 17A). Las flores son monoicas en espigas terminales simples o ramificadas y glomérulos axilares. Las brácteas son agudas y mucronadas. Las flores tienen 4-5 pétalos de unos 2 mm de largo; las masculinas con tépalos lanceolados y tres estambres; las femeninas con tépalos espatulado-lineales (figura 17B). La semilla es lenticular. Su infusión es usada como diurético, laxante, emoliente y en cataplasma para hacer supurar las infecciones de la piel. Florece de junio a noviembre.



Figura 17 (A y B): A.- Imagen de *A. muricatus*

(http://www.floradecanarias.com/imagenes/amaranthus_muricatus.jpg) B.- Detalle de la rama en flor

(<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amaranthaceae/amaranthus-muricatus/imagenes/rama.jpg>)

1.3. Aerobiología

1.3.1. Morfología del polen y polinización

Las *Chenopodiaceae* y *Amaranthaceae* son plantas anemófilas, es decir que polinizan por el viento y son considerados como causantes de alergia respiratoria. La época de polinización de esta familia es bastante amplia, y se extiende de los meses de Junio hasta Octubre, aunque depende también del clima donde se encuentran.

El polen de las *Chenopodiaceae* es indistinguible a la visión óptica de las *Amaranthaceae* con las técnicas habituales de microscopia óptica; por ello se tratan habitualmente de forma conjunta. Morfológicamente es un polen de forma esfenoidal, con un tamaño pequeño-mediano (10-28 µm). Tiene numerosos poros repartidos por toda la superficie (poliplantoporado) dándole una imagen de “pelota de golf”. El número de poros varía desde 15 en la *H. thamnoides*, hasta 80-90 que tiene la *B. scoparia* y la *S. oleracea*. Los poros están delimitados por bandas de exina que subdividen la superficie en zonas hexagonales y pentagonales. La exina tiene un tectum continuo con microespículas o pequeñas granulaciones que cubren toda la superficie y son visibles a microscopio. El grosor medio de la exina es de 1,8 µm, en el *C. album* y algo más grueso en la *S. kali*, de aspecto ondulado y con granulaciones finas.

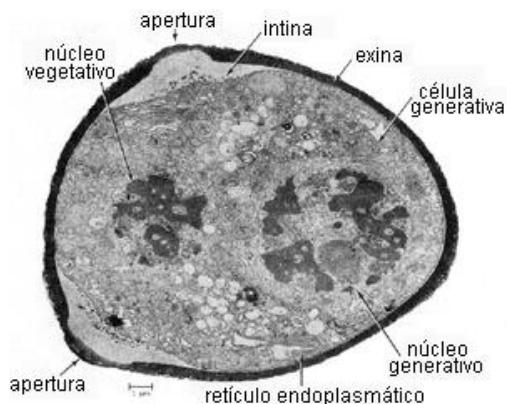


Figura 18: Estructuras de un grano de polen a microscopio electrónico (<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema22/images22/polenMET.gif>)

En el polen de las *Chenopodiaceae* la sexina es aproximadamente tan gruesa como la nexina y presenta un téctum completo con columelas gruesas y numerosas sobre una base muy delgada.

En el polen de las *Amaranthaceae* la sexina es más gruesa que la nexina, con un téctum completo e infratéctum con columelas poco patentes¹⁷.

Los pólenes de la familia de las *Chenopodiaceae* son considerados como causantes de alergia respiratoria ya desde 1933 por Lamson y Watry¹⁸ quienes describieron los primeros casos de alergia a dichos pólenes en Arizona.

En la costa oeste de Estados Unidos los picos principales de pólenes se recogen en otoño y suponen un 14,8% del total de polen capturado¹⁹. En el oeste y centro de Estados Unidos, las *Chenopodiaceae* constituyen entre el 14 y el 60% de total de pólenes²⁰, alcanzando picos semanales de hasta 62 granos/m³ de media. En el norte y este de USA⁷ y en Europa los índices atmosféricos de estos pólenes son menores: en el área mediterránea suponen entre el 1 y el 9% del total de pólenes en Montpellier (Francia) y alrededor del 7% en Cerdeña (Italia)²¹.

En el norte de África se han descrito concentraciones 20 veces mayores que en la zona mediterránea de Europa. En Kuwait el polen de *Chenopodiaceae* es el más común en los recuentos atmosféricos, con picos entre septiembre y octubre y son causa importante de rinitis y asma²². En Croacia esta familia aparece en zonas rurales al este y sur de Zagreb y el pico de polinización se da entre junio y septiembre²³.

En España nos encontramos que el polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* representa un papel importante en la patología respiratoria alérgica en áreas como Elche, Toledo, Logroño, Ciudad real, Málaga, Sevilla o Zaragoza²⁴. Un estudio realizado en la zona suroeste mediterránea, reveló que estas familias se encontraban polinizando de abril a agosto con una variación de 40 a 100 granos/m³ y con un máximo en su concentración entre las 10-17 horas del día²⁵.

En las gráficas (figura 19 y 20) se muestran los recuentos de pólenes de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* en España a lo largo del año 2007 y 2008. Se observa las zonas predominantes (estaciones) donde hay mayor cantidad de estos pólenes, que coincide con áreas secas como Toledo, Zaragoza, Logroño y Sevilla con algunas diferencias de un año a otro. No se obtienen prácticamente recuentos en la zona norte de la península como, San Sebastián, Pamplona, Gijón o Bilbao. Existen además varias regiones en las que este polen es prevalente como los Monegros (Aragón) y zonas desérticas de Alicante²⁶.

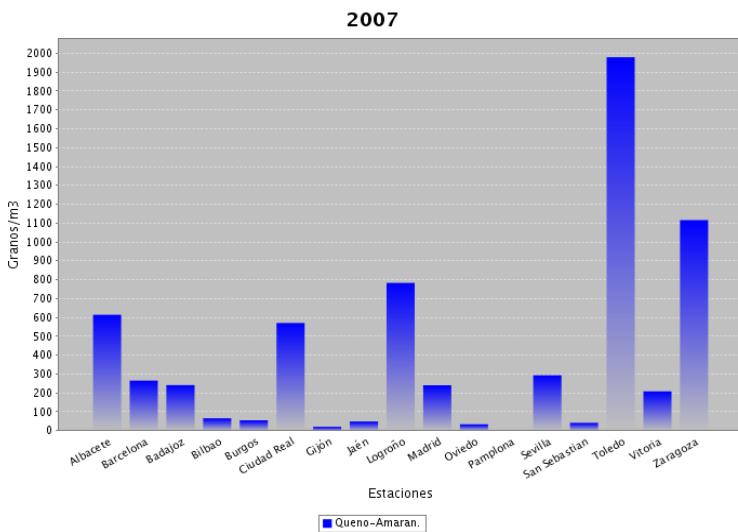


Figura 19: Recuento total de pólenes de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* en España en 2007.

Comité aerobiología SEAIC. El gráfico representa por ciudades (estaciones) el recuento atmosférico de polen total de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* anual (www.polenes.com).

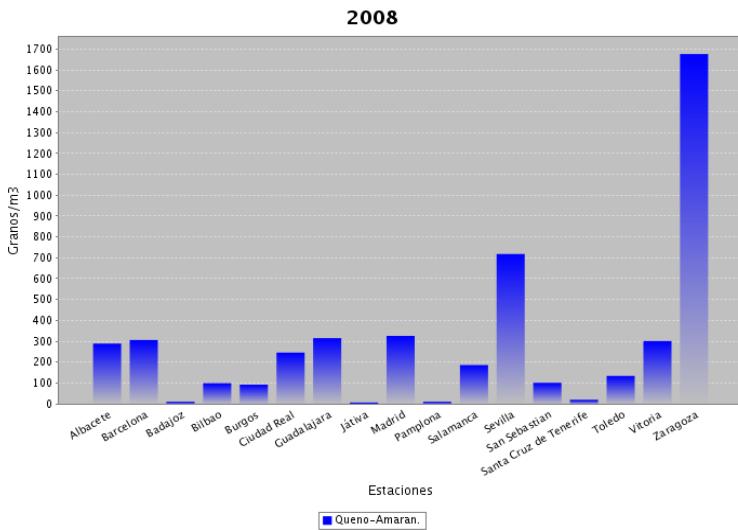


Figura 20: Recuento total de pólenes de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* en España en 2008.

Comité aerobiología SEAIC (www.polenes.com).

En Elche y Toledo es la primera causa de sensibilización a polen. En Elche, se encontró un porcentaje de pruebas cutáneas positivas de un 51% en pacientes con rinitis/asma bronquial vistos en la consulta de alergia, mientras que en Toledo se

observo un porcentaje de 92,21% para *C. album* y de 68,83% para *S. kali* en pacientes polínicos. En Logroño, *C. album* constituye la segunda causa de sensibilización a pólenes con un 71% de pruebas cutáneas positivas en pacientes con rinitis/asma estacional. Este porcentaje es algo menor en Ciudad Real 51% y Zaragoza 42%, donde *C. album* es la tercera fuente de sensibilización a polen²⁷.

Las concentraciones de polen aerotransportado nunca alcanzan valores altos, y por ello fue puesto en duda como productor de patología alérgica, sin embargo, actualmente diversos estudios han puesto de manifiesto su capacidad para producir patología alérgica, y se considera que puede provocar síntomas en los pacientes sensibles con concentraciones muy bajas, a partir de 10 -15 granos/m^{6,28}. Dada la gran resistencia a la sequía de estas plantas, se ha observado que los recuentos de polen aumentan en años secos.

Las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* presentan un amplio periodo de floración que corresponde a la época veraniega tardía, de junio a octubre, aunque en nuestro país los picos de polinización son habitualmente en agosto y septiembre. Si observamos la figura 21 se puede ver la época de polinización de ambas familias en Zaragoza en el año 2007 que comienza en Abril y termina en Octubre, con un pico en Septiembre de 75 granos/m³, que presenta el máximo de granos de polen por metro cúbico en ese año. Durante el año 2008 se observan tres picos importantes de polen en julio, agosto y septiembre de hasta 57 granos/m³ (figura 22).

La mayoría de las especies presenta una típica polinización en verano. Los pólenes que aparecen en primavera parecen venir de zonas salinizadas, mientras que las zonas ruderализadas contribuyen a los picos más tardíos¹⁸.

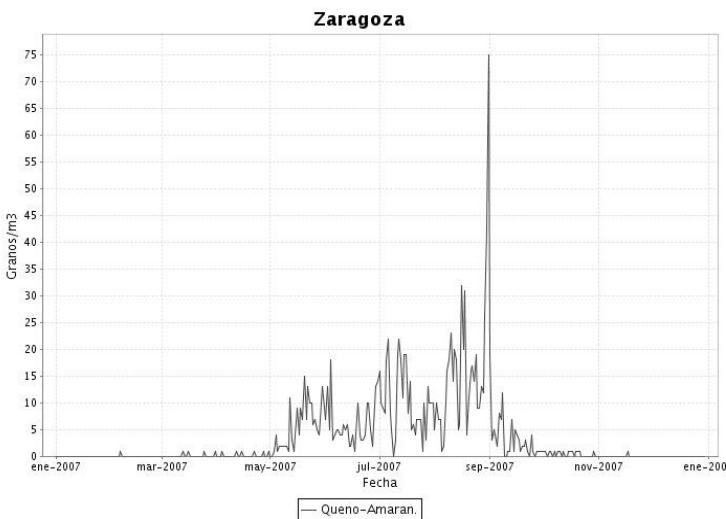


Figura 21: Recuento de pólenes de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* en Zaragoza en 2007.

Comité aerobiología. SEAIC. Se observa un pico de polinización en septiembre de unos 75 granos/m³ (www.polenes.com).

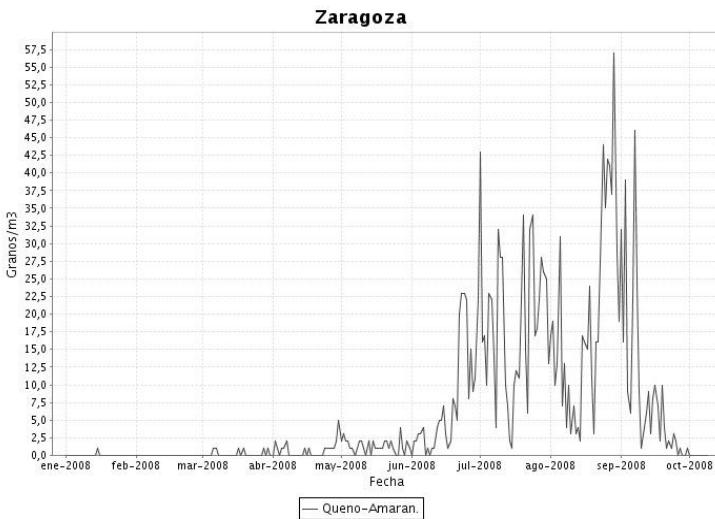


Figura 22: Recuento de pólenes de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* en Zaragoza en 2008.

Comité aerobiología. SEAIC. Se observa la polinización más tardía y varios picos de polinización en julio, agosto y septiembre de hasta 57 granos/m³ (www.polenes.com).

Se han realizado diversos estudios donde se ha puesto de manifestó la importancia clínica del polen de *Chenopodiaceae* y algunas características propias. Se ha observado que hasta el 50% de los pacientes sensibilizados presentan síntomas desde

marzo a septiembre según un estudio realizado en Córdoba²⁹ y en cuanto a las manifestaciones clínicas la rino-conjuntivitis fue la más frecuente en el grupo de pacientes sensibles a *Chenopodiaceae*.

En otro estudio realizado en Zaragoza, comparando 804 pacientes sensibles a *Chenopodiaceae* frente a 2867 sensibles a *Gramíneas* se encontró diferencias respecto al sexo, más frecuente mujeres en el grupo sensible a *Chenopodiáceas* 60% frente a *Gramíneas* 74%, con una media de edad mayor para *Chenopodiáceas* 28 años, frente a 24 años de *Gramínea*²⁸.

Es muy importante a la hora de diagnosticar las posibles sensibilizaciones, conocer el medio en el que nos encontramos para estudiar las principales plantas que habitan. A la hora de realizar este trabajo se ha tenido muy en cuenta este aspecto, y se ha realizado un detallado análisis del terreno y de las plantas, así como la orientación del viento del valle del Ebro. De esta forma y de acuerdo con un experto en botánica se decidió estudiar 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* (*C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *A. patula*, *A. haliums*, *B. scoparia*, *S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *A. deflexus* y *A. muricatus*) como las más relevantes en el área de Zaragoza^{64,65}.

1.4. Alérgenos en *Chenopodiaceae*

En 1981, Shafiee y cols³⁰ aislaron en el polen de *S. Kali*, por cromatografía de intercambio iónico e isoelectroforesis, dos glicoproteínas (RT1y RT2) de 39 kDa y 42 kDa, respectivamente, pero con la misma composición de aminoácidos.

Lombardero y cols³¹ observaron bandas que fijaban IgE en el inmunoblotting de un extracto de *S. kali*, una de ellas de 14 kDa y otra de 35 kDa. Estas dos bandas se encontraban también en el extracto de *C. album* y *B. vulgaris*. No obstante, los patrones de las *Chenopodiaceae* son diferentes, sugiriendo que los determinantes alergénicos comunes están presentes en bandas proteicas con diferente peso molecular o punto isoelectrónico.

En 1989³², detectaron hasta 20 bandas que fijaban IgE e IgG en otro inmunoblotting de extracto de *S. kali*. El peso molecular de estos alérgenos se encontraba entre 12,2 y 85 kD con un punto isoelectrónico (PI) entre 3,95 y 7,7, presentando los pacientes alérgicos diferentes bandas de reconocimiento de proteínas.

De la Hoz¹⁵ tras la separación de los componentes proteicos de un extracto de *S. kali* identificó 28 bandas diferentes de polipéptidos de pesos moleculares entre 106 kDa y 13,22 kDa. El patrón de reconocimiento para IgE era heterogéneo; sin embargo un 64% de pacientes presentaban fijación de IgE frente a una banda con peso molecular de 54,4 kDa y un 44% de los pacientes frente a una banda de 36,6 kDa.

Würtzen et al³³, detectaron bandas proteicas de 15, 25 y 55 kDa.

En los últimos años, tres alérgenos de *C. album* (Che a 1, Che a 2 y Che a 3), 5 de *S. kali* (Sal k1, Sal k2, Sal k3, Sal k4 y Sal k5) y uno para *A. retroflexus* (Ama r2) han sido aislados y caracterizados. El grupo del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de

Madrid, aisló en 2001³⁴ el **Che a 1**, glicoproteína de 18,8 kDa y 143 residuos aminoácidos, cuya secuencia muestra una identidad del 27-45% con Ole e 1. A pesar de ello encuentran escasa reactividad cruzada *in vitro* entre los mismos, probablemente debido a diferencias significativas en la secuencia polipeptídica³⁵. Aunque la prevalencia de Che a 1 varía dependiendo del área geográfica, en prácticamente todas las poblaciones es considerado un **alérgeno principal**, atendiendo a su incidencia en la población alérgica que suele ser superior al 50%. Pero no cabe duda que además de una alta prevalencia, para que el alérgeno sea realmente relevante es necesario que tenga un título alto de IgE específica. Esta potencia inmunológica suele ir asociada con el hecho de ser proteínas mayoritarias en el contenido proteico de los extractos. En este caso, Che a 1 en el extracto de *Chenopodium* se encuentra en muy baja concentración a diferencia de su homólogo Ole e 1 y los niveles de IgE dirigidas a esta proteína son muy bajos luego podemos aventurar que Che a 1 es un alérgeno principal con capacidad inmunogénica alta capaz de desencadenar la unión de IgE, pero con poca relevancia clínica. Este mismo grupo, ha descrito y caracterizado posteriormente otros dos alérgenos del polen de *C. album*, **Che a 2** (profilina) y **Che a 3** (polcalcina)^{36, 711} Che a 2 y Che a 3 son panalérgenos con una prevalencia variable según el área geográfica de la que proceden los pacientes, homólogos a proteínas de origen vegetal. Las profilinas son moléculas muy ubicuas encontradas en un gran número de especies vegetales y animales. La profilina aislada a partir de *Chenopodium* es una proteína ácida (PI 5,2) que posee una masa molecular de 12,6 a 15,2 kDa, lo que parece estar de acuerdo con su carácter polimórfico. Che a 2 está compuesto por una cadena polipeptídica de 131 residuos aminoacídicos. Che a 3 es una proteína que une calcio mediante dos sitios de unión. Es una proteína pequeña con un peso molecular aparente de 9,8 kDa y un punto

isoeléctrico ácido (PI 4,4). Posee una cadena polipeptídica de 86 residuos, con una gran similitud con proteínas homólogas de otros pólenes. Estos autores afirman que aunque Che a 1 haya mostrado una alta prevalencia, los niveles de IgE específica frente al mismo son bajos, y en cambio los niveles de IgE específica frente a Che a 2 y Che a 3 son los principales anticuerpos contribuyentes a toda la alergenidad de las proteínas de *Chenopodium*¹¹.

Posteriormente, Carnés y cols¹⁶. caracterizaron el alérgeno principal de *S. kali*, inscrito en el banco de alérgenos con el nombre de **Sal k 1**. Es una proteína de 43 kDa y no encontraron aparente homología con otras proteínas del banco de alérgenos (tabla 3). Más recientemente han sido descritos otros 4 alérgenos más para el polen de *S. kali*. **Sal k2** fue identificada como un homólogo de las protein quinasas, con un peso molecular de 36 KDa y su relevancia alergénica está todavía por demostrar⁷². **Sal k3**, fue identificada en 2011 por Assarehzadegan et al, a través de la fracción del polen de *S. kali*, identificando una proteína de 85 KDa, que se fraccionó en 45 KDa que se identificó un fragmento de la cobalamino-independiente-metionin sintasa y otra subunidad de 40 KDa³⁷. **Sal k4**, forma parte del grupo de las profilinas y se caracterizó en 2004, clonando dos isoformas, una de ellas con menor relevancia alergénica³⁸. En el 2009, una proteína homólogo de Ole e1 fue detectado en el polen de *S. kali* y se denominó **Sal k5**, presentando elevada reactividad cruzada con Che a1, con una homología del 68% con Che a 1, pero solo del 32% con Ole e1³⁹, se considera alérgeno minoritario en el polen de *S. kali*, presentando una frecuencia de sensibilización del 30-40% en población sensibilizada a *S. kali* en el centro y costa oeste de España.

Species	Alérgeno	Nombre bioquímico	MW(SDS-PAGE)	Alérgeno alimentario
<i>Amaranthus retroflexus</i> (Redroot pigweed)				
	<u>Ama r 2</u>	Profilina	14 kDa	No
<i>Beta vulgaris</i> (Sugar beet)				
	<u>Beta v 1</u>	Che a 1/Ole e 1 homologos	17 kDa	No
	<u>Beta v 2</u>	Profilina, polen	14 kDa	No
<i>Chenopodium album</i> (Pigweed)				
	<u>Che a 1</u>	Ole e 1 homologos	17 kDa	No
	<u>Che a 2</u>	Profilina	14 kDa	No
	<u>Che a 3</u>	Polcalcina	10 kDa	No
<i>Salsola kali</i> (Russian thistle)				
	<u>Sal k 1</u>	Pectin metilesterasa	43 kDa	No
	<u>Sal k 2</u>	Protein kinase homologos	36 kDa	No
	<u>Sal k 3</u>	Cobalamin independent methionine synthase	39+45 kDa	No
	<u>Sal k 4</u>	Profilina	14.4 kDa	No
	<u>Sal k 5</u>	Ole e 1-like protein	18.2 kDa	No

Tabla 3. Alérgenos descritos de *Chenopodiaceae/amaranthaceae*

(<http://www.allergen.org/search.php?TaxOrder=Caryophyllales>)

1.5. Reactividad cruzada entre *Chenopodiaceae* y *Amaranthaceae*

Todas las especies de las familias *Chenopodiaceae* y *Amaranthaceae*, presentan alérgenos comunes, pero existen también alérgenos propios de cada especie. Los más estudiados han sido el polen de *S. kali*, *C. album* y *A. retroflexus*.

En 1931 Lamson, utilizando pruebas cutáneas, observó una importante reactividad cruzada entre *A. retroflexus* y pólenes de varias especies de *Chenopodiaceae*⁴⁰. Sellers y cols. en 1932 demostraron, utilizando la técnica de transferencia pasiva del suero (PK), que los extractos de *S. kali* y *C. album* poseen alérgenos comunes con pólenes de *Amaranthaceae*, pero que existen en estos últimos pólenes, alérgenos que no se encuentran en los *Chenopodiaceae*⁴¹.

Weber⁴³ realizó pruebas cutáneas a 200 pacientes alérgicos, con polen de 9 especies de *Chenopodiaceae* de seis géneros y 3 especies de *Amaranthaceae*, encontrando mayor asociación entre los pólenes de *S. kali* y *C. album*. Mediante inmunodifusión, observó que todas las especies tenían antígenos comunes, siendo los más similares los de *S. kali* y *C. album*.

Lombardero y colaboradores estudiaron la reactividad cruzada de extractos de *C. album*, *A. latifolia*, *B. vulgaris*, *S. kali* y *A. retroflexus* y encontraron que todos los pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas a todos los extractos, además, mediante RAST inhibición se demostró que todos los extractos inhibían en alguna medida la unión de IgE específica al extracto de *C. album*, siendo *S. kali* el extracto más potente. En ese mismo estudio se identificaron alérgenos con pesos moleculares de 35 y 14 KDa en los cuatro extractos estudiados³¹.

En 1995 Würtzen y cols. encontraron antígenos y alérgenos comunes en 4 especies de *Chenopodiaceae* (*A. retroflexus*, *C. album*, *K. scoparia*, y *S. pestifer*), con un

alto grado de similitud entre *C. album* y *S. pestifer* debido a que los anticuerpos reconocen la mayoría, sino todas las proteínas de los dos pólenes³³.

Barderas y cols. en 2002 aislaron, secuenciaron y estudiaron las propiedades de los alérgenos de *C. album*, Che a 2 (profilina), y Che a 3 (polcalcina), comprobando la existencia de reactividad cruzada con los mismos alérgenos del olivo, Ole e 2 y Ole e 3¹¹.

En *S. kali* se han caracterizado 5 alérgenos importantes con peso moleculares de 43, 39, 36, 17 y 14 kDa^{39, 42}, mientras que para *C. album* y *A. retroflexus* se han identificado alérgenos con pesos moleculares más bajos de 14 y 35 kDa^{31, 34}.

La mayoría de los pacientes sensibilizados a polen de *C. album* y *S. kali* reconocen cualquiera de los alérgenos encontrados en *C. album* (Che a 1 y/o los panalérgenos Che a 2 y Che a 3), y por lo tanto estos alérgenos explicarían la reactividad cruzada en estos pacientes^{43, 31, 34}. Es decir, la sensibilización concomitante a *S. Kali* y *C. album* pondría ser atribuida a la presencia de alérgenos homólogos con similar secuencia proteica.

En otro trabajo realizado por el grupo de Barderas⁴⁴ y el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, basándose en un pequeño porcentaje de pacientes, del 10 al 30%, que únicamente están sensibilizados al polen de *S. kali*, investigaron el alérgeno específico responsable de esta sensibilización exclusiva. Para ello aislaron, purificaron y clonaron Sal k 1 y compararon la secuencia completa de aminoácidos de este alérgeno con proteínas del banco de alérgenos, observando que este alérgeno pertenecía a la familia de las pectin metilesterasa (PME); alérgeno ya descrito y caracterizado en 2003 por Carnes y colaboradores¹⁶. Se observó que Sal k 1 es el alérgeno principal en estos pacientes sensibilizados sólo a *S. kali*, convirtiéndolo en una herramienta útil en estas áreas de población. Por último, parece que la presencia de Sal k1 es bastante ubicua en

diversas especies de *chenopodiáceas*⁴⁵. De este modo, se detectó la presencia de proteínas antigenéticamente similares a Sal k 1 en el extracto de polen de dos especies del grupo de *Amaranthaceae*: *Salicornia* y *Kochia*. Mediante immunoblotting, se pueden detectar en el polen de otras *Amaranthaceae*, proteínas similares que también reaccionan con las IgE de pacientes alérgicos a *S. kali*.

En otro reciente estudio realizado por Ferrer y col. en la costa mediterránea se estableció la reactividad cruzada entre tres especies de *Salsola* (*S. oppositifolia*, *S. vermiculata*, *S. kali*) y *C. album*. Se revelaron 4 bandas proteicas de 36, 43, 57 y 66 kDa en las tres especies de *Salsola* y además se observó otra banda de aproximadamente 20 kDa solo presente en *S. oppositifolia*. Se confirmó la importancia en alergenicidad de otras especies de *Salsola*, especialmente de *S. oppositifolia*, en esa área, que aunque presenta elevada reactividad cruzada con las otras 3 especies, comparte más similitudes alergénicas con *C. album* que con *S. kali*⁴⁶.

1.6. Estudio *in vitro* de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*

Para poder identificar las proteínas causantes de una sensibilización alérgica se debe llevar a cabo la caracterización de alérgenos. Esta consiste en extraer proteínas de la fuente, analizar la IgE específica por inmunodetección e identificar las proteínas que unen IgE⁴⁷.

Los alérgenos del polen son proteínas solubles en agua o glicoproteínas de peso molecular comprendido normalmente entre 10 y 70 KDa.

La caracterización de alérgenos se basa en obtener la máxima información de la proteína del polen que nos interesa. El proceso de caracterización de un alérgeno comprende varias etapas que van desde confirmar su alergenicidad, hasta definir su estructura y función. Los enfoques y técnicas empleadas pueden variar, pero todas se apoyan en inmunología, bioquímica y biología molecular (ver apartado 3.6. “Caracterización de los extractos” de material y métodos).

1.7. Clasificación de la rinitis

Han surgido a lo largo de los años distintas clasificaciones para la rinitis. La de mayor trascendencia fue publicada por la Academia de Alergia Europea en 1994⁴⁸ y modificada en el año 2000⁴⁹ y la redactada por autores americanos en 1998⁵⁰. La última clasificación fue realizada en 2001 por un grupo de expertos; es el documento Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) workshop Expert Panel⁵¹, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y cuya última actualización ha tenido lugar recientemente⁵². Esta última clasificación fue la utilizada en este trabajo.

1.7.1. Documento ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*)

Este documento clasifica la rinitis en intermitente y persistente, dependiendo de la duración y frecuencia de los síntomas (número de días por semana y número de semanas consecutivas al año durante las cuales el paciente tiene síntomas) (figura 23). A su vez la rinitis se clasifica en leve y moderada-grave en función de la intensidad de los síntomas y su repercusión sobre la calidad de vida.

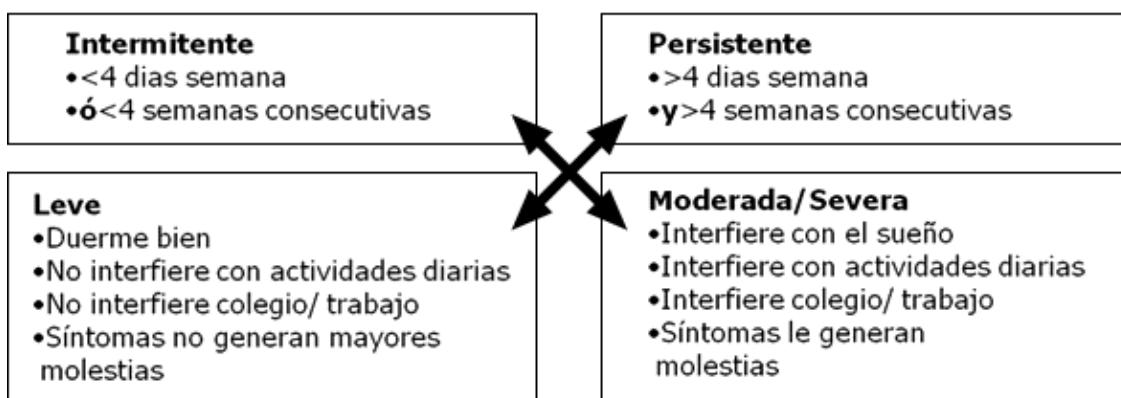


Figura 23. **Clasificación ARIA**, clasifica la rinitis atendiendo a la duración y frecuencia de los síntomas así como al grado de afectación de la calidad de vida.

(http://www.basesmedicina.cl/inmunologia/901_enfermedades/alergicas/imgs/img_01.gif)

1.8. Clasificación del asma: *The Global Initiative on Asthma (GINA)*

De las múltiples clasificaciones del asma, atendiendo a su gravedad, la actualmente más aceptada es la de la GINA (The Global Initiative on Asthma), surgida en 1995 del esfuerzo conjunto del National Heart, Lung and Blood Institute y de la O.M.S⁵³. La primera edición fue basada en la opinión, pero la revisión posterior, en 2002⁵⁴, fue basada en la evidencia. Se clasificó al asma según gravedad en intermitente, persistente

leve, persistente moderada y persistente grave (figura 24). La presencia de una de las características de gravedad es suficiente para clasificar al paciente en la categoría de más gravedad, pero la categoría se puede modificar a lo largo del tiempo en función de la evolución del paciente asmático.

Gravedad del Asma	Características Clínicas antes del tratamiento
Intermitente	-Síntomas intermitentes menos de dos días a la semana. -Exacerbaciones cortas. -Síntomas nocturnos menos de 2 veces al mes. -Asintomático entre episodios con función pulmonar normal. -FEV ₁ o FEM≥80% del predefinido con variabilidad <20%.
Leve Persistente	-Síntomas más de dos días a la semana, pero no diario. -Las exacerbaciones pueden afectar a la actividad y el sueño. -Síntomas nocturnos>2 veces por mes. -FEV ₁ o FEM ≥ 80% del predefinido con variabilidad del 20-30%.
Moderado Persistente	-Síntomas diarios. -Exacerbaciones que afectan a la actividad diaria y el sueño. -Síntomas nocturnos>1 vez por semana. -Necesidad diaria de β ₂ agonista de corta duración inhalado. -FEV ₁ o FEM >60% y <80% del predefinido, con variabilidad >30%.
Grave Persistente	-Síntomas continuos. -Exacerbaciones frecuentes. -Síntomas nocturnos frecuentes. -Actividades físicas limitadas por los síntomas de asma. -FEV ₁ o FEM ≤ 60% del predefinido, con variabilidad >30%.

Figura 24. Clasificación del asma atendiendo a su gravedad

Una nueva revisión de la guía GINA tuvo lugar en 2006 ⁵⁵, y más recientemente en 2014⁵⁶ y se basa en el nivel de control de la enfermedad. La clasificación anterior del asma según gravedad en intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave se recomienda sólo con fines de investigación. El documento

recomienda ahora clasificar el asma según el nivel de control: controlada, parcialmente controlada o no controlada (figura 25). Con ello se refleja la idea de que la gravedad del asma no solo implica la gravedad en sí de la enfermedad subyacente, sino también la respuesta al tratamiento, y que la gravedad no es una característica invariable del asma específica de un paciente, sino que puede cambiar con los meses o los años⁵³.

Niveles de control del asma			
Característica	Controlada (Todas las siguientes)	Parcialmente controlada (cualquier/semana)	No controlada
Síntomas diurnos	No (2 o menos/semana)	Más de 2 veces/sem	Tres o mas características del asma parcialmente controlada presentes en cualquier semana
Limitaciones de Actividades	No	Alguna	
Síntomas nocturnos /despertares	No	Alguna	
Necesidad de tratamiento de rescate	No (2 o menos/semana)	Mas de 2 veces/sem	
Función pulmonar (FEM O VEF1) *	Normal	<80% valor predictivo o Mejor valor personal	
Exacerbaciones	No	Una o mas/año †	Una vez /sem ‡

Figura 25. Clasificación del asma atendiendo a su control

* No se contempla en niños de 5 años o menores la realización de pruebas de función pulmonar

† Posterior a cualquier exacerbación se debe de revisar bien el tratamiento para asegurarse que sea adecuado

‡ Por definición, cualquier exacerbación que se presente durante una semana hace que durante esa semana el paciente se clasifique como no controlado.

II. Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

En los últimos años se ha venido observando que pacientes monosensibles a polen de *Chenopodiáceas* presentaban un decalaje entre la sintomatología y la concentración de polen de *S. kali* y *C. album*, encontrándose sobre todo las máximas concentraciones de polen en los meses de Julio y Agosto, mientras que muchos de los pacientes refieren síntomas desde mayo hasta octubre.

El presente estudio partió de la sospecha de que otras especies presentes en el mismo área geográfica de crecimiento, y que comparten un mismo nicho ecológico con las especies hasta ahora descritas, pudiesen estar implicadas en la sensibilización de los pacientes y en su relación con la sintomatología.

Por otro lado, se parte también de la idea que estas posibles especies cohabitantes, puedan ser de la misma familia que las ya descritas debido a su abundancia en la zona, aunque no se conozcan datos de los períodos de floración, niveles de polen o abundancia.

El objetivo de nuestro estudio es conocer si además de *C. album* y *S. kali* existen otras especies taxonómicamente muy próximas que también tengan relevancia clínica y alergénica en el área de Zaragoza y justifiquen mejor el amplio periodo sintomático de estos pacientes monosensibles. Parte de los datos de este estudio han sido recientemente publicados⁵⁷.

Cronograma:

1. Estudio de la fenología y distribución de plantas: se siguió las recomendaciones de Samuel Pike⁶⁴ y se escogieron a 11 especies como las más relevantes de la zona del valle del Ebro. Se siguió la floración semanalmente a través de 2 métodos; una cuantitativo y otro semi-cuantitativo para poder obtener el pico de máxima floración para cada especie a estudio.
2. Selección de pacientes y evaluación clínica: se contó con 60 pacientes monosensibles residentes en el área a estudio y se siguieron durante 6 meses, a lo largo del año 2007. Se recogieron cartillas de síntomas, escala analógica visual, cuestionarios de calidad de vida, espirometría y determinación de óxido nítrico: Se les realizó así mismo, pruebas cutáneas intraepidérmicas y determinación de IgE específica.
3. Caracterización de extractos y estudio alergológico in vitro: se realizó CAP inhibición, marcaje con biotina e inmunoblotting, SDS-PAGE, isoelectroenfoque bidimensional con las 11 especies a estudio con el fin de conocer el perfil de sensibilización y la alergenicidad de las especies.

OBJETIVOS

1. Estudiar la distribución geográfica de otras plantas de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* presentes en nuestro área y conocer el período de floración de las especies seleccionadas, que fueron: *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *A. patula*, *A. haliums*, *B. scoparia*, *S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *A. deflexus* y *A. muricatus*.
2. Valorar el perfil proteico de los 11 extractos de polen de *ChenopodiaceaeAamaranthaceae* para su caracterización.
3. Conocer los perfiles de sensibilización de los pacientes alérgicos a *Chenopodiaceae* mediante medición de pruebas cutáneas en prick test, determinación de IgE específica, marcaje con biotina e inmunoblotting con las 11 especies diferentes.
4. Correlacionar los perfiles de sensibilización con la clínica, el recuento de polen atmosférico y la floración de las plantas, para poder establecer perfiles entre la diferente sensibilización y su comportamiento clínico.
5. Determinar si plantas taxonómicamente muy próximas a *S. kali* y *C. album* tienen una relevancia clínica en la población que reside en la provincia de Zaragoza.

III. Material y Métodos

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo observacional.

Se seleccionaron 60 pacientes monosensibles a *Chenopodiaceae*, con edades comprendidas entre 18 y 75 años, de ambos性os, del Departamento de Alergia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza durante el año 2006. Fueron elegidos consecutivamente según se atendieron en el servicio de Alergología. Se siguieron durante el año 2007, controlando los síntomas y consumo de medicación. Estos datos se contrastaron con el recuento diario de polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, la floración de 11 especies seleccionadas como más relevantes en el área, y el estudio *in vitro* con el suero de estos pacientes.

3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

Se incluyeron 60 pacientes monosensibles a *Chenopodiaceae*, con edades comprendidas entre 18 y 75 años (con una edad media de 35 años ±9.4), de ambos性os (73% de mujeres y 27% hombres), del Departamento de Alergia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza durante el año 2006. Fueron elegidos consecutivamente según fueron atendidos en el servicio de Alergia, y cumplían los siguientes criterios de inclusión.

3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Pacientes con historia clínica compatible a sensibilización por *Chenopodiaceae* y pruebas cutáneas positivas a *C. album* y/o *S. kali*.
- Edad comprendida entre los 18 años y 75 años cumplidos.

- Sintomatología concordante con rinitis y/o asma con estigmas clínicos de alergia al polen.
- IgE específica a *C. album* y/o *S. kali* positivas.
- Los pacientes deberían ser capaces de:
 - Firmar el consentimiento informado
 - Cumplimentar los diarios de recogida de síntomas y medicación
 - Acudir a las visitas programadas

Criterios de exclusión

- Paciente en tratamiento con inmunoterapia específica en los últimos 4 años.
- Sensibilización a otros pólenes que coincidan con la estación polínica de las *Chenopodiaceae* (*Gramíneas, Olivo, Parietaria y Plátano de sombra*).
- Gestantes.
- Estados del paciente en que no pueda ofrecer cooperación.
- Trastornos psiquiátricos severos.

A todos ellos se les realizó, una fase de preselección, para la correcta inclusión en el estudio a través de:

- H^a Clínica detallada (datos demográficos y anamnesis)
- Exploración física (auscultación pulmonar y cardiaca, rinoscopia anterior)
- Batería estándar de aeroalérgenos comerciales estandarizados de Laboratorios Leti (que incluye *P. pratense*, *C. dactylon*, *O. europaea*, *P. judaica*, *P. acerifolia*, *C. sempervirens*, *C. album*, *S. kali*, *epitelios* de perro y gato, *D. pteronyssinus*, *L. destructor*, *A. fumigatus* y *A. tenuis*).

► Espirometría forzada y prueba broncodilatadora

La clasificación del grado de rinitis se estableció según el **documento ARIA** y el diagnóstico de asma de acuerdo con la **Global Initiative for Asthma (GINA)**.

Se explicó detalladamente la **hoja de información del estudio** su alcance y características (anexo I). Su participación fue voluntaria y toda la información obtenida será tratada confidencialmente de conformidad con la ley 15/1999 de protección de datos personales.

Se firmó el **consentimiento informado**, donde se aceptó formar parte del estudio y se adjudicó un número aleatorio siguiendo el orden correlativo de inclusión y las iniciales de su nombre y dos apellidos (anexo II).

Este estudio fue aprobado por el IACS (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud), que se adjunta en el anexo III.

3.2.2. Recogida de datos clínicos

La valoración de la sintomatología de los pacientes se realizó mediante la cumplimentación de cartillas de síntomas a lo largo de los meses de mayo a octubre, del año 2007. Se utilizó una variación del cuadernillo de síntomas modelo TSS4, que valora subjetivamente los síntomas oculares y nasales, añadiendo también la clínica bronquial y el consumo de medicación (anexo IV).

La evaluación subjetiva de la evolución de la enfermedad se realizó mediante escala analógica visual.

Para valorar el impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes se utilizó el *cuestionario ESPRINT de calidad de vida* durante el año 2008.

3.2.2.1. Registro de síntomas

Las cartillas de síntomas recogieron la clínica ocular, nasal y bronquial, según el modelo de recogida de datos del anexo IV. En la primera página de la cartilla de síntomas constaban sus iniciales, el número que se les había asignado y la semana en la que se encontraban. En la segunda página iban calificando cada día por la mañana y por la noche la intensidad de sus síntomas nasales, oculares y bronquiales (tabla 4), según los siguientes criterios:

0= Ninguno (sin síntomas evidentes)

1= Leve (el síntoma está presente pero no es molesto)

2= Moderado (el síntoma es molesto pero no limita o interfiere la actividad diaria).

3= Grave (el síntoma interfiere en la actividad diaria)

Así, el rango de puntuación obtenido variaba desde 0, en pacientes totalmente asintomáticos, hasta 54 puntos en pacientes con rino-conjuntivitis y asma graves.

	Día	1 ^{er}	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o	7 ^o	8 ^o	9 ^o	10 ^o	11 ^o	12 ^o	13 ^o	14 ^o	15 ^o
	Noche															
Estornudos	Día															
	Noche															
Hidrorrea (agüilla)	Día															
	Noche															
Obstrucción nasal (atasco)	Día															
	Noche															
Picor nasal	Día															
	Noche															
Picor ocular	Día															
	Noche															
Lagrimeo	Día															
	Noche															
Tos	Día															
	Noche															
Pitos en el pecho	Día															
	Noche															
Ahogo en el pecho	Día															
	Noche															
Otros:	Día															
	Noche															
Otros:	Día															
	Noche															

Tabla 4: Detalle de la segunda hoja del cuadernillo de síntomas variación del “modelo TSS4”.

3.2.2.2. Escala analógica visual

La evaluación subjetiva de la evolución de la enfermedad se realizó mediante una escala analógica visual; sobre una línea de 10 cm de longitud el paciente valoraba su situación clínica desde 0 (muy mal) hasta 10 (muy bien), señalando con una línea perpendicular, el punto sobre esa línea.

3.2.2.3. Cuestionarios de calidad de vida para rinitis

Todos los pacientes cumplimentaron el *cuestionario de calidad de vida ESPRINT⁵⁸* (*Estudio de la calidad de vida en pacientes con rinoconjuntivitis*) específico para rinitis. Dicho cuestionario se cumplimentó en temporada polínica a lo largo del mes de julio y fuera de la estación en el mes de octubre. Se evalúo a través de 7 dominios (síntomas nasales, otros síntomas, actividades de la vida diaria, aspectos ambientales, vitalidad, sueño y afectación psicológica), el impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes.

3.2.3. Exploraciones complementarias

3.2.3.1. Espirometría forzada

El diagnóstico de asma se establece mediante la presencia de síntomas sugestivos y la demostración de obstrucción al flujo aéreo reversible o variable o la constatación de la existencia de hiperrespuesta bronquial⁵⁹. En consecuencia la espirometría es uno de los estudios más frecuentemente utilizados para el diagnóstico de asma. Se trata de una exploración sencilla y no invasiva, que permite valorar la función respiratoria si se realiza e interpreta adecuadamente.

Se les realizó a todos los pacientes en sucesivas visitas a lo largo del año 2007, de los meses sintomáticos de mayo a octubre, dentro de la visita médica y recogida del cuadernillo de síntomas.

El aparato utilizado fue el espirómetro de circuito cerrado Jaeger MasterScope (VIASYS Healthcare, Höchberg, Germany) en las 4 visitas del año 2007, y se llevo a cabo siempre por el mismo facultativo entrenado, previa calibración del aparato y utilizando como valores de referencia los propuestos por SEPAR. Los datos obtenidos del FVC, FEV1 y FEV1/FVC se trasladaron a una base de datos de excel para su estudio.

3.2.3.2. Medición de óxido nítrico exhalado

Para la medición del óxido nítrico exhalado (FeNO), se utilizó un monitor NIOXMINO Aerocrine AB (Solna, Sweden). Este equipo tiene un rango de medición de 5 a 300 partes por billón (ppb) con un límite inferior de 5 ppb y un tiempo de medición menor de 2 segundos. La medición se realizó con un tiempo de espiración de 10 segundos. Se siguieron las indicaciones del proveedor del equipo.

Se realizaron 4 determinaciones de FeNo a cada paciente, a lo largo de la estación polínica a estudio en el año 2007. Las primera medición se les realizó en mayo, la segunda en junio, la siguiente en julio/agosto y la última en octubre, ya finalizando la temporada polínica.

3.2.4. Extracción sanguínea

A cada paciente se le extrajeron 2 tubos secos de 10 ml de sangre, para la realización del estudio *in vitro*. Se identificó cada tubo con las iniciales del paciente, el número asignado y la fecha a cada uno de ellos. La muestra se centrifugó a 4,000 rpm,

durante 10 minutos para la obtención del suero. Posteriormente fue separado y conservado en congelación hasta su uso.

3.3. PRUEBA CUTÁNEA

3.3.1. Metodología de la prueba cutánea

Se realizó según el procedimiento descrito por Osterballe en 1979⁶⁰, mediante lancetas estandarizadas (Prick-Lancett BN. Dome /Hollister-Stier).

Como control positivo se utilizó clorhidrato de histamina a 10 mg/ml y como control negativo solución salina. Se realizaron pruebas cutáneas en prick-test por duplicado en ambos brazos. Se siguieron las recomendaciones del Subcomité on Skin Test de la E.A.A.C.I⁶¹. Entre ellas se recogen los siguientes criterios:

- Se efectuaron por la misma persona y con el mismo tipo de lanceta durante todo el estudio.
- Se realizaron en la cara anterior del antebrazo disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm y comenzando a unos 3 cm de la flexura del codo y hacia la muñeca hasta 5cm de la misma. En el antebrazo opuesto se dispusieron las concentraciones en orden inverso.
- Se hicieron por duplicado para cada concentración de antígeno y de los controles positivo y negativo. El tiempo de lectura fue de 15 minutos para todos los pacientes.
- Los pacientes no recibieron ningún tipo de medicación que pudiera modificar la respuesta cutánea.

Se dibujó el contorno de las pápulas mediante un rotulador de punta fina, delimitando el área de cada pápula obtenida y se transfirió mediante cinta adhesiva transparente a un papel (anexo VI) para el cálculo posterior de su área por planimetría.

Las pápulas se midieron por papulometría (Wacom Technology Co., Vancouver, Wash., USA, and MacDraft, Microspot, USA). Se consideró positivo $\geq 7\text{mm}^2$. Se midieron por duplicado y se transcribieron los resultados en mm^2 a una hoja Excel donde se realizó la media de cada uno de ellos.

3.3.2. Extractos

Se fabricaron extractos de 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* incluidas en el estudio: *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *A. patula*, *A. halimus*, *B. scoparia*, *S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *A. deflexus* y *A. muricatus*. Los extractos fueron aportados por el laboratorio LETI S.L. (Tres Cantos, Madrid, Spain) y se prepararon según se expone en el punto 3.5 del material y métodos.

3.3.3. Recogida de resultados

El resultado de cada pápula se midió 3 veces, y se realizó la media de las tres determinaciones, para cada extracto, en ambos brazos y se transfirió la media a una hoja Excel. Los resultados se transcribieron a mm^2 .

Se cálculo para cada especie el diámetro máximo, mínimo, la media y el intervalo de confianza para poder realizar todo el estudio estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis y análisis de Anova con los resultados de las pápulas.

3.4. MATERIA PRIMA

Se utilizó como materia prima polen de las 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* previamente mencionadas. Todas ellas presentaron un grado de riqueza superior al 95% y fueron suministrados por Mediterráneo polen (Spain).

Debido a las similitudes morfológicas de todos los pólenes y su imposibilidad de distinguirlo por métodos visuales (figura 26), todos ellos fueron recolectados en el año 2006 por personal experto y entrenado y certificados adecuadamente siguiendo la Guideline de alérgenos en vigor en ese momento.

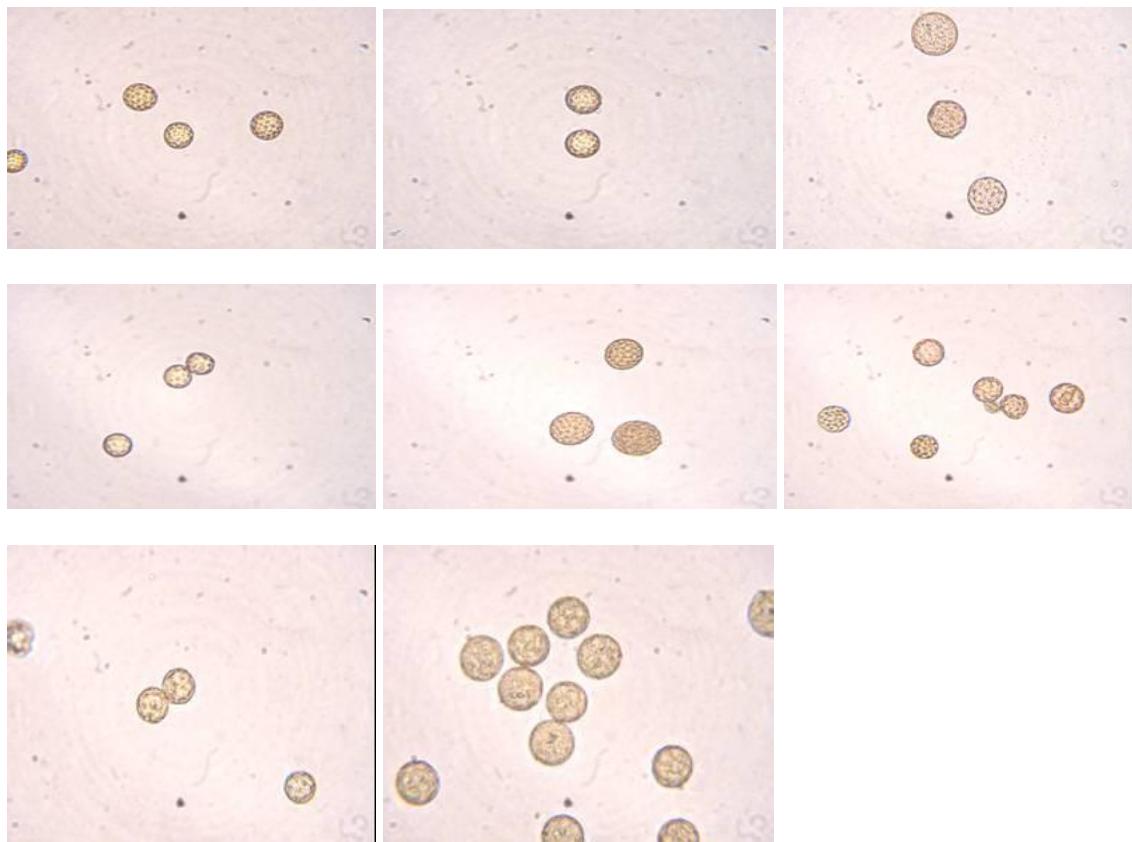


Figura 26. Visión a microscopia óptica de diferentes polenes de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*.

Descritos de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo son *B. scoparia*, *A. halimux*, *A. deflexus*, *C. vulvaria* y *C. murale*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia* y *S. kali*. www.pinterest.com/pollenatlas/

3.5. FABRICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la elaboración de los extractos se siguieron las siguientes etapas:

3.5.1. Desengrasado de la materia prima

En primer lugar se procedió al desengrasado de la materia prima de las 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* (*C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *S. kali*, *S. vermiculatta*, *S. oppositifolia*, *B. scoparia*, *A. patula*, *A. halimux*, *A. deflexus* y *A. muricatus*) con acetona. Se añadió 100 ml de acetona por cada 10 g de materia prima. Se colocó en matraz adecuado y se dejó en agitador magnético para que se mezcle bien, durante 10 minutos. Posteriormente se filtró al vacío como mínimo 3 veces hasta que el líquido quedo completamente transparente y se dejó secar. Por último se pesó toda la materia prima ya desengrasada.

3.5.2. Fabricación del extracto

A partir del peso en gramos obtenido de la materia prima desengrasada del polen de las 11 especies se realizaron dos extracciones.

- La primera se extrajo en una solución de PBS 0,01M pH 7,4 a una dilución 1:10. El polen disuelto se homogenizó y se extrajo sobre un agitador magnético (modelo Agimatic-S Selecta. Barcelona, Spain) en cámara fría a 4 -5°C, durante 16 horas. Pasado este tiempo se centrifugó (Centrifugadora Sorvall. Modelo RC5C) a 16.000 g durante 30 minutos a 4- 5°C y se recogió el sobrenadante. Se identifica como **extracto I** y se guardo en cámara fría.
- El precipitado se utilizo para la extracción 2. En un recipiente adecuado, el producto precipitado se disuelve nuevamente e una solución 1:10 de PBS 0,01M pH7,4. Se homogenizó y se dejó en agitación, en cámara fría, durante 4 horas

más. Transcurrido este tiempo, se volvió a centrifugar a 16.000 g a 4 - 5°C durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante. Se etiquetó como extracto II.

Las dos fracciones se juntaron en un solo extracto y el extracto completo se filtró mediante sistema de vacío Sartorius (Goettingen. Alemania) hasta 0,2 μ de diámetro mediante filtros de celulosa acetato. Posteriormente se dializó con membranas de 3,5 Kda hasta que se consiguió una conductividad inferior a 500ppm. De nuevo se volvió a filtrar hasta 0,2 μ .

Se dosificó el extracto en botes especiales de liofilizado y se congeló a -50°C en baño de congelación (modelo Heto).

Finalmente cuando estuvo completamente congelado se liofilizó (FTF Systems, New York, USA, modelo Flexi-Dry MP) y tras la liofilización se pesó y se etiquetó.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

3.6.1. Determinación del contenido proteico

Para determinar el contenido proteico de los extractos se utilizó el método de Lowry-Biuret⁶², que es dependiente del contenido de Tirosina y Triptófano de las proteínas.

Método de Lowry-Biuret

Se realizaron diluciones seriadas de los extractos de las 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, según el caso, utilizando como diluyente una solución de Cloruro sódico al 0,85% en una placa de baja adsorción, a razón de 60 μ l/pocillo y por duplicado, para que quedara a una concentración proteica final de 0,8 mg/ml. En las columnas 1 y 2 se realizaron diluciones seriadas del estándar (BSA) previamente diluido,

de manera que se comenzara a una dilución de 1 mg/ml. Se añadieron 330 μ l de reactivo Biuret a todos los pocillos dejando agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente 15 μ l del reactivo Folin y Ciocalteu's phenol dejando agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se leyeron los resultados en un lector de placas a 725 nm, expresando los resultados en densidades ópticas.

Para la expresión de los resultados se utilizaron hojas de cálculo, en la que se comparaba la recta problema con una recta patrón de albúmina. Se determinó la concentración de proteínas en μ g de proteína/mg de liofilizado de las muestras sobre la curva de calibración.

3.6.2. Caracterización antigénica de los extractos

3.6.2.1. SDS-PAGE

Esta técnica se utiliza para separar mezcla de proteínas en función de sus diferentes masas moleculares.

Se desengrasaron las dos placas de vidrio con alcohol y se montaron en su soporte, dejando entre ambas un espacio de 0,75 mm, con la ayuda de unos separadores de este grosor. El soporte se encontraba correctamente nivelado.

Elaboración del gel

Se preparó el *SEPARATING GEL* (15%T; 2,67%C), en un tubo de ensayo con los siguientes reactivos: Agua ultrapurificada 1,88 ml; TRIS 1,5 M pH=8,88 2 ml; SDS 10% 80 μ l; Solución stock monómero A/B 30% T 4 ml; APS 10% 40 μ l; TEMED 4 μ l. Con la ayuda de una pipeta se llenó lentamente el espacio existente entre las dos placas de vidrio, aproximadamente 3,6 ml por gel, evitándose las burbujas en el gel. Posteriormente se

enrasó con agua con el fin de que el frente quedara en línea recta y minimizar así la distorsión. El gel se dejó polimerizar durante 30-45 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó el *STACKING GEL* (4%T; 2,67%C), en un tubo de ensayo, con los siguientes reactivos: Agua ultrapurificada 1,525 ml; TRIS 0,5 M pH=6,8 625 µl; SDS 10% 25µl; Solución stock monómero A/B 30% T 333 µl; APS 10% 12,5 µl; TEMED 2,5 µl; Con este volumen se llenó la parte superior del gel, inmediatamente encima del Separating gel, se colocó un peine dentado y se dejó polimerizar durante 30-45 minutos. Posteriormente se retiró el peine quedando 10 pocillos para dispensar las muestras.

Preparación de las muestras

Cómo marcador de pesos moleculares se utilizó el estándar *low molecular weight* de BioRad (Hercules, CA, USA), que utiliza proteínas de peso molecular conocido: fosforilasa B (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

Las 11 muestras alergénicas de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* se prepararon a una concentración final de 80 µg de proteína para tinción Coomassie y 70 µg para tinción con plata, así como el estándar de bajo rango molecular, se diluyeron en el tapón de muestra en condiciones reductoras incubándose durante 10 minutos a 90-95°C para posteriormente centrifugarlas durante 1 minuto a 16000g. Así preparadas se dispensaron en el fondo de cada pocillo.

Electroforesis de las muestras

Para el desarrollo de la electroforesis se introdujeron los geles en el tanque de electroforesis (BioRAD). Se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación (Power PAC 3000) y se hicieron correr las muestras a 180 v (cte), 100 mA y 20 W, en un tampón TRIS para electrodos pH = 8,3, hasta que el frente iónico (azul de bromofenol) se acercó al borde inferior.

Tinción del gel con Coomassie

El gel preparado se lavó en agua ultrapurificada durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió solución colorante (Bio Safe-Coomassie, BioRad. Hercules, CA, USA) hasta cubrir el gel totalmente, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. El proceso se desarrolló retirando la solución de teñido y añadiendo agua ultrapurificada durante 2 horas hasta que el fondo queda transparente. El gel se secó en desecador de geles (Model 583 Gel Dryer. BioRAD) durante 3 horas.

Tinción del gel con plata

El gel se introdujo en una solución fijadora hasta cubrirlo totalmente durante 45 minutos.

Posteriormente se retiró el reactivo y se añadió la solución oxidante cubriendo totalmente el gel, con agitación suave durante 5 minutos hasta que adquirió un color amarillo. Se realizó un lavado con agua ultrapurificada durante 10 minutos repitiéndose hasta que el gel quedó transparente. Posteriormente se añadió el reactivo de plata,

manteniéndolo en agitación suave durante 20 minutos. Se volvió a realizar un lavado con agua ultrapurificada durante 20 segundos, se retiró y se añadió el reactivo de desarrollo, en agitación durante 30 segundos hasta que el líquido adquirió color grisáceo. Se retiró y se volvió a añadir hasta que comenzó a visualizarse bandas tenuemente. Se volvió a retirar y se añadió el resto, hasta que se objetivaron las bandas de forma evidente.

Cuando se visualizaron todas las bandas nítidamente se retiró el reactivo de desarrollo y se añadió la solución de parada durante 1 hora.

Se retiró la solución de parada y se lavó con agua ultrapurificada hasta cubrir el gel una hora más en agitación.

Se puso en el agua 2 papeles de secado. Se coloco el gel en el desecador (Model 583 Gel Dryer. BioRAD) entre los dos papeles y al vacío dejando secar durante 3 horas.

3.6.2.2. Isoelectroenfoque

Se extrajeron las tiras de IPG o tiras de gradiente isoeléctrico proteico (ReadyStip IPG de BioRad, Hercules, CA, USA), con un gradiente de pH 3-10, del congelador durante 10 minutos para que se atemperen, antes de comenzar a trabajar con ellas.

Se retiró el plástico protector de la tira de IPG y se colocó en su carril correspondiente boca abajo, en contacto con la solución que previamente habíamos preparado (apartado A de 3.3.2.3 Electroforesis bidimensional) y cuyo volumen final debe de ser de 125 μ l, para cada tira y una concentración máxima de proteína de 170 μ g.

Se dejó 30 minutos en una superficie horizontal y después se añadió 1ml de aceite mineral. Se dejó incubar durante toda la noche.

Transcurrido ese tiempo se secó la tira, se limpió y se dejó escurrir el aceite.

Se colocaron 2 papeles de filtro humedecidos con 10 μ l de agua ultrapura en los electrododos y a continuación se colocó la tira con la muestra, de modo que el gel tocase los electrodos y se añadió 1ml de aceite mineral en el carril, de modo que quedó totalmente cubierta.

Se cerró la caja y se ajustó las condiciones de la fuente (preenfoque, enfoque y desarrollo) durante 5 horas. Una vez que finalizó el proceso, se recogió la tira, se limpió, se eliminó el aceite y se tiñó.

A continuación se preparó un gel de SDS-PAGE según procedimiento normal, pero solo el separating y con un solo pocillo de corrido. Se equilibró la tira insertándola en 2,5ml del buffer equilibration I (20ml de urea 6M, SDS 2%, Tris-HCL 0,375M a ph 8.8, glycerol 20% y DTT al 2% (w/v) durante 15 minutos. Se secó, se limpió y se insertó en 2,5ml del buffer equilibration II (20ml de urea 6M, SDS 2%, Tris-HCL 0,375M a ph 8.8, glycerol 20%) durante otros 15 minutos. Se secó, se limpió y se insertó en el buffer de desarrollo del gel SDS- PAGE otros 5 minutos.

Una vez que el gel polimerizó, se colocó la tira en el gel y se selló con agarosa líquida, previamente calentada en el microondas.

Se puso a correr el gel en las condiciones habituales (apartado 3.6.2.1).

Finalmente lo teñimos con azul de coomassie y plata (según protocolo 3.6.2.1).

3.6.2.3. Precipitación de extractos e isoelectroenfoque bidimensional

A. Precipitación de extractos

ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit instruction manual (BioRad laboratorios. Hercules, CA 94547 USA)

El objetivo consiste en concentrar al máximo la cantidad de proteínas para conseguir posteriormente separarlas por su punto isoeléctrico y peso molecular.

Se tienen que transferir 300 μ l de proteína en un volumen final de 100 μ l; para ello se calculó para cada especie de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* según su concentración proteica obtenida por el método de Lowry, los μ l de extracto que se precisan para conseguir 150 μ g de proteína por tira.

Se añadió 300 μ l del agente precipitante 1 a la muestra y se mezcló bien en vórtex, dejando luego incubar 15 minutos en el hielo.

Pasado el tiempo de incubación se añadió 300 μ l del agente precipitante 2 a la mezcla de proteína y al agente precipitante 1 y se agitó bien en el vórtex. Se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm y se retiró el sobrenadante, sin tocar el precipitado. Se centrifugó 15- 30 segundos más y se eliminó el líquido residual.

Se añadieron 40 μ l del reactivo 1 wash sobre el precipitante y se volvió a centrifugar a 12.000rpm durante 5 minutos. Se retiró con una pipeta el wash y se añadieron 25 μ l de ReadyPrep proteomic grade wáter. Se mezclo todo bien en el vórtex durante 10- 20 segundos.

El precipitante se dispersó bien, pero sin disolverse en el agua.

Se añadieron entonces 1ml del reactivo wash 2 (que previamente estuvo durante al menos 1 hora a -20°C) y 5 μ l del aditivo wash 2. Se mezcló todo bien en el vórtex durante 1 minuto.

Se incubó a -20ºC durante 30 minutos y cada 10 minutos se agitó en el vórtex, durante 30 segundos.

Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a centrifugar 30 segundos más para retirar el resto y se dejó al aire libre 5 minutos para que se evaporase.

Se re-suspendió añadiendo un volumen de 125µl de 2-D rehidratación/simple buffer sobre el precipitante. Se mezcló todo bien en el vórtex al menos 30 segundos y se dejó a temperatura ambiente incubándose 3- 5 minutos. Se volvió a mezclar en agitación durante 1 minuto y se re-suspendió todo. Finalmente se centrifugó la muestra durante 2- 5 minutos.

B. Primera dimensión

La metodología es la misma que la descrita en el **apartado 3.6.2.2. Isoelectrofoque.**

C. Segunda dimensión

La metodología es la misma que la descrita en el **apartado 3.6.2.1. SDS-PAGE.**

3.6.2.4. Detección de glicoproteínas

Tinción de glicoproteínas

Kit Glycoprotein detection. Electrophoresis reagent. USA. Sigma.

Una vez realizada la electroforesis en los extractos, la presencia de glicoproteínas se realizó a través de su tinción, con unos límites de detección en torno a 25- 100 ng de grupos glucídicos adheridos a proteínas.

Se situó el gel en un recipiente adecuado y se añadió 200 ml de la solución fijadora (metanol 200ml y agua ultrapurificada 200ml) durante 30 minutos y en agitación suave constante. Se eliminó el contenido y se realizaron dos lavados con 200ml de agua ultrapurificada durante 10 minutos cada una.

Posteriormente se añadió 100 ml del reactivo oxidante, proporcionado por el Kit de tinción y se mantuvo en agitación durante 30 minutos.

Se eliminó el contenido y se realizaron dos lavados con 200 ml de agua destilada de 2º osmosis durante 10 minutos cada una.

Se eliminó de nuevo el contenido y se añadió 100ml de solución de teñir proporcionado por el kit (Schiff's reagent Fuchsin- Sulfite reagent) durante 2 horas y en agitación constante.

El recipiente se mantuvo en todo momento tapado para evitar la salida de vapores.

Finalmente se retiró el contenido y se puso en agua destilada abundante durante 15 minutos y en agitación suave. Se repitió el paso 2 veces más y por último se dejó el gel en el agua toda la noche para intensificar el color de las bandas.

Se retiró el gel y se secó siguiendo el procedimiento normal.

3.7. PERFIL ALERGÉNICO

3.7.1. Inmunoblotting IgE

Con esta técnica se transfieren las proteínas, separadas electroforéticamente desde un gel de poliacrilamida, hasta otro soporte de Fluoruro de Polividileno (PVDF) (Millipore, Bedford, CA, USA). Posteriormente se pretende identificar antígenos específicos.

Se realizaron los pasos anteriormente descritos en la técnica de SDS-PAGE (**apartado 3.6.2.1**) para la realización de la electroforesis y obtener la separación de bandas en función de su tamaño molecular. El gel no se tiñó para realizar la transferencia.

Transferencia de proteínas (Tris/Glicina Buffer 10x. BioRad)

Se humedecieron 2 esponjas y 2 hojas de papel de filtro en tampón de transferencia. Así mismo se equilibraron los geles obtenidos en la electroforesis con el tampón de transferencia. Por otra parte se humedeció una lámina de PVDF o immobilón-P en metanol durante 2-3 segundos y en agua de segunda ósmosis durante 1-2 minutos y se equilibró la lámina con el tampón de transferencia durante 5-7 minutos.

Se colocó una de las esponjas humedecidas sobre la cara gris de la célula de transferencia (cara del cátodo), seguida por una lámina de papel de filtro también humedecida, evitando las burbujas en todo momento. Se depositó el gel sobre los papeles y la lámina de PVDF sobre el gel, cubriéndola con otra 2 hoja de papel de filtro y sobre ellas otra esponja. El sándwich se cerró y se coloco en el centro del tanque con la cara gris de la misma hacia el cátodo llenando el tanque con tapón de transferencia e introduciendo la unidad refrigerante dentro. Se conectó a la fuente de alimentación durante 1 hora en las siguientes condiciones: 100 v (cte), 315 mA, 20 W. Al finalizar la transferencia la lámina se dejó secar en papel de filtro a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente se cortó el estándar y se tiñó con solución colorante (Coomassie) hasta que se vieron las bandas para posteriormente desteñirlo con solución decolorante.

Incubación con suero del paciente ó Inmunodetección

La lámina se depositó en una cubeta y se añadió, el pool de sueros de los pacientes positivos frente a *S. kali* y/o *C. album*, a una dilución ½, según el caso. Se tapó con una lámina selladora y se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación suave y constante. Posteriormente se lavó con PBS-Tween 0,1% 5 veces.

Incubación con el conjugado

La lámina se incubó con anti-IgE marcada con peroxidasa, a una concentración 0,4 µg/ml, diluido en tampón PBS-Heparina y suero de ternera fetal 15% durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se lavó la lámina 5 veces con PBS-Tween 0,1% y a continuación con agua de segunda ósmosis 10 veces.

Revelado de la membrana mediante quimioluminiscencia

La lámina se dejó incubar en solución de desarrollo (Immun-Star HRP Peroxide Buffer e Immun-Star HRP Luminol/Enhancer. Bio-Rad laboratorios) durante 5 minutos. A continuación se puso en el equipo de quimioluminiscencia (ChemiDoc™ XRS. Systems) y se visualizaron las bandas mediante el software QuanyOne – V 4.5.1.

3.7.2. Procesamiento de las imágenes y medida de los alérgenos antigénicamente más relevantes

Este procedimiento se usa para procesar y analizar imágenes que han sido obtenidas con el escáner y el programa Labscan. Se siguió el manual de usuario, ImageMaster 1D Software. 80-6362-53, Rev. B. Pharmacia Biotech.

Se escanearon los geles de SDS-PAGE e IEF con el scanner y el programa Labscan (versión 6.0), la fotografía que se obtuvo de la transferencia de proteínas, se estudió con el sistema de análisis ImageMASTER 1D Elite V 4.00, para establecer los pesos moleculares de las bandas, así como su intensidad. La cantidad de alérgeno se expresó como µg de alérgeno por mg de proteína en el extracto.

Para determinar el perfil antigénico de las bandas de cada extracto, se utilizó como marcador molecular, el estándar de bajo peso molecular (LWM de BioRad) (figura 27).

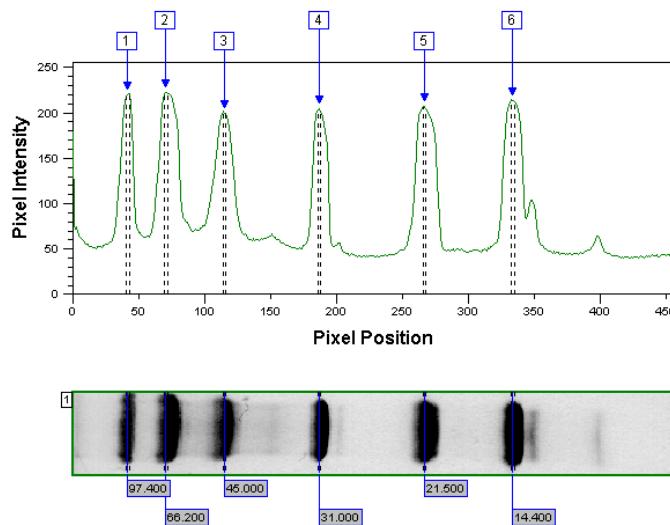


Figura 27. Estándar de Bio-Rad

3.8. DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA

3.8.1. Marcaje de alérgenos con Biotina

Kit Biotin Protein Labeling. Roche Diagnostics

El procedimiento consiste en el marcaje de las proteínas con biotina, para su posterior conjugación con immunoCAP100 de Phadia (Uppsala, Suecia) de estreptavidina.

El principio del marcaje es a través de los grupo amino libre de las proteínas, que reaccionan con D- biotinoyl- aminocaproico acid N- hydroxy- succinimide ester (biotin-7-NHS) formando un enlace amido estable. La biotin- 7- NHS que no reacciona se separara en una columna de Sephadex G-25.

Marcaje

Es necesario marcar los extractos con biotina puesto que los InmunoCAP vacíos contienen estreptavidina, que reacciona con la biotina que va marcada con el alérgeno y este se queda pegado a las “esponjas”.

Se pesaron los extractos, ya que deben tener un contenido de proteína superior al 70%. En nuestro caso todas las *chenopodiaceas* superaron el 80%.

Se necesitó 1 mg de cada extracto. Al tenerlo disuelto a 40 mg/ml, se trabajó con 25 µl de cada extracto.

Se calculó el marcaje con biotina en función del peso molecular del alérgeno o alérgenos principales o mayoritarios. El marcaje se realizó a una dilución 1/5.

Para el caso de *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *B. scoparia*, *A. deflexus* y *A.muricatus*, se consideró el peso molecular del alérgeno mayoritario de 10 KDa, que trasladado a la tabla y para una dilución de 1/5, correspondió con 0,0227 mg de biotina.

Teniendo en cuenta que la biotina está a 20 mg/ml, precisamos 11,35 µl de biotina, para cada uno de estos extractos.

En el caso de la *S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *A. halimus* y *A. patula*, se consideró el peso molecular de los alérgenos mayoritarios de 40_KDa, que para una dilución 1/5, corresponde a 0.057 mg de biotina. Se añadió así 2,85 µl de biotina, a cada uno de los extractos.

Posteriormente se añadió 200 µl, de PBS a los 25 µl de cada extracto alergénico y a continuación se marcó con la biotina-DMSO que precisó cada uno de ellos (tabla 5).

Se incubaron 2 horas en agitación constante, a temperatura ambiente.

Especies	Extracto (40mg/ml)	PBS 0,01M	PM	Biotina (20mg/ml)	Biotina µl	PBS 0,01M	TOTAL
<i>Ch. album</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml
<i>Ch. vulvaria</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml
<i>Ch. murale</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml
<i>S. kali</i>	25 µl	175µl	40 KDa	0,057 mg	2,85µl	800µl	1 ml
<i>S. vermiculata</i>	25 µl	175µl	40 KDa	0,057 mg	2,85µl	800µl	1 ml
<i>S. oppositifolia</i>	25 µl	175µl	40 KDa	0,057 mg	2,85µl	800µl	1 ml
<i>B. scoparia</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml
<i>A. patula</i>	25 µl	175µl	40 KDa	0,057 mg	2,85µl	800µl	1 ml
<i>A. halimus</i>	25 µl	175µl	40 KDa	0,057 mg	2,85µl	800µl	1 ml
<i>A. deflexus</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml
<i>A. muricatus</i>	25 µl	175µl	10 KDa	0,227 mg	11,35µl	800µl	1 ml

Tabla 5. Concentración de biotina para cada especie expresado en µl.

Posteriormente se añadió los 800 µl de PBS restantes, para obtener la concentración final a 1 mg/ml. Durante el tiempo de incubación - agitación de las muestras, se preparó las columnas con múltiples lavados.

Se sujetó la columna con una pinza y se puso un matraz de 100 ml debajo de la misma. Se abrió la salida de la columna y se dejó que salga el contenido. Posteriormente se añadieron 5 ml del reactivo bloqueante (albumina 0,1%) y se dejó que vaya saliendo de la columna. Después se lavó con 30 ml de PBS 0,01M, evitando que se secase la columna.

Transcurrido el tiempo de incubación, se pasó el contenido de alérgeno marcado por la columna. Primero se dejó que se vaciara del PBS y antes de que se secase se puso 1ml del alérgeno marcado. Una vez que pasó todo el alérgeno, se añadió 2,5ml de PBS y se dejó que entrara en la columna, para volverse a añadir 3,5ml de PBS y en ese momento se comenzó a recoger 10 gotas por eppendorf hasta completar un total de 6 eppendorf por cada alérgeno marcado.

Para confirmar la presencia de proteínas en la solución se midió en el espectofotómetro (Termo Electrón corporation, modelo evolution 300BB. UK) a 280 de longitud de onda. Se seleccionaron las 3 primeras absorbancias de cada alérgeno, que estaban todas por encima de 0,2. El alérgeno marcado con biotina se guardó congelado a -20ºC.

La columna se limpio mediante la realización de 3 lavados de 5 ml de PBS después de cada alérgeno. Para guardarla, se añadió 10 ml de timerosal 0,01M, dejando que pase a través de la columna, dejando al final 1cm de líquido en la parte superior de la columna y conservándola a 2- 8ºC de temperatura.

3.8.2. Determinación de IgE específica a *S. kali* mediante uniCAP100

Se siguió las normas de actuación del UniCAP100, con la utilización de uniCAPs comerciales para el alérgeno. Se utilizó en software Hp1740 y el programa de InmunoCAP V4.11. Las unidades se expresaron en KU/L.

3.8.3. Procedimiento de ensayo manual en UNICAP100

Uso de streptavidin ImmunoCAP en UNICAP100

(kit de marcaje Biotin Labeling, Roche, Indianapolis, USA)

El objetivo del ensayo manual con estreptavidina consiste en la reacción de la estreptavidina de los InmunoCAP vacíos (InmunoCAP de estreptavidina: RO212 Ref 14-5320-10) con la biotina que va unido al alérgeno, quedando este fijado al uniCAP, y permitiendo así su cuantificación.

La medición se realizó con el UNICAP100, según procedimiento habitual con el software Hp1740 y el programa de InmunoCAP V 4.11. El resultado se expresó en KU/L.

3.9. RECUENTO DE POLEN

Los datos de los recuentos de pólenes de *Chenopodicaeae/Amaranthaceae* fueron cedidos por los **Dres. Pola y Zapata**, responsables de la estación de recuento de pólenes de la SEAIC en Zaragoza, que consta de un captador de pólenes de tipo **Burkard**, a 15 m de altura y con un flujo de aspiración de 10 L/min. El recuento polínico se realizó siguiendo las recomendaciones de la Asociación Europea de Aerobiología⁶³.

3.10. FENOLOGÍA DE LA FLORACIÓN EN CHENOPODIACEAE Y AMARANTHACEAE

3.10.1. Selección de especies

Las especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* que se seleccionaron son las más comunes y abundantes, de ambas familias, que se pueden encontrar en el valle del Ebro y que aportan la mayor parte de polen. Se siguieron las recomendaciones de Samuel Pike⁶⁴, para confeccionar la lista y se comparó con las citadas por Javier Puente⁶⁵ y por el Atlas virtual de la Flora de Aragón⁶⁶, en ambos casos para el Valle del Ebro (anexo VI).

Las especies definitivamente propuestas fueron (tabla 6).

ESPECIES
<i>Chenopodium album</i>
<i>Chenopodium vulvaria</i>
<i>Chenopodium murale</i>
<i>Salsola kali</i>
<i>Salsola vermiculata</i>
<i>Salsola oppositifolia</i>
<i>Bassia scoparia</i>
<i>Atriplex patula</i>
<i>Atriplex halimus</i>
<i>Amaranthus deflexus</i>
<i>Amaranthus muricatus</i>

Tabla 6. Especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* estudiadas

Para el estudio de la fenología de cada una de las especies se contó con un botánico experimentado, quien valoró de forma semanal el estado de floración y polinización de las 11 especies.

Se siguieron de los meses de mayo a octubre, ambos incluidos, en dos años consecutivos 2007 y 2008. El área estudiada fue el entorno urbano de Zaragoza y

cercanías, en un radio de 8 a 10 km. Se tuvo en cuenta la dominancia de los vientos en la capital, predominantemente de Noroeste.

La situación de las localidades a estudio, donde existen poblaciones de estas plantas y donde se llevó a cabo la recogida de datos son las siguientes (tabla 7), que cubren los cuadrantes noroeste, suroeste y sureste del entorno de Zaragoza capital (figura 28).

LOCALIDADES

VF	Valdefierro, solar abandonado y antiguo camping
CS	Casetas, solar abandonado y ribazos
MZ	Monzalbarba-Alfocea, aceras, rotonda autovía y ribazos
JU	Juslibol, entorno del camino al galacho
AL	Almozara, solar Cº La Noguera
MF	Miraflores, pol. Industrial y descampados junto N-232
TO	Torrero: graveras y campos en barbecho

Tabla 7. Localidades donde se llevó a cabo el estudio de la floración de las especies.



Figura 28. Plano de Zaragoza y cercanías. Las marcas con un punto negro indican las localidades donde se realizaron la recogida de datos de la floración de las especies.

3.10.2. Floración

3.10.2.1. Método general

El objetivo de este método fue evaluar el estado general de floración de las especies, mediante la observación visual.

El seguimiento se realizó a través de una lupa de bolsillo x8 y lupa binocular x20.

Sé registró si las plantas se hallaban en estado de mero crecimiento vegetativo (V), si presentaban inflorescencia con botones florales (FB), si se apreciaban flores masculinas en antesis (FL) y si existían frutos en diferente grado de maduración (FR). En casos concretos, en los que en el campo no se pudo apreciar bien el estado de las inflorescencias, se tomaron muestras y se observaron con lupa binocular.

Se anotó la cantidad de ejemplares que constituyen cada población en cada caso, con el fin de tener una referencia sobre la representatividad de los datos. Cada categoría se expresa según las claves que se exponen en la tabla 8.

DATOS REGISTRADOS

TIPO DE POBLACIÓN

0	Ejemplar aislado
A	0 a 10 ejemplares
B	10 a 100 ejemplares
C	> 100 ejemplares

ESTADO DE LA FLORACIÓN

V	Presencia de la especie, en crecimiento vegetativo
FB	Botones florales presentes
FL	Flores masculinas visibles
FR	Frutos presentes

NÚMERO DE BOTONES, FLORES, FRUTOS

1	Escaso número, elementos dispersos
2	Abundante, presencia continua
3	Muy abundante, presencia masiva

CANTIDAD DE PLANTAS EN FLORACIÓN

0	ejemplar aislado
1	algunos ejemplares dispersos
2	grupos de ejemplares
3	todos o casi todos los ejemplares

Tabla 8. Claves con las que se nominó a cada categoría.

En función de las observaciones que se registraron se obtuvieron unos niveles de floración, que fueron el resultado de multiplicar el número de flores, por la cantidad de plantas que presentaban floración; estos niveles quedaron definidos de la siguiente forma (tabla 9).

NIVELES DE FLORACIÓN	
I	Escasa
II	Media
III	Alta

Tabla 9. Niveles de floración (Nivel I: ejemplares aislados o dispersos con flores; Nivel II: grupos continuos de ejemplares en flor; Nivel III: la mayor parte de las plantas con flores en abundancia)

3.10.2.2. Método específico

Al mismo tiempo se realizó otro método más específico, el llamado método semicuantitativo de Orshan⁶⁷ que permitió detectar el momento de máxima polinización para cada una de las especies.

Para este seguimiento se marcaron al menos 10 plantas representativas de una especie, de al menos 50 individuos y se hizo un registro del porcentaje de ramas de las plantas marcadas que presentaban *flores en antesis*. Los datos se trasfirieron a una hoja Excel donde se concretó el periodo de máxima floración.

Dado la complejidad del método únicamente se realizó el seguimiento en 6 especies consideradas como las más significativas del área. Las especies seleccionadas fueron:

- *A. halimus*
- *B. scoparia*
- *C. album*
- *S. kali*
- *S. vermiculata*
- *A. retroflexus*

3.11. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.

En el presente trabajo experimental se aplicó la metodología estadística apropiada a cada ensayo; siguiendo el estudio estadístico de los resultados según el modelo de investigación científico en el que estuvieran encuadrados, basado en el diseño de los modelos científicos elaborado por Doménech⁶⁸.

A continuación se describen cada uno de los diseños estadísticos que aparecen en el presente trabajo para el estudio de determinación de IgE específica y total, el estudio de caracterización de extractos (contenido proteico, ELISA-inhibición,) y los ensayos de determinaciones entre grupos de pacientes.

El proceso estadístico difiere según el tipo de estudio, tal como se detallan en los siguientes apartados.

1. **Índices descriptivos.** Para medir la distribución de datos se utilizaron los siguientes índices estadísticos:

A) Los índices descriptivos basados en momentos para variables cuantitativas: se utilizó la media aritmética como medidas de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión.

B) Medidas basadas en ordenaciones: como medidas de tendencia central se utilizó la mediana, que aporta un valor central de un conjunto de observaciones y como medidas de dispersión; los cuartiles 25 y 75.

2. **Representaciones gráficas.**

A) Para variables categóricas se confeccionaron representaciones de diagrama de barras, diagrama de barras apiladas y agrupadas.

B) Para variables cuantitativas se eligió el diagrama de caja -*boxplot*-; así como diagrama de barras y barras agrupadas para las medidas basadas en momentos.

3. **Técnicas estadísticas** para comparación de variables.

Para la comparación estadística de variables, se adoptaron los métodos propuestos por Fisher en que se establece como mínimo intervalo de confianza (IC) el 95%, despreciando el 2,5% de cada una de las dos colas -5% total- de las distribuciones muestrales. Según esto para los test estadísticos de variables, se ha utilizado como grado de significación estadística un valor de $p<0,05$. Para la comparación entre las

variables independientes (tiempo y grupo) y las variables dependientes, atendiendo a la naturaleza de las últimas, se dispuso el siguiente procedimiento:

- A. Variables cuantitativas: para la exploración de datos y detección de anomalías se realizó una bondad de ajuste a una distribución normal, mediante el cumplimiento del test de normalidad de Shapiro-Wilks y la verificación de igualdad de variancias entre los resultados de cada categoría a través del test de Levene.

En las pruebas de independencia para comparación de 2 medias se utilizaron la prueba de Wilkoxon para datos pareados y en la comparación entre una variable dependiente con otra independiente con varias categorías se realizaron análisis de la variancia (ANOVA); donde se cálculo la intensidad de la relación dependiente mediante el coeficiente η^2 , cuando no se vulnera el supuesto de normalidad, ni el de homogeneidad de las variancias en los datos de las variables, obtenido a través del test de Shapiro-Wilks; y contrastes múltiples *a posteriori* mediante el procedimiento de Bonferroni. Y el test de Kruskal Wallis, cuando se vulnera, en cualquier categoría, el supuesto de normalidad o el de homogeneidad de las variancias del test de Shapiro-Wilks, y contrastes múltiples *a posteriori* mediante el procedimiento de Dunn.

- B. Variables categóricas: se realizó el test de χ^2 de Pearson para la comparación de las razones obtenidas.

- C. Análisis de regresión multivariante para la comparación de resultados con diferentes variantes

- D. Técnicas de correlación de variables para el cálculo de coeficiente de correlación.

Se realizaron también estudios con técnicas de regresión.

Se tomaron como valores significativos aquellos cuyo valor fue $p \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

4.1.1. Datos Demográficos

Se contó al inicio con 60 pacientes, con edades comprendidas entre los 18 y 75 años, todos monosensibles a *Chenopodiaceae* y residentes en el área de Zaragoza.

De los 60 pacientes seleccionados, un total de 37 llegaron a concluir el estudio. Las causas de abandono fueron en la gran mayoría la falta de cumplimentación de los cuadernillos de síntomas a diario (8 pacientes), la no asistencia a las visitas programadas (8 pacientes), los trasladados a otras ciudades (5 pacientes) o la imposibilidad de cumplir por motivos laborales (2 pacientes).

En lo referente al sexo (figura 29); 27 fueron mujeres (73%) y 10 varones (27%), con una media de edad de 35 ± 9.3 años (figura 30).

Diez pacientes (27%) presentaban antecedentes familiares de enfermedad atópica.

El tiempo medio de evolución de la enfermedad alérgica en estos pacientes fue de 6,1 años (2-20).

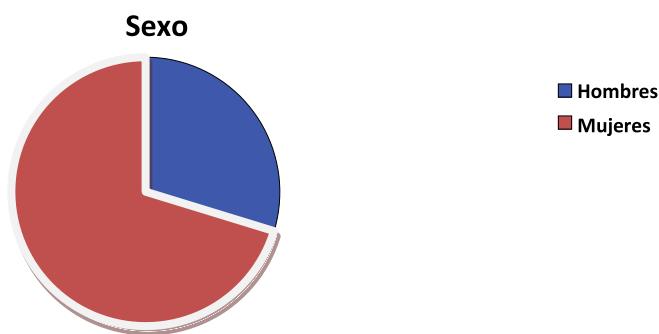


Figura 29. Distribución del sexo en los pacientes incluidos en el estudio; 73% mujeres y 27% varones.

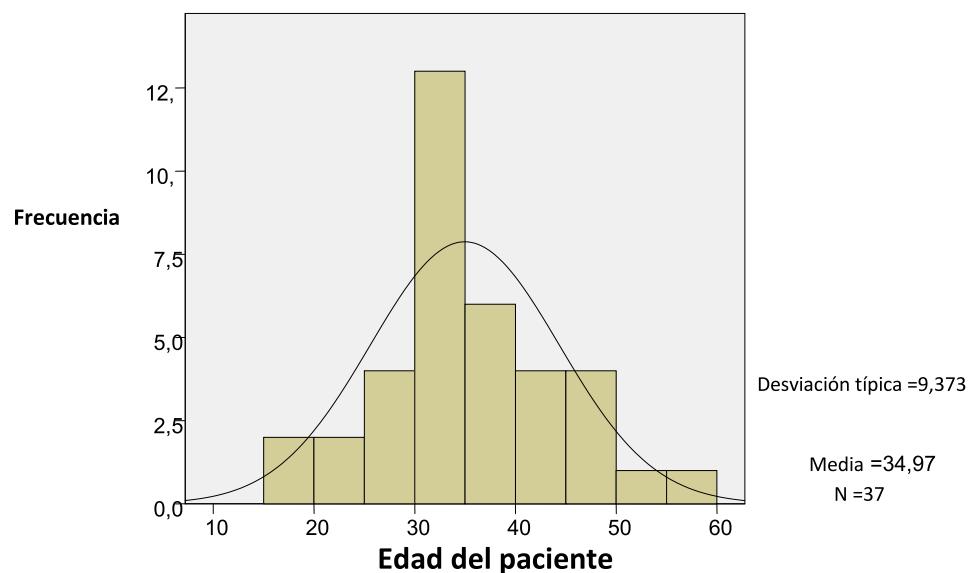


Figura 30. Distribución de la edad de los pacientes a estudio.

Todos los pacientes presentaron síntomas de rino-conjuntivitis. Rinitis moderada-severa intermitente en 5 casos (14%) y moderada-severa persistente en 32 (86%). Solo 5 individuos (14%) asociaron asma leve persistente de buen control.

Solo uno presentó además alergia a alimentos, concretamente a las frutas.

Los datos demográficos se expresan resumidos en la tabla 10.

Paciente No.	Edad (años)	Sexo	Clasificación rinitis	Asma	Evolución de la enfermedad (años)	AF atopia
1	30	M	MSPR	NO	10	si, madre
2	37	M	MSPR	SI	5	0
3	27	V	MSPR	NO	2	0
4	34	M	MSPR	NO	4	0
5	18	V	MSIR	SI	3	si, padre
6	38	M	MSPR	NO	3	si, madre
7	42	M	MSPR	SI	20	0
8	25	M	MSPR	NO	2	0
9	60	M	MSIR	NO	4	0
10	30	V	MSIR	NO	4	si, padre
11	30	M	MSIR	NO	4	0
12	46	M	MSPR	SI	2	0
13	30	M	MSPR	NO	2	si, hermana
14	38	M	MSIR	NO	4	0
15	43	M	MSPR	NO	20	si, hermana
16	30	M	MSPR	NO	15	no
17	34	M	MSPR	NO	6	si, abuela
18	49	M	MSPR	NO	5	0
19	41	V	MSPR	NO	15	0
20	46	M	MSPR	NO	13	si
21	33	V	MSPR	NO	2	si, hermana
22	22	V	MSPR	NO	3	si, madre
23	27	M	MSPR	NO	2	0
24	36	V	MSPR	NO	8	0
25	54	V	MSPR	SI	2	0
26	42	M	MSPR	NO	2	0
27	34	M	MSPR	NO	2	0
28	18	M	MSPR	NO	3	0
29	29	M	MSPR	NO	8	0
30	30	M	MSPR	NO	4	0
31	49	M	MSPR	NO	20	0
32	24	V	MSPR	NO	15	0
33	33	M	MSPR	NO	2	0
34	31	M	MSPR	NO	4	0
35	37	M	MSPR	NO	2	0
36	32	V	MSPR	NO	2	0
37	35	M	MSPR	NO	2	0

Tabla 10. **Datos demográficos** de los pacientes del estudio. MSIR= rinitis intermitente moderada-severa; MSPR= rinitis persistente moderada-severa.

4.1.2. Recogida de datos clínicos

4.1.2.1. Registro de síntomas y polen en el año 2007

Durante el periodo a estudio se recogieron síntomas 6 meses consecutivos, a diario, del 1 de mayo al 31 de octubre del 2007 y los datos obtenidos se reflejan en las siguientes tablas (tabla 11, 12 y 13).

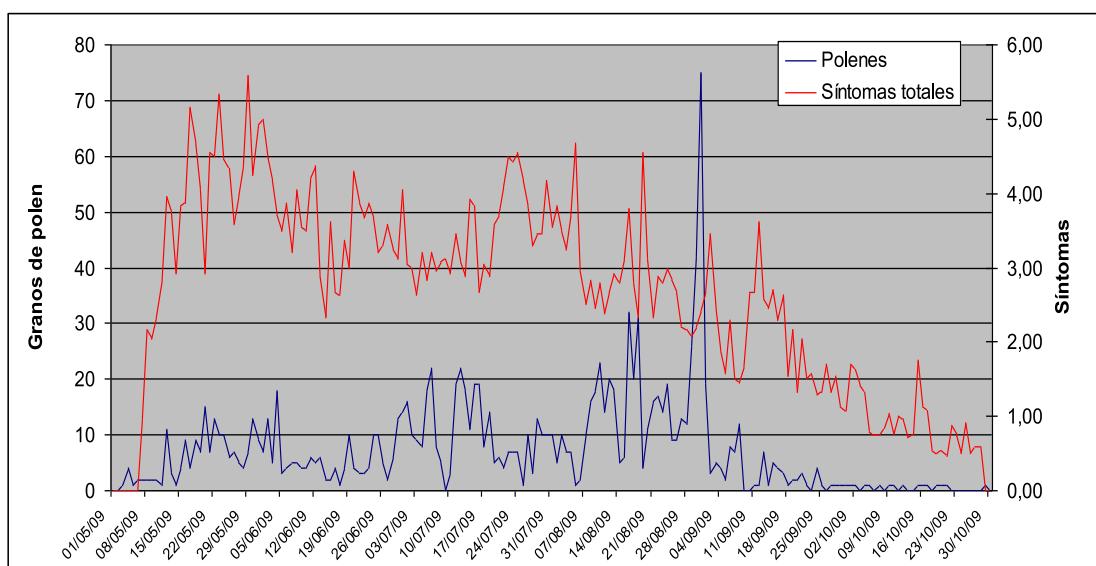


Tabla 11. Correlación entre síntomas TOTALES (rojo) y polen de *Chenopodiaceae* (azul) en 2007.

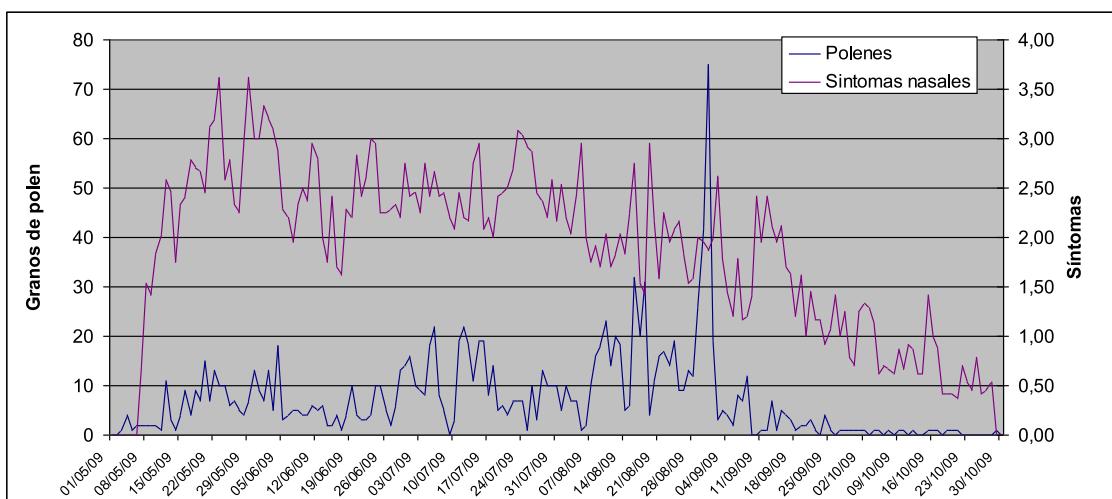


Tabla 12. Correlación entre síntomas nasales (violeta) y polen de *Chenopodiaceae* (azul) en 2007.

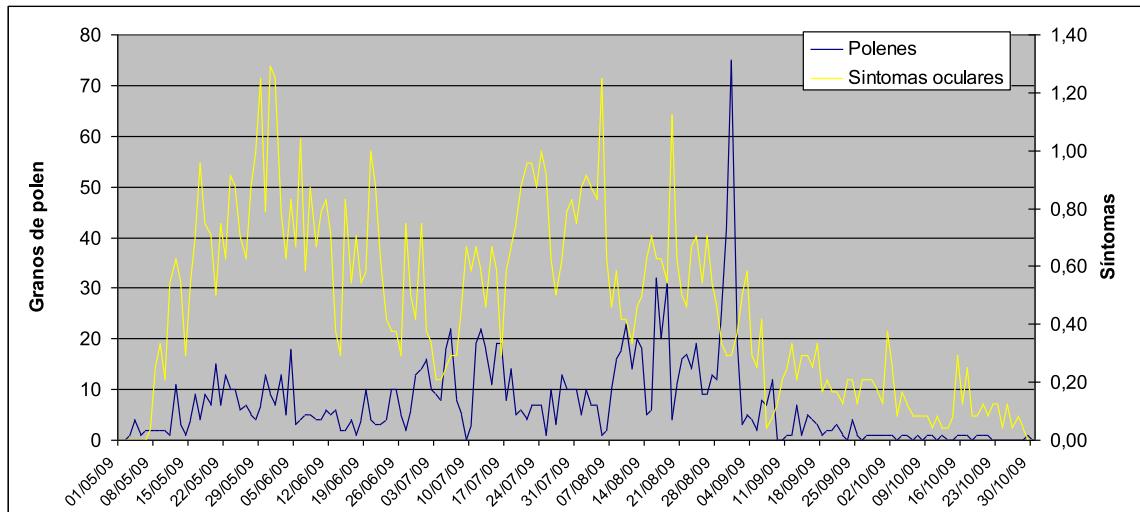


Tabla 13. Correlación entre **síntomas oculares** (amarillo) y polen de *Chenopodiaceae* (azul) en 2007.

Se realizó un análisis de regresión lineal multivariante para correlacionar síntomas y polen y se observó correlación con los síntomas totales y nasales, obteniendo el valor de $p <0.001$ y también con los oculares ($p<0.006$). Sin embargo no se obtuvo correlación para los síntomas bronquiales.

4.1.2.2. Escala analógica visual

La evaluación subjetiva de la evolución de la enfermedad se realizó a través de una escala analógica visual durante el año 2007 y los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 14.

Se observó un empeoramiento subjetivo de la clínica en temporada polínica (que se corresponde a las 3 primeras determinaciones de media 7,23; 6,75 y 6,83), bien correlacionado con el aumento de la concentración de polen, sobre todo en la determinación número 3 que corresponde con el mes de julio/agosto y el pico polínico (figura 31). Durante el mes de octubre que prácticamente desaparece el polen atmosférico, se recupera hasta la normalidad la percepción clínica de los pacientes, obteniendo una puntuación media de 9,27.

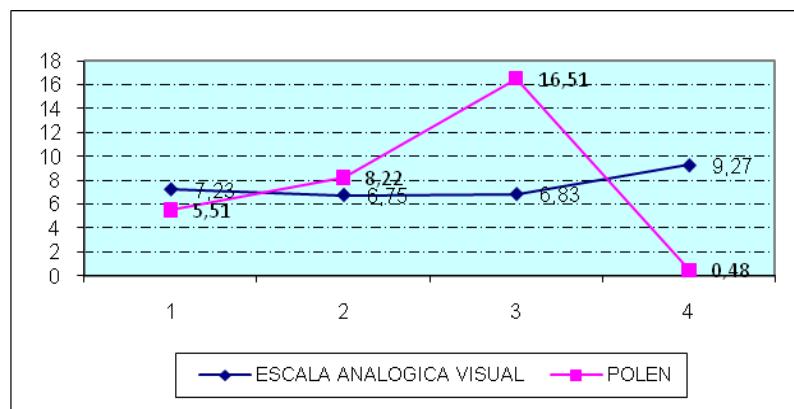


Figura 31. Diagrama lineal donde observamos la media de concentración de polen en cada periodo estudiado (rosa) y la media de la valoración subjetiva de síntomas a través de la escala analógica visual, valorada de 0 a 10, siendo 0 muy mal y 10 muy bien (azul). **Determinación 1:** mayo. **Determinación 2:** junio. **Determinación 3:** julio/agosto. **Determinación 4:** octubre.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Mayo	24	2,3	10	7,23	2,509
Junio	24	1	9,8	6,75	2,704
Julio-Agosto	24	0,5	9,8	6,68	2,464
Octubre	24	7	10	9,27	0,841

Tabla 14. Descripción de valores estadísticos de la EVA (Escala Analógica Visual) en cada una de las temporadas polínicas estudiadas a lo largo del año 2007.

4.1.2.3. Cuestionarios de calidad de vida para rinitis

Los resultados del cuestionario de calidad de vida, se evaluaron de forma específica, a través del cuestionario *ESPRIN*⁵⁸ específico para rinitis. Se observó que esta significativamente más afectado dentro de la estación polínica (julio) que fuera de ella (octubre), tanto en la evaluación global, como en cada uno de los dominios estudiados del cuestionario (figura 32), aplicando el test no paramétrico para variables dependientes de Wilcoxon (tabla 15 y 16).

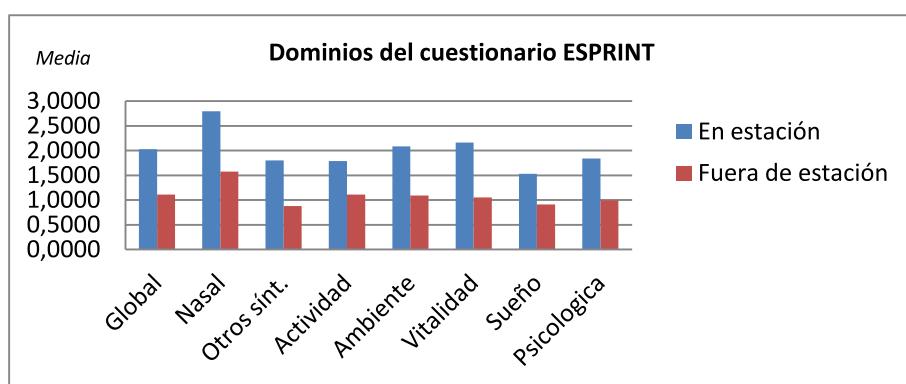


Figura 32. Comparación de los 8 dominios estudiados en el cuestionario SPRINT, dentro de la estación polínica y fuera de ella.

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						75	25	50 (Mediana)
EspGlov1	37	2,0290	,99847	,61	4,36	1,4107	1,6429	2,6250
EspSintNasv1	37	2,7973	1,14388	1,00	5,00	2,0000	2,7500	3,7500
EspOtrosintv1	37	1,8000	1,18040	,00	5,40	1,0000	1,6000	2,4000
EspActiviv1	37	1,7905	1,46192	,00	5,00	,5000	1,2500	3,0000
EspAmbientv1	37	2,13514	1,336707	,000	4,667	1,16667	2,00000	3,16667
EspVitalv1	37	2,16216	1,617080	,000	5,333	,66667	2,00000	3,33333
EspSueñov1	37	1,52703	1,277182	,000	4,250	,50000	1,25000	2,37500
EspPsicolv1	37	1,83784	1,199271	,000	4,500	1,00000	1,50000	2,75000
EspGlobalv2	37	1,11004	1,038187	,000	5,286	,50000	,71429	1,33929
EspSintnasv2	37	1,57432	,996286	,000	5,000	1,00000	1,50000	2,12500
EspOtroSintv2	37	,88108	,981450	,000	4,000	,20000	,40000	1,30000
EspActiviv2	37	1,10811	1,306422	,000	6,000	,25000	,75000	1,87500
EspAmbinetv2	37	1,09009	1,246349	,000	5,000	,33333	,66667	1,66667
EspVitalv2	37	1,05405	1,296990	,000	6,000	,33333	,66667	1,33333
EspSueñov2	37	,91216	1,300663	,000	6,000	,25000	,50000	1,00000
EspPsicolv2	37	,99324	1,051597	,000	5,500	,37500	,75000	1,25000

Tabla 15. Estadística descriptiva de los resultados del cuestionario SPRINT, desglosado en los 7 dominios evaluados (Síntomas nasales; Otros síntomas; Actividades de la vida diaria; Aspectos ambientales; Vitalidad; Sueño; Afectación Psicológica) y en global durante la estación polínica en julio (1) y fuera de la temporada polínica en octubre (2).

	EspGlobalv2 - EspGlov1	EspSintnasv2 - EspSintNasv1	EspOtroSin tv2 - EspOtrosintv1	EspActiviv2 - EspActiviv1	EspAmbinetv2 - EspAmbientv1	EspVitalv2 - EspVitalv1	EspSueñov2 - EspSueñov1	EspPsicolv2 - EspPsicolv1
Z Sig. asintót. (bilateral)	-4,338(a) ,000	-4,858(a) ,000	-3,965(a) ,000	-3,430(a) ,001	-4,458(a) ,000	-3,959(a) ,000	-3,198(a) ,001	-4,227(a) ,000

Tabla 16. Estadística descriptiva (a) Basado en los rangos positivos y (b) Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

4.1.3. Exploraciones complementarias

4.1.3.1. Espirometría forzada

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores espirométricos de los pacientes en el seguimiento en el 2007. El FEV1 se mantuvo constante alrededor del 100% y el cociente FEV1/FVC por encima de 80% (figura 33).

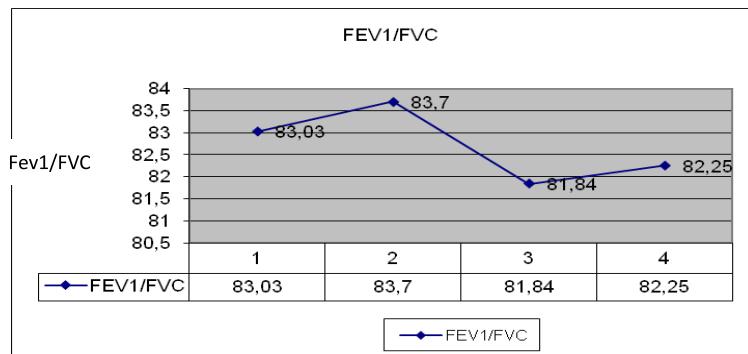


Figura 33. Valores de la media del cociente FEV1/FVC de todos los pacientes en las 4 determinaciones realizadas. **Determinación 1:** mayo. **Determinación 2:** junio. **Determinación 3:** julio/agosto. **Determinación 4:** octubre.

4.1.3.2. Medición de óxido nítrico exhalado

Se observó una correlación positiva entre FeNo y concentración de polen en las 4 determinaciones realizadas a lo largo del año 2007 ($r=0,92$); obteniéndose el pico más alto de concentración de polen en julio/agosto coincidiendo el valor más alto de FeNo detectado en los pacientes (figura 34).

Los valores se expresaron en partes por billón (ppb).

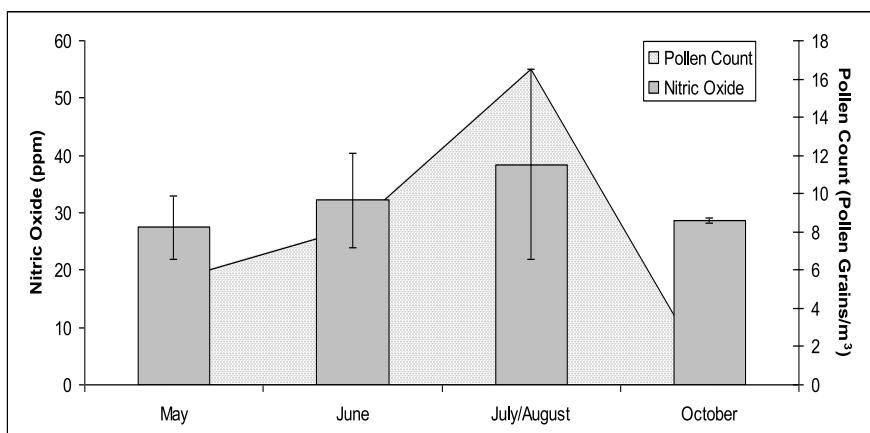


Figura 34. Concentración de polen de *Chenopodiaceae/amaranthaceae* expresado en granos/m³ (media de polen de cada periodo) y valores del FeNo (ppb) obtenido en las 4 determinaciones de todos los pacientes. El coeficiente de correlación entre polen y medición de óxido nítrico fue de 0,92.

4.2. PRUEBA CUTÁNEA

4.2.1. *Resultados de las pruebas cutáneas*

Se calculó para cada especie el diámetro máximo, mínimo, la media y el intervalo de confianza para poder realizar el estudio estadístico (tabla 17 y 18).

Se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis y análisis de ANOVA con los resultados de las pápulas (figura 35-B).

La prueba cutánea fue positiva para todas las especies, en todos los pacientes a estudio.

Prueba cutánea

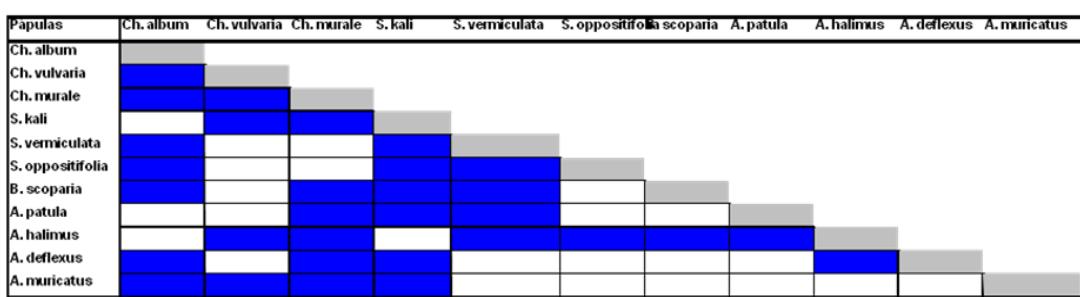
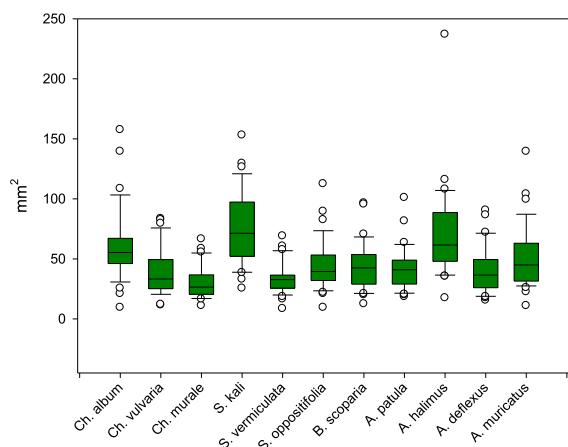


Figura 35 (A y B). A- Diagrama de box-plot para las pruebas cutáneas con las 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*. B- Análisis estadístico de las diferencias entre las especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* estudiadas. Las diferencias significativas ($p<0,05$) están marcadas con de color azul.

Se realizó un análisis estadístico de las pápulas comparando el tamaño máximo, mínimo y la media de las pápulas para cada especie de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* que se estudió y se obtuvo como resultados que; *S. kali* ($76,3 \pm 30,2 \text{ mm}^2$), *A. halimus* ($71,1 \pm 38,1 \text{ mm}^2$) y *C. album* ($60,3 \pm 29,6 \text{ mm}^2$) obtuvieron el diámetro mayor de pápula; mientras que *S. vermiculata* ($33,6 \pm 12,8 \text{ mm}^2$) y *C. murale* ($30,4 \pm 13,7 \text{ mm}^2$) presentaron los valores más bajos (figura 35-A).

ESPECIE	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIA	IC
<i>C. album</i>	157,5	9,5	55,25	46,75 – 66,75
<i>C. vulvaria</i>	83,5	11,5	33,25	25,5 - 46,5
<i>C. murale</i>	66,5	11	26,5	21 - 36,125
<i>S. kali</i>	153	25,5	71,25	52,25 - 97,25
<i>S. vermiculata</i>	69	8,5	32,75	25,75 - 36,5
<i>S. oppositifolia</i>	112,5	9,5	39,5	32 – 53
<i>B. scoparia</i>	96,5	12,5	42,5	29 - 53,5
<i>A. patula</i>	101	18,5	41	29 – 49
<i>A. halimus</i>	237	17,5	61,5	48 – 88
<i>A. deflexus</i>	90,5	15,5	36,5	26 - 49,125
<i>A. muricatus</i>	139,5	11	45	31,5 - 62,25

Tabla 17. Comparación del tamaño máximo, mínimo y la media de las pápulas para cada especie de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* estudiada.

ESPECIE	MEDIANA	PERCENTIL 25%	PERCENTIL 75%
<i>C. album</i>	55,25	46,75	66,75
<i>C. vulvaria</i>	33,25	25,5	46,5
<i>C. murale</i>	26,5	21	36,125
<i>S. kali</i>	71,25	52,25	97,25
<i>S. vermiculata</i>	32,75	25,75	36,5
<i>S. oppositifolia</i>	39,5	32	53
<i>B. scoparia</i>	42,5	29	53,5
<i>A. patula</i>	41	29	49
<i>A. halimus</i>	61,5	48	88
<i>A. deflexus</i>	36,5	26	49,125
<i>A. muricatus</i>	45	31,5	62,25

Tabla 18. Determinación de la mediana, percentil 25% y 75% con el análisis de varianza de Kruskal-Wall para un test de normalidad (*Failed P < 0,050*).

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

4.3.1. Determinación del contenido proteico

Los resultados de la determinación proteica obtenida para los extractos de *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *B. scoparia*, *A. patula*, *A. halimus*, *A. deflexus* y *A. muricatus* aparece reflejado en la tabla 19. Los resultados obtenidos se expresaron en µg de proteína por mg de liofilizado.

Todos los extractos del estudio contenían al menos el 75% de µg de proteína por mg de liofilizado.

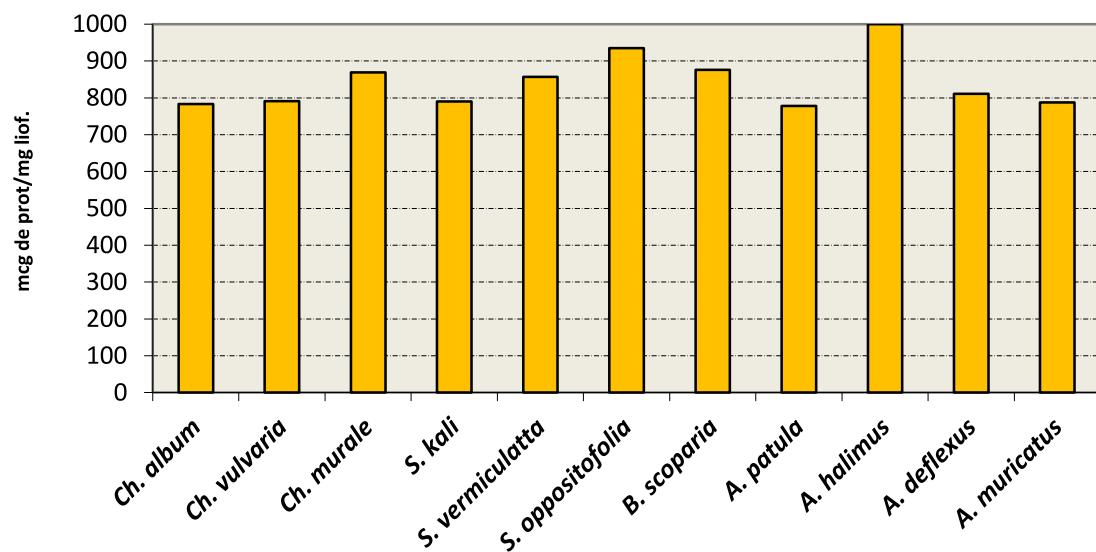
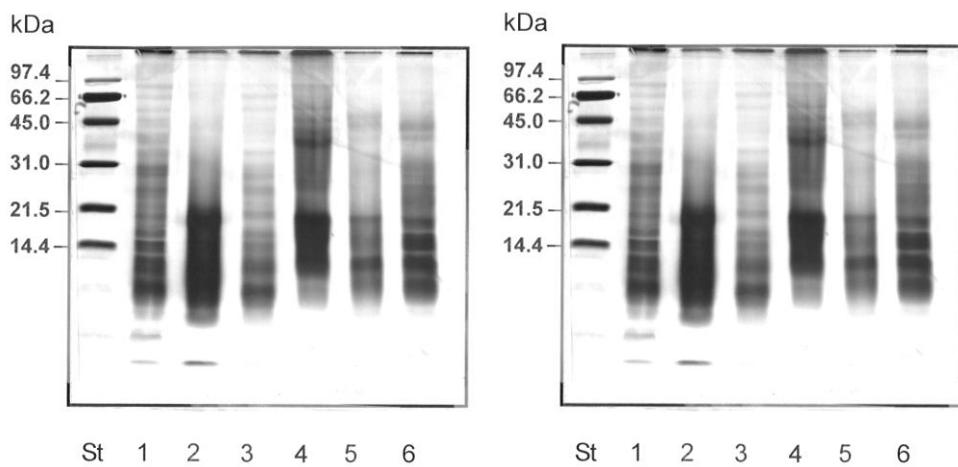


Tabla 19. Contenido proteico de los diferentes extractos expresados en µg de proteína por mg de liofilizado. En todos ellos se determinó más de 75 µg de contenido proteico por mg de liofilizado.

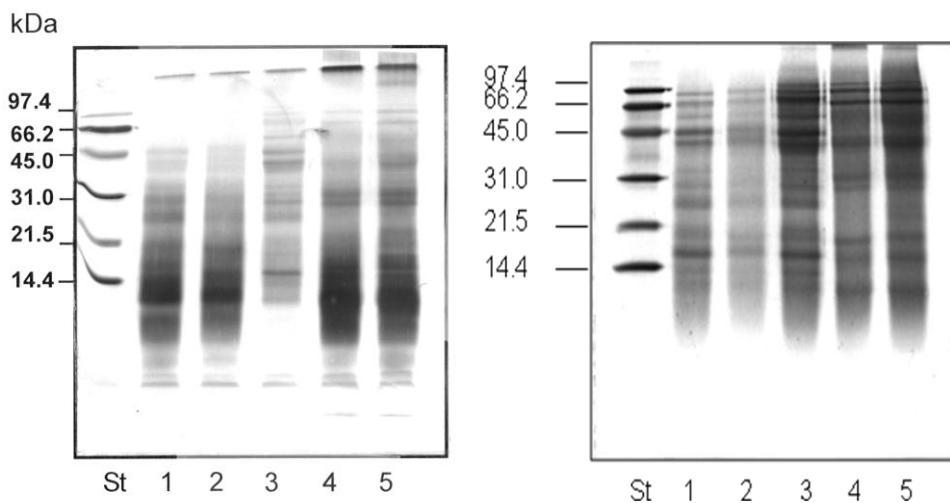
4.3.2. Caracterización antigénica de los extractos

4.3.2.1. SDS-PAGE

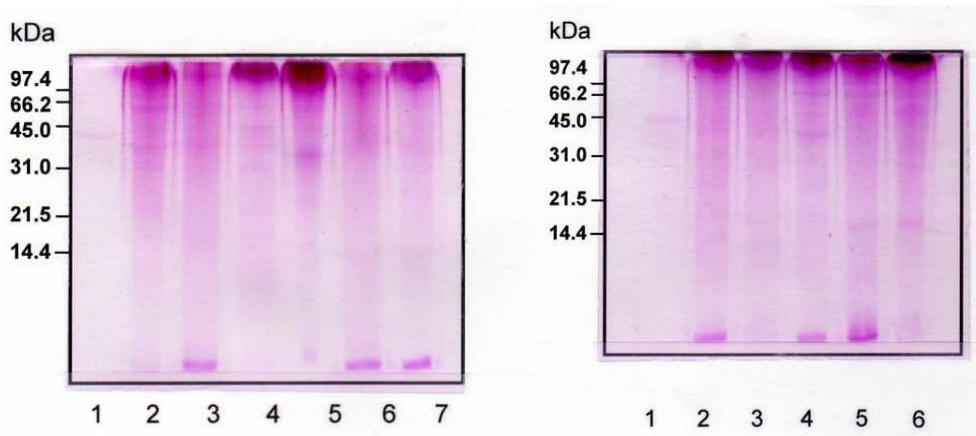
Se realizaron 3 geles de SDS-PAGE que fueron teñidos con azul de Coomassie, plata y glicoproteínas (figuras 36-41). Se puede observar las bandas proteicas de los 11 extractos separados por su peso molecular.



Figuras 36 y 37. **Tinción con plata y Comassie** respectivamente. **St:** Peso molecular estándar. **Línea 1.** *C. album*; **Línea 2.** *C. vulvaria*; **Línea 3.** *C. murale*; **Línea 4.** *S. kali*; **Línea 5.** *S. vermiculata*; **Línea 6.** *S. oppositifolia*.



Figuras 38 y 39. Tinción con plata y Comassie respectivamente. St: Peso molecular estándar. Línea 1. *B. scoparia*; Línea 2. *A. patula*; Línea 3. *A. halimus*; Línea 4. *A. deflexus*; Línea 5. *A. muricatus*.



Figuras 40. Tinción con glicoproteínas. Carril 1 (St): Peso molecular estándar. Línea 2. *C. album*; Línea 3. *C. vulvaria*; Línea 4. *C. murale*; Línea 5. *S. kali*; Línea 6. *S. vermiculata*; Línea 7. *S. oppositifolia*.

Figura 41. Tinción con glicoproteínas. Carril 1 (St): Peso molecular estándar. Línea 2. *B. scoparia*; Línea 3. *A. patula*; Línea 4. *A. halimus*; Línea 5. *A. deflexus*; Línea 6. *A. muricatus*.

Se observaron bandas proteicas con un rango de peso molecular (MW) desde 8 a 95 KDa. La banda más intensa para todas las especies se observó en los 43 KDa aproximadamente, que corresponde con el grupo de Sal k1. Otras bandas a destacar fueron las identificadas a 18, 29, 65 y 80 KDa en muchas especies.

El perfil proteico revelado muestra patrones diferentes en cada una de las especies estudiadas. Todas ellas reconocen proteínas similares de alto peso molecular en bandas entorno a 43, 60 y 66 KDa aproximadamente. Sin embargo también se observan bandas de bajo peso MW que varían significativamente dependiendo de las especies.

4.3.2.2. Isoelectroenfoque

Se realizó isoelectroenfoque bidimensional para cada una de las especies a estudio, obteniéndose los siguientes resultados.

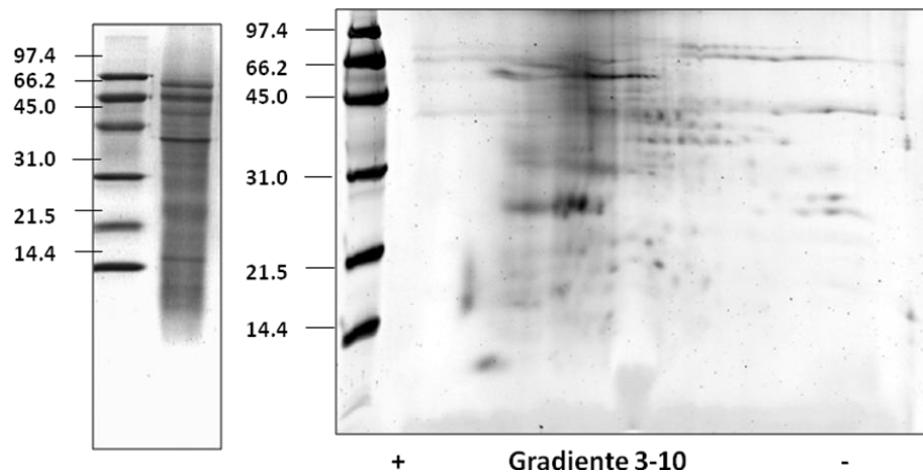


Figura 42. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *C. album*.

Figura 43. Isoelectroenfoque bidimensional para *C. album*.

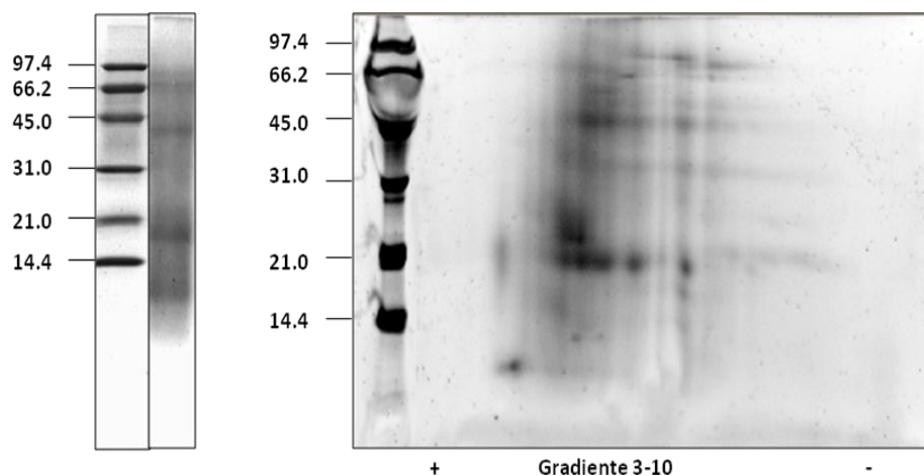


Figura 44. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *C. vulvaria*.

Figura 45. Isoelectroenfoque bidimensional para *C. vulvaria*.

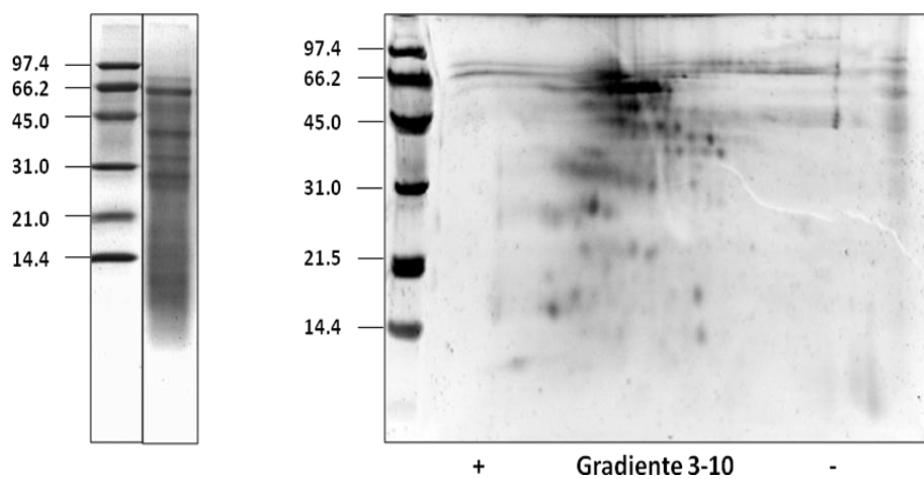


Figura 46. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *C. murale*.

Figura 47. Isoelectroenfoque bidimensional para *C. murale*.

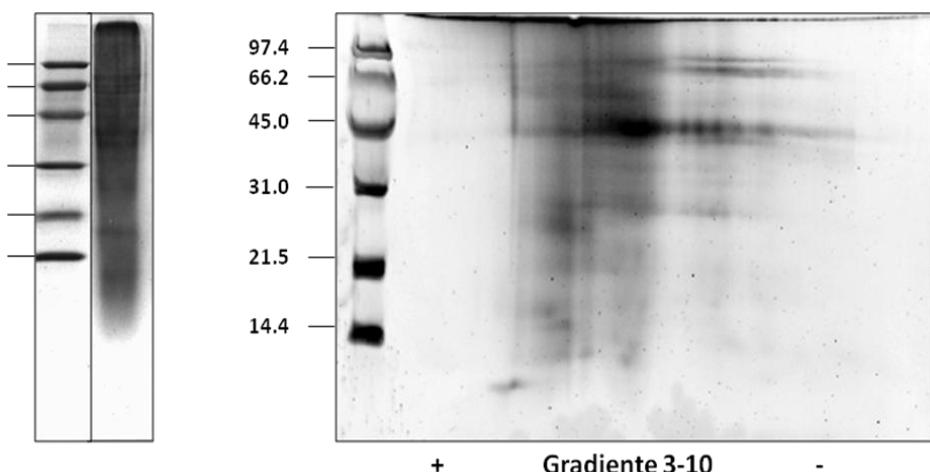


Figura 48. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *S. kali*.

Figura 49. Isoelectroenfoque bidimensional para *S. kali*.

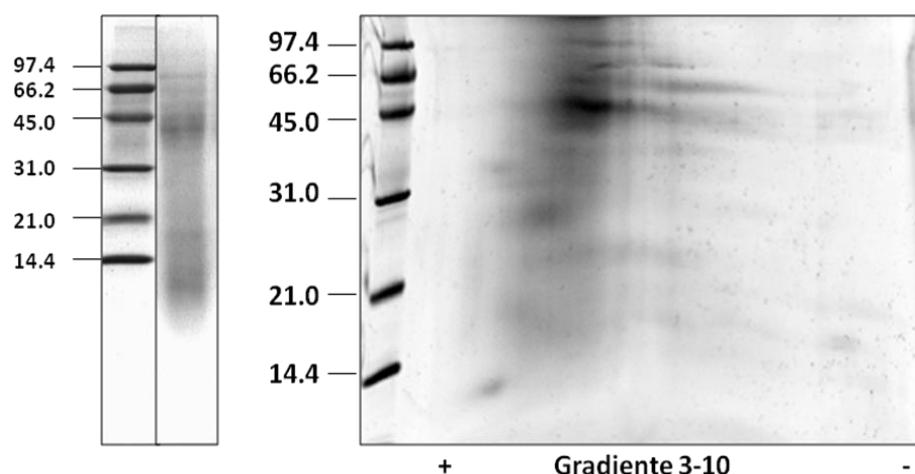


Figura 50. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y el segundo carril *S. vermiculata*.

Figura 51. Isoelectroenfoque bidimensional para *S. vermiculata*.

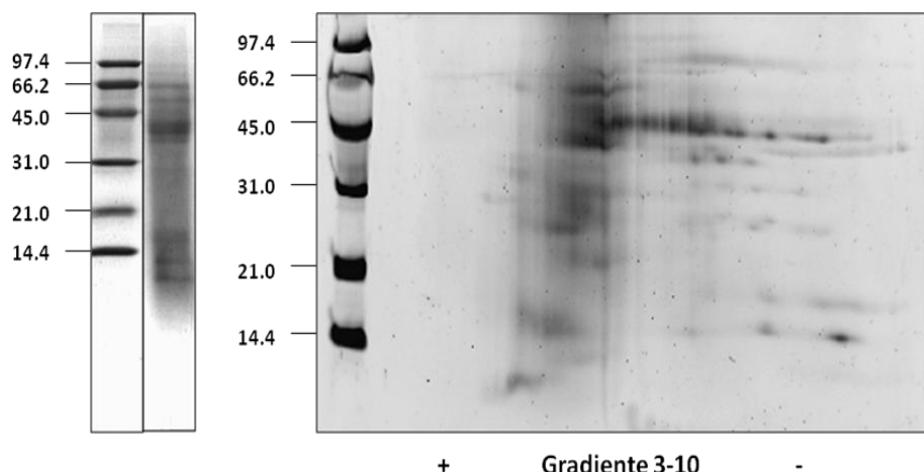


Figura 52. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en segundo carril *S. oppositifolia*.

Figura 53. Isoelectroenfoque bidimensional para *S. oppositifolia*.

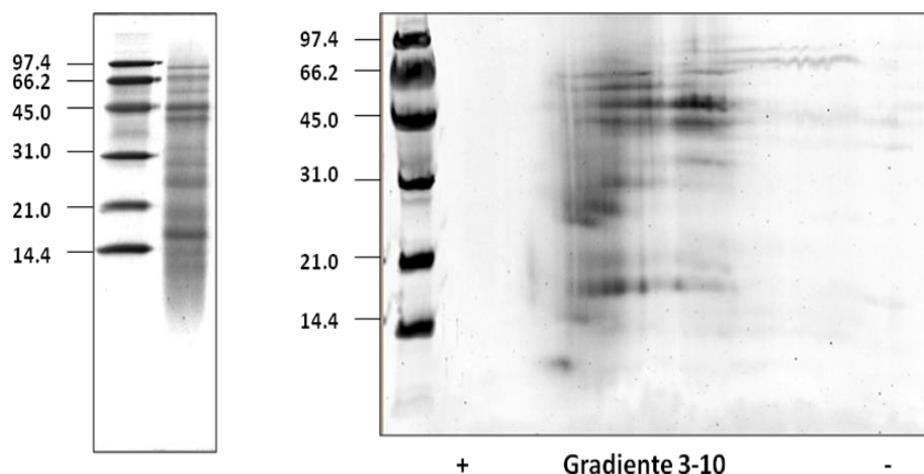


Figura 54. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *B. scoparia*.

Figura 55. Isoelectroenfoque bidimensional para *B. scoparia*.

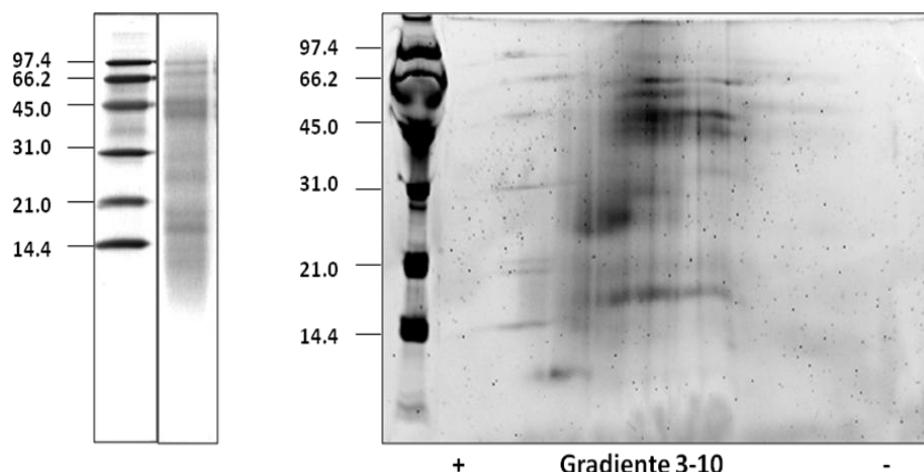


Figura 56. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *A. patula*.

Figura 57. Isoelectroenfoque bidimensional para *A. patula*.

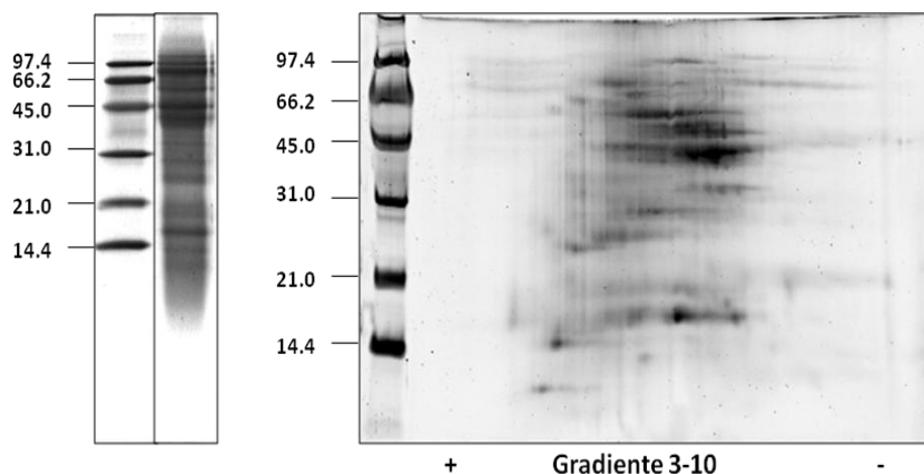


Figura 58. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *A. halimus*.

Figura 59. Isoelectroenfoque bidimensional para *A. halimus*.

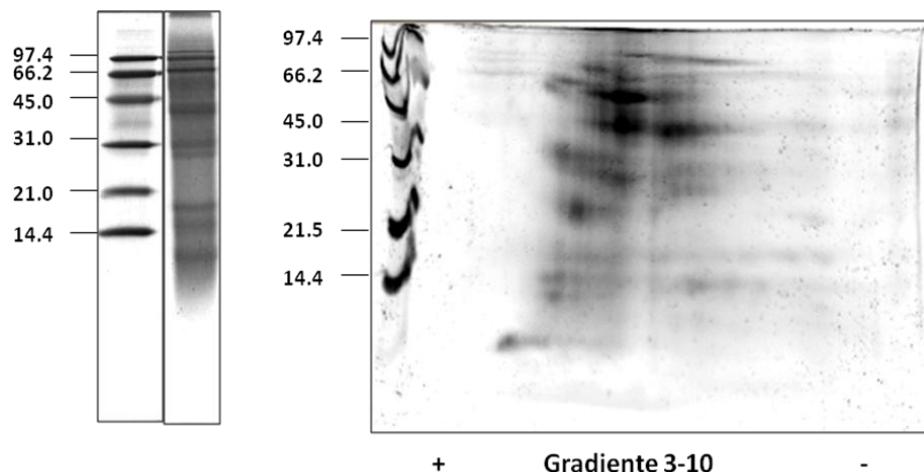


Figura 60. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *A. deflexus*.

Figura 61. Isoelectroenfoque bidimensional para *A. deflexus*.

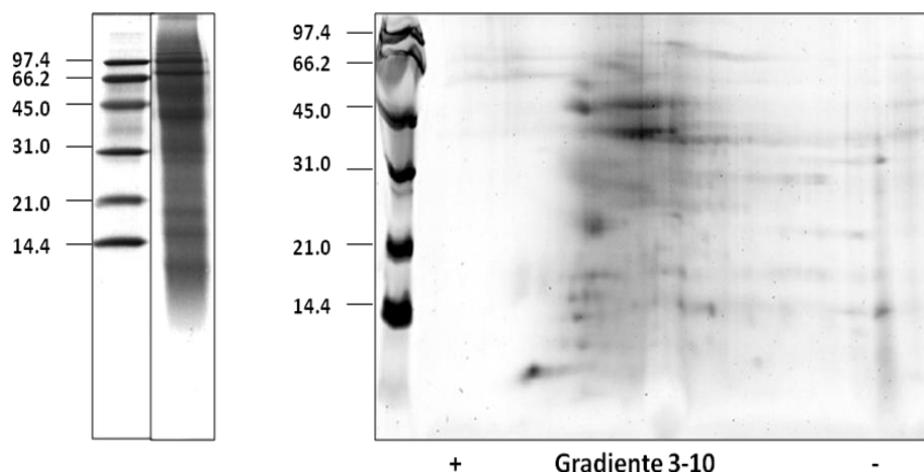


Figura 62. SDS-PAGE, en el primer carril el peso molecular estándar y en el segundo carril *A. muricatus*.

Figura 63. Isoelectroenfoque bidimensional para *A. muricatus*.

De las especies estudiadas, *C. vulvaria* es de los tres *Chenopodium* el que representa un perfil de bandas proteico con mayores diferencias, marcando proteínas de bajo peso molecular de alrededor de 21,5 KDa e inferiores, mientras que las otras dos especies de *chenopodium* reconocen proteínas de MW más elevado.

Respecto a la *Salsola*; la *S. vermiculatta* y la *S. oppositifolia* muestran también un perfil proteico de bajo peso molecular, observación ya descrita en otros trabajos donde se comparaba el perfil proteico y alergénico de varias *salsolas* y se observó mayor reactividad cruzada entre *S. oppositifolia* y *C. album* que entre *S. oppositifolia* y *S. kali*⁴⁶. *S. kali* reconoce bandas proteicas con MW más altos de entorno a los 43KDa.

Bassia y *Atriplex*, así como las dos *Amaranthaceae* estudiadas reconocen como el resto de las especies, proteínas entorno a 43 kDa, pero todas ellas marcan también las de más bajo peso molecular.

4.4. PERFIL ALERGÉNICO

4.4.1. Inmunoblotting IgE

El perfil alergénico que se reveló mostró patrones de reconocimiento diferentes en el pool de los pacientes estudiados (figura 64). En todas las especies se reconocieron proteínas de elevado peso molecular entorno a 43, 60 y 66 kDa aproximadamente. Sin embargo destaca en algunas especies como *C. vulvaria*, *C. murale*, *B. scoparia*, *S. oppositifolia*, *A. deflexus* y *A. muricatus* proteínas de más bajo peso molecular, mostrando un perfil proteico diferente específico para cada una de las especies. Así se observó una banda de alrededor de 20 KDa sólo en *C. murale* y *S. oppositifolia*; de 18 KDa en *C. vulvaria* y *S. kali* y de 16 KDa solo para *B. scoparia* y los *amaranthus* estudiados.

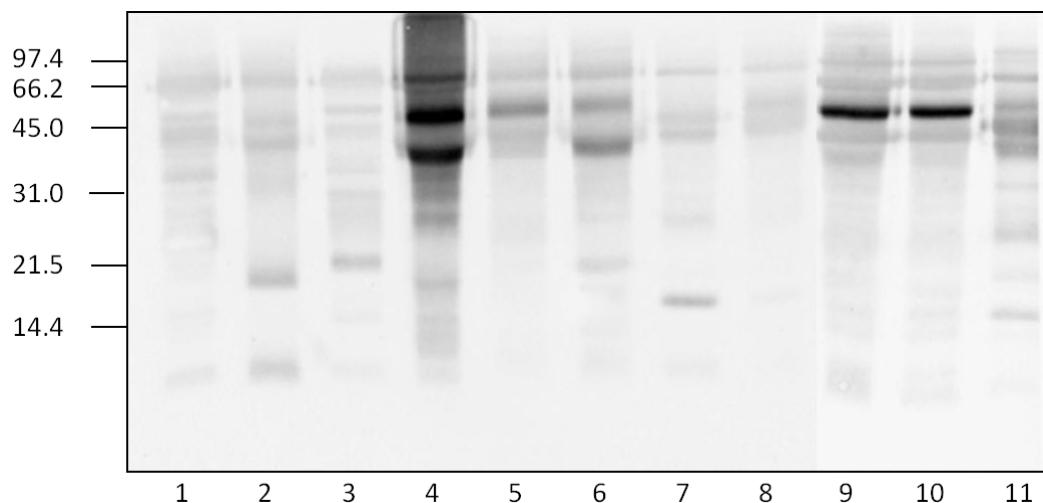


Figura 64. **Perfil alergénico (Inmunoblot) de las 11 especies.** Línea 1. *C. album*; Línea 2. *C. vulvaria*; Línea 3. *C. murale*; Línea 4. *S. kali*; Línea 5. *S. vermiculata*; Línea 6. *S. oppositifolia*; Línea 7. *B. scoparia*; Línea 8. *A. patula*; Línea 9. *A. halimus*; Línea 10. *A. deflexus*; Línea 11. *A. muricatus*. Pool de sueros diluidos a 1%.

4.4.2. Procesamiento de las imágenes y medida de los alérgenos antigénicamente más relevantes

Se analizó cada una de geles de SDS-PAGE de las 11 *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* por el método descrito en el **apartado 3.7.2. de material y métodos**, obteniéndose las siguientes bandas.

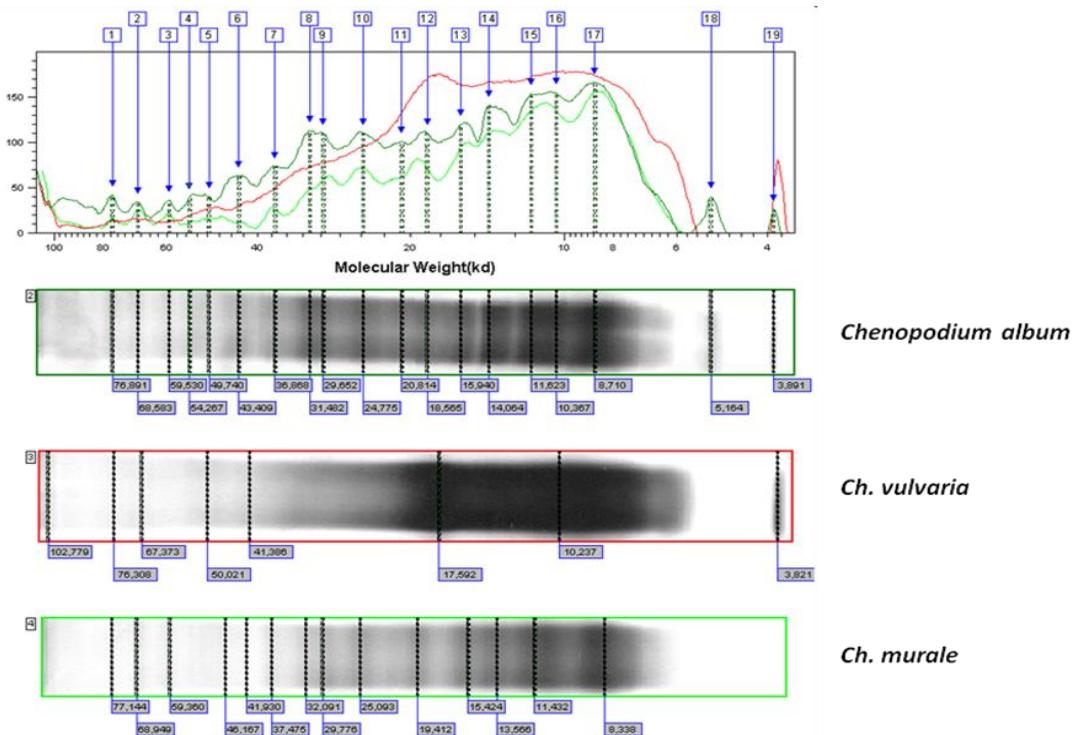


Figura 65. Estudio de las bandas proteicas de *C. album*, *C. vulvaria* y *C. murale*.

El patrón proteico de los 3 extractos de *Chenopodium* que se estudiaron (*C. album*, *C. murale* y *C. vulvaria*) fue heterogéneo, aunque se observaron características proteicas comunes. Los tres extractos reconocieron proteínas de alto MW (76, 67 y 43 KDa) y compartieron alguna de bajo MW, en torno a los 10 KDa y que probablemente se traten de homologas al Che a2 (profilina) y Che a3 (polcalcina) descritas en el extracto de *C. album* y que son panalérgenos con una prevalencia variable dependiendo del área

geográfica en la que nos encontramos. Se observó además como *C. vulvaria* es la que mostró un patrón más diferente comparándolas con los otros dos *Chenopodium*, destacando sobre todo por presentar con más intensidad proteínas de bajo MW, por debajo de 17 KDa. Tanto *C. album* como *C. murale* presentan un patrón más homogéneo entre ellas.

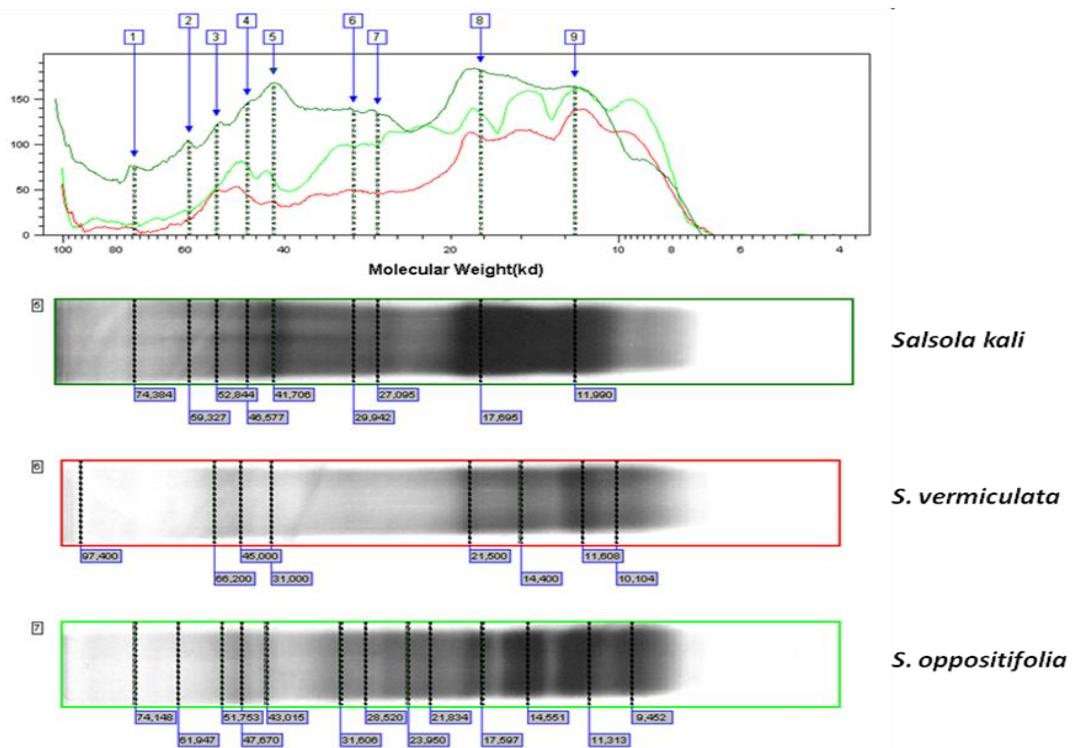


Figura 66. Estudio de las bandas proteicas de *S. kali*, *S. vermiculata* y *S. oppositifolia*.

Las tres especies de *Salsola* estudiadas reconocieron bandas de proteínas de alto peso MW de aproximadamente 60 y 43 KDa; y una de bajo MW de 11 KDa; que son también las que se identifican en el resto de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* que se han incluido en el estudio. Sin embargo, se observó que existen diferencias entre ellas y así, *S. vermiculatta* mostró un patrón diferente comparándola con las otras dos especies de *Salsola*, reconociendo bandas con mayor intensidad en los pesos moleculares más

bajos (21, 14 y 11 KDa), probablemente estas dos últimas homólogos del grupo de las profilina (Sal k4) y polcalcina, y que también compartió con *S. oppositifolia*; aunque en esta última se llegaron a detectar hasta 13 bandas, compartiendo con *S. kali* las de alrededor de 27 y 70 KDa que no tiene *S. vermiculatta*.

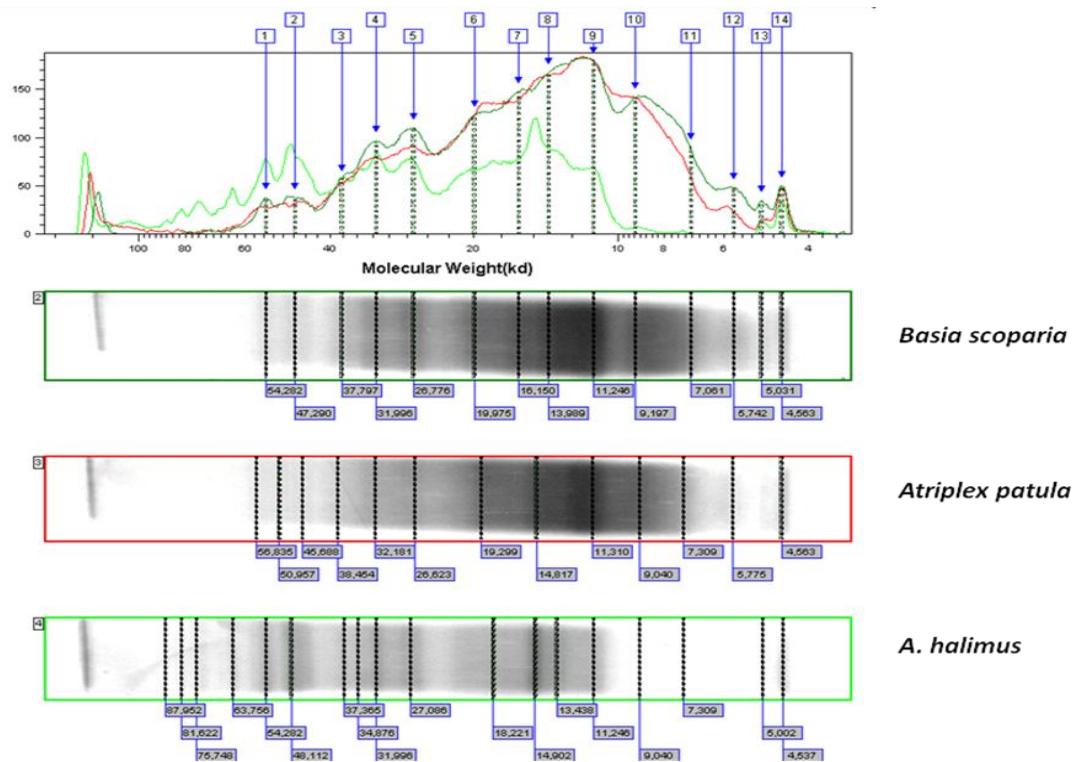


Figura 67. Estudio de las bandas proteicas *B. scoparia*, *A. patula* y *A. halimus*.

La *B. scoparia* y los dos *Atriplex* estudiados (*A. patula* y *A. halimus*) presentaron un perfil proteico similar; se llegaron a detectar desde 13-14 bandas en *A. patula* y *B. scoparia* respectivamente, hasta 18 bandas en *A. halimus*. En estas 3 especies se destacaron además 2 bandas con más intensidad, de alrededor de 14-11 KDa y otra de 20 KDa; que no comparten ni con *S. kali*, ni con *S. vermiculatta*; pero si con el resto de especies estudiadas. *A. halimus* desatacó también por presentar además proteínas de elevado peso molecular con bandas de hasta 87 KDa.

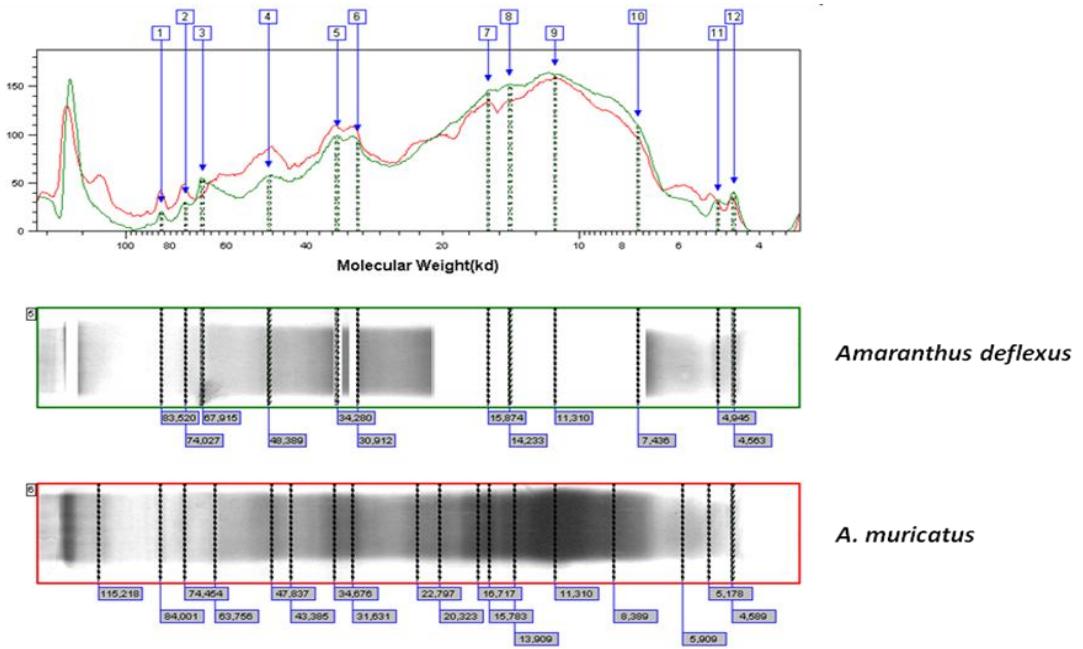


Figura 68. Estudio de las bandas proteicas *A. deflexus* y *A. muricatus*.

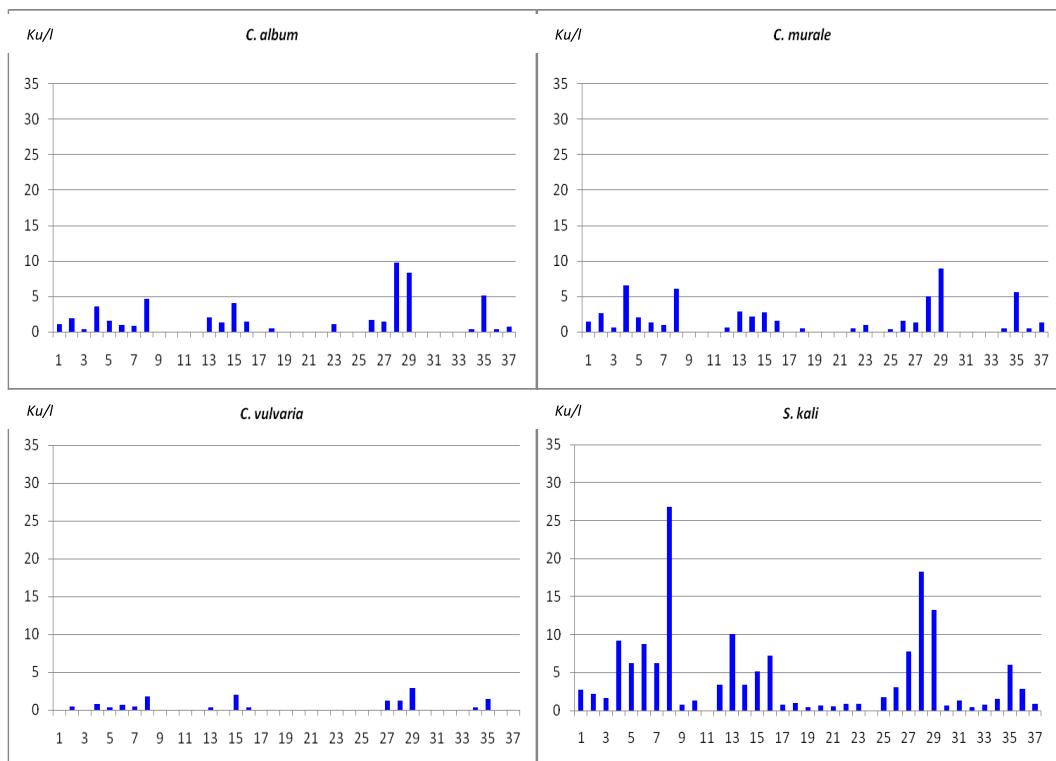
Las dos especies de *Amaranthaceae* que se estudiaron presentaron perfiles proteicos bien diferentes; mostró más bandas de proteínas *A. muricatus* y con perfil proteico más intenso en las de bajo peso molecular, comparándola con *A. deflexus*.

Con la separación de los componentes proteicos de cada una de las 11 especies a estudio, se observó que todas ellas presentan algún patrón de reconocimiento en común (bandas proteicas de 60, 45 y 11 KDa); con sus pequeñas diferencias entre unas y otras. Destacaron algunas especies como *C. vulvaria* y *S. vermiculatta* con patrones proteicos e intensidades bien diferentes. Se observó además que en algunas especies como *S. kali* y *A. halimus* destacan proteínas de alto peso molecular; mientras que en otras especies destacan sobre todo el reconocimiento de proteínas de bajo MW como es en los *Chenopodium*, *S. oppositifolia* y *S. vermiculatta* o *B. scoparia*.

4.5. DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA

4.5.1. Determinación de IgE específica a alérgenos con Biotina

Se realizó previo marcaje con Biotina y mediante ensayo manual con InmunoCAP streptavidina. Los resultados obtenidos para cada una de las 11 especies a estudio se representan en las siguientes tablas.



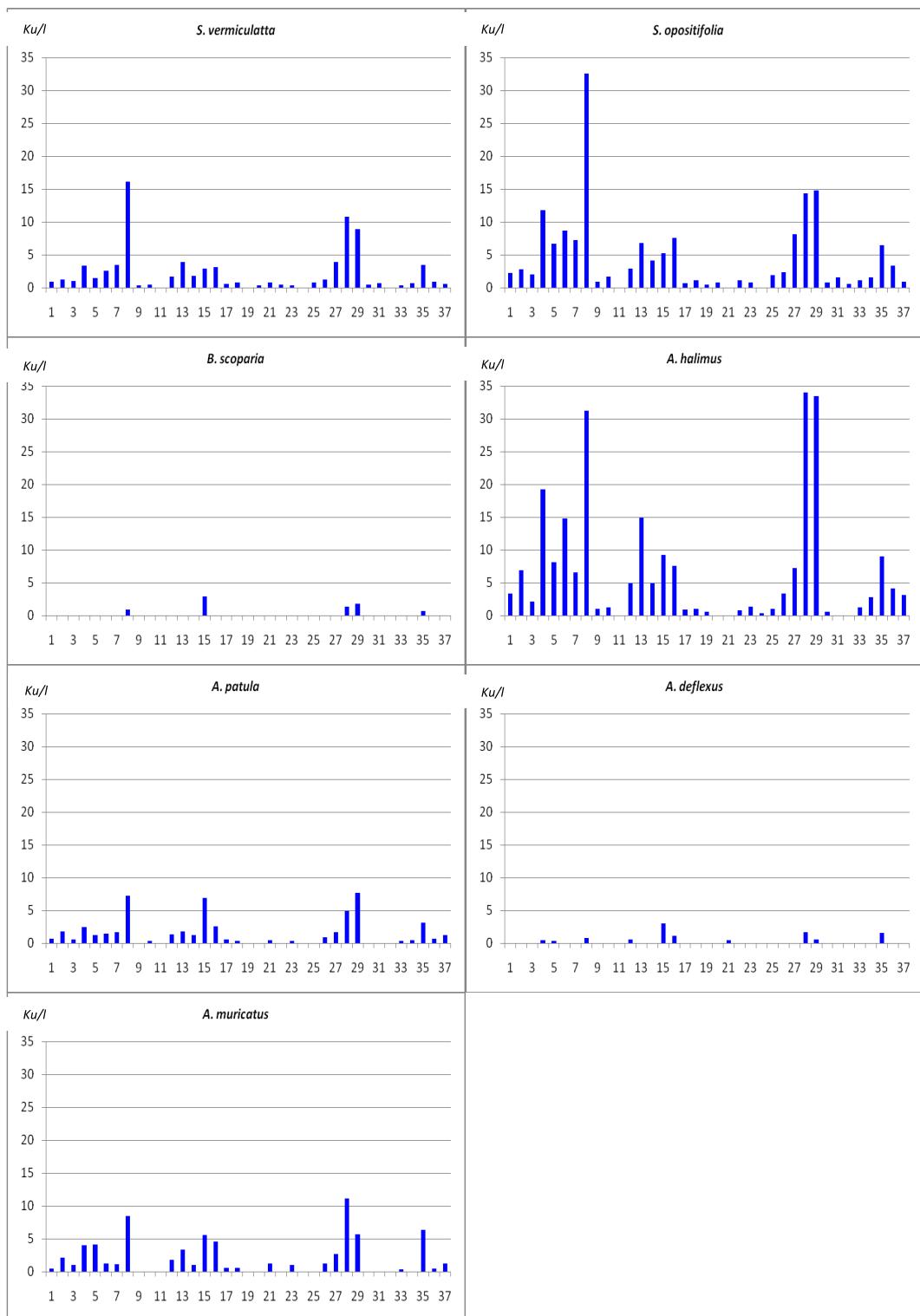


Tabla 20. Diagrama de barras en el que se muestra la determinación de IgE específica biotilinada para cada una de las especies estudiadas, expresadas en KU/L, en los 37 pacientes del estudio EPOSAL.

Como se observa en la tabla anterior el valor de la IgE específica frente a cada una de las especies no fueron superiores a 35 KU/L, en ninguno de los individuos a estudio.

S. Kali, *S. oppositifolia* y *A. halimus*, obtuvieron los valores frente a IgE específica más altos en la gran mayoría de los pacientes.

Tan solo hubo un paciente que no reconoció IgE frente a ninguna de las especies estudiadas. Los 36 restantes reconocieron IgE frente a la gran mayoría de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* seguidas (figura 69).

A penas se reconoció IgE frente a los extractos de *C. vulvaria*, *B. scoparia* y *A. deflexus* (figura 70-A).

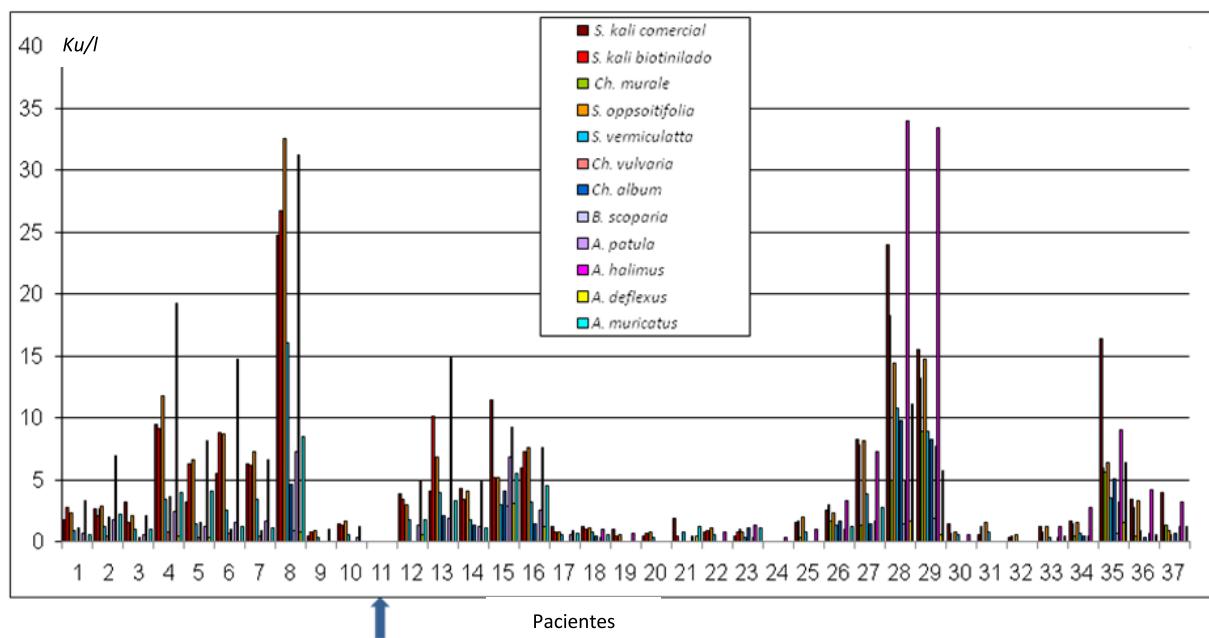


Figura 69. Determinación de IgE específica biotilinada frente a las 11 especies a estudio en cada uno de los 37 pacientes. Los valores de la IgE están expresados en ku/l. Los pacientes están nominados con un código numérico del 1 al 37.

IgE específica

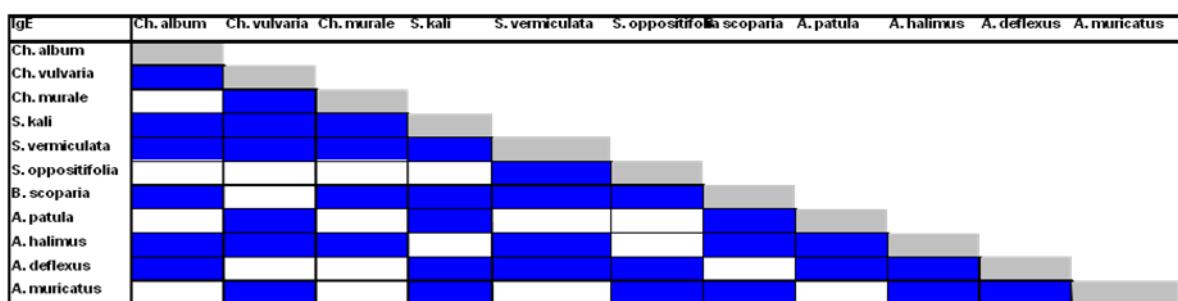
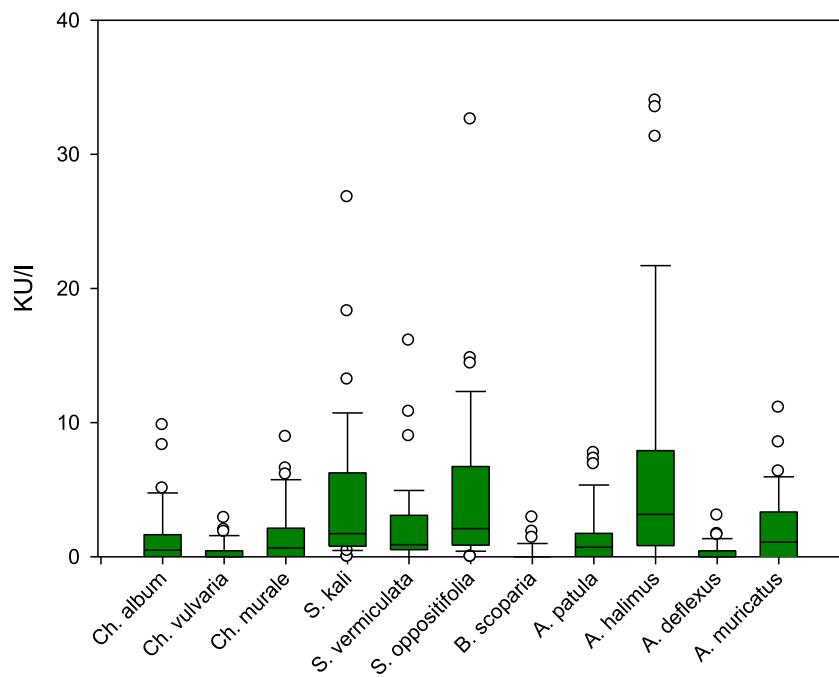


Figura 70 (A y B). A- Diagrama de boxplot donde se representan los valores de IgE específica frente a los 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* del estudio. B- Análisis estadístico de las diferencias entre las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* estudiadas. La diferencia estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están marcadas en azul.

Comparando la IgE específica por especies se observó; que las 3 especies de *Salsola*, obtuvieron valores de IgE muy similares en cada uno de los pacientes a estudio, siendo *S. vermiculatta* la que obtuvo los valores más bajos. Lo mismo sucedió con *C. album* y *C. murale* que mostraron valores equitativos, mientras que apenas se obtuvo IgE frente a *C. vulvaria*. *A. halimus* también presentó IgE elevada, comparándolo con *B. scoparia* que apenas reconoce IgE y con *A. patula*. De los dos *Amaranthus*, *A. muricatus* obtuvo los valores más elevados en IgE específica (figura 71).

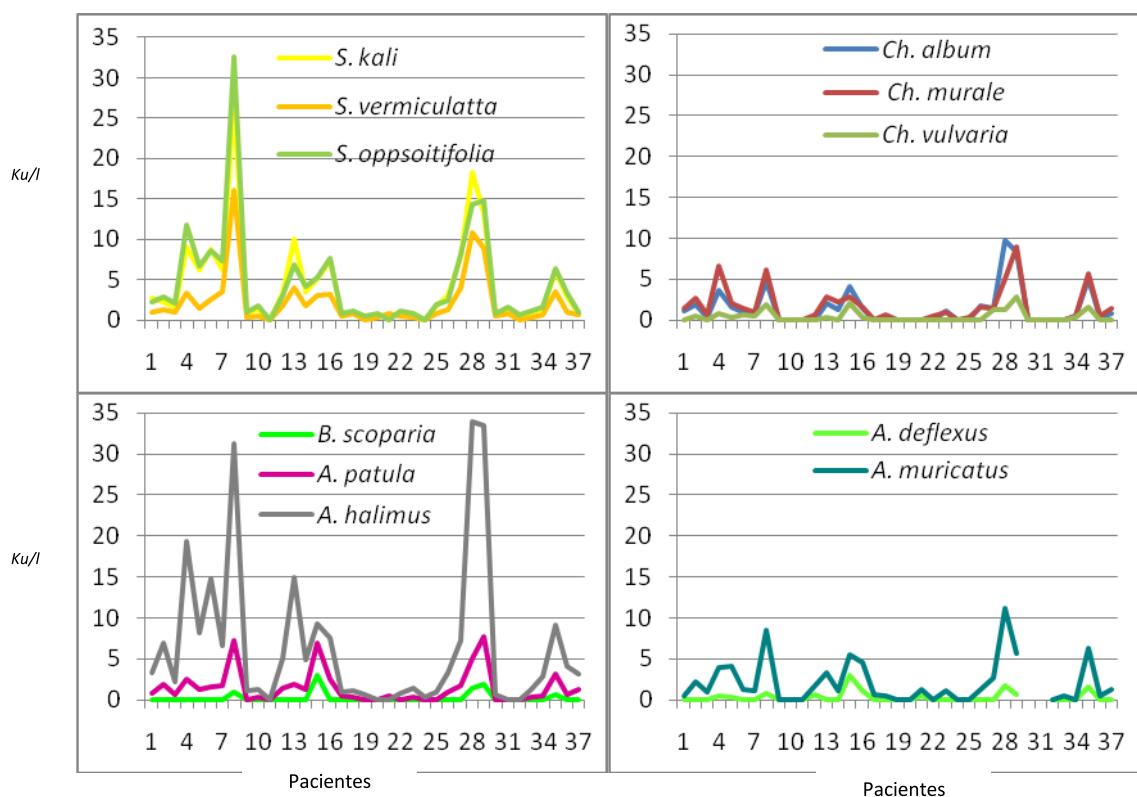


Figura 71. Determinación de IgE específica en cada uno de los 37 pacientes, comparando entre especies de *Salsola*, *Chenopodium*, *Bassia* y *Atriplex* y las dos *Amaranthus*.

4.5.2. Determinación de IgE específica a *S. kali* mediante uniCAP100

Se obtuvieron valores muy equitativos de la IgE específica frente a *S. kali* por el método convencional del uniCAP100 frente al método de biotinización. Los resultados de la IgE específica por UniCAP se expresan en la siguiente Figura.

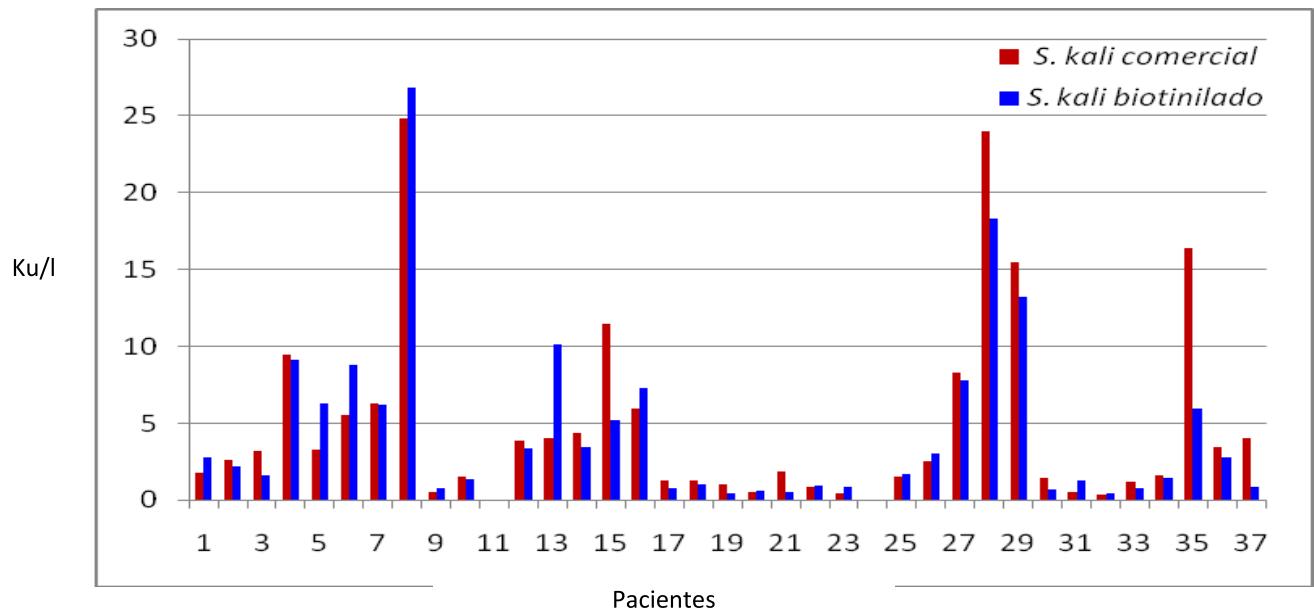


Figura 72. Determinación de IgE específica a *S. kali* mediante el método uniCAP100 representado en rojo y el extracto biotinilado en azul.

4.6. RECUENTO DE POLEN

El polen de la familia de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* comenzó en el mes de abril en el año 2007, persistiendo hasta octubre, dando los máximos recuentos en julio, agosto y septiembre. Se pudo observar como las concentraciones de polen y la época de polinización a lo largo de otros años como el consecutivo 2008 son muy similares, con pequeñas diferencias (figura 73).

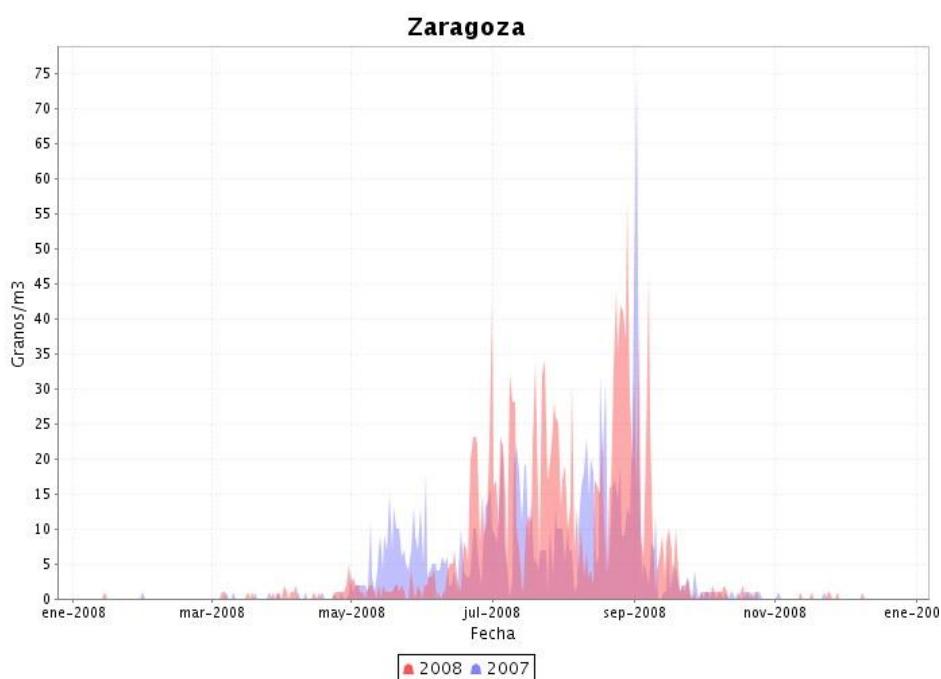


Figura 73. Grafica de la SEAIC del recuento polínico del año 2007 en azul y 2008 en rosa. Los granos se expresan en m^3 (www.seaic.es)

Durante el año 2007 se observaron picos más altos de polen ya al inicio de la estación, en el mes de mayo y junio, y se alcanzó el pico máximo en septiembre con 75 granos/ m^3 . A lo largo de la estación polínica del 2008, no se encontraron picos tan altos de polinización, pero se obtuvo también el más alto en septiembre con 55 granos/ m^3 . Los picos de polinización fueron más tardíos, encontrándose >20 granos/ m^3 a partir del mes de julio.

4.7. FENOLOGÍA DE LA FLORACIÓN EN CHENOPODIACEAE Y AMARANTHACEAE

4.7.1. Floración por el método general

Se cuantificó con este método general el grado de floración de las 11 especies a estudio.

Se observó en el año 2007, que las 3 especies de *Chenopodium* y las 2 *Amaranthaceae* estudiadas mostraron los niveles más altos de floración al inicio y al final de la estación polínica; mientras que los otros tres géneros, *Salsola*, *Bassia* y *Atriplex* mostraron su máximo grado de floración en el medio de la estación polínica y primera semana de septiembre.

Se siguió con el mismo método, la floración a lo largo del año 2008, para observar y comparar si las especies siguen cada año el mismo patrón de floración y en las mismas temporadas polínicas. Los resultados que se obtuvieron fueron muy similares en ambos años consecutivos. Se obtuvieron picos de floración similares en los mismos meses y con el mismo grado de floración, con alguna diferencia de 5 a 7 días dependiendo de la especie, como también se había observado en la concentración total de polen medioambiental de esta familia.

Los resultados para cada género estudiado se muestran en las siguientes figuras.

➤ Resultados para género de *Chenopodium* en el año 2007 y 2008:

No se observó grandes diferencias en el tiempo respecto a la floración de estas especies de un año a otro. Abarcan las tres prácticamente los 6 meses en floración, con diferencias respecto al pico de máxima floración entre ellas (figura 74-A y B).

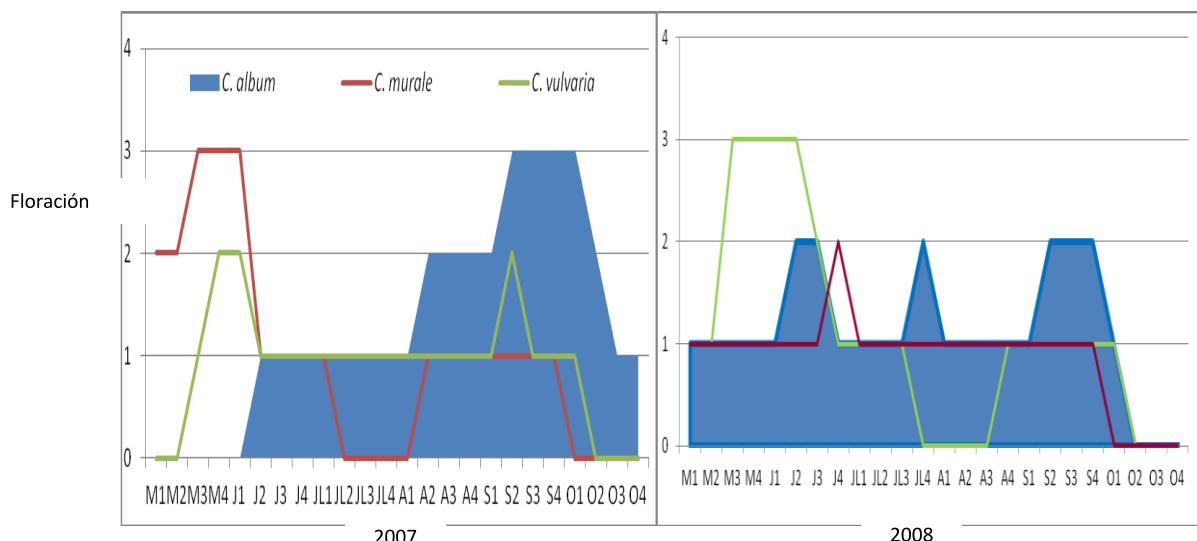


Figura 74.- (A y B). **Floración en el año 2007 de las 3 especies de *Chenopodium*.** La valoración va desde 0, no floración; hasta 3 como máximo grado de floración. En el eje de abscisas **M**: mayo, **J**: junio, **JL**: julio, **A**: agosto, **S**: septiembre, **O**: octubre. Se denomina como M1 a la primera semana del mes de mayo, M2 a la segunda y así sucesivamente. B- **Floración en el año 2008.**

El *C. album* durante el año 2007 comenzó a florar a lo largo del mes de junio de manera muy leve, alcanzando el máximo grado de floración a lo largo del mes de septiembre. En el año 2008, florece ya desde el mes de mayo a la primera semana de octubre, manteniéndose constante a lo largo de toda la temporada con pocos ejemplares en flor, y también alcanza el máximo grado de floración a lo largo del mes de septiembre para desaparecer completamente en la primera semana de octubre.

C. murale floreció dando picos máximos ya desde el mes de mayo, y sin embargo desaparecen los ejemplares en flor durante los meses de verano, en el mes de julio 2007 y en agosto en el año 2008. Ambos años reaparece en el mes de septiembre dando un pico máximo de floración.

C. vulvaria es la especie que se mantuvo los 6 meses prácticamente en floración, con picos máximos en el mes de mayo-junio y mediados de agosto a septiembre en los dos años consecutivos.

➤ Resultados para **género de *Salsola*** en el año 2007 y 2008:

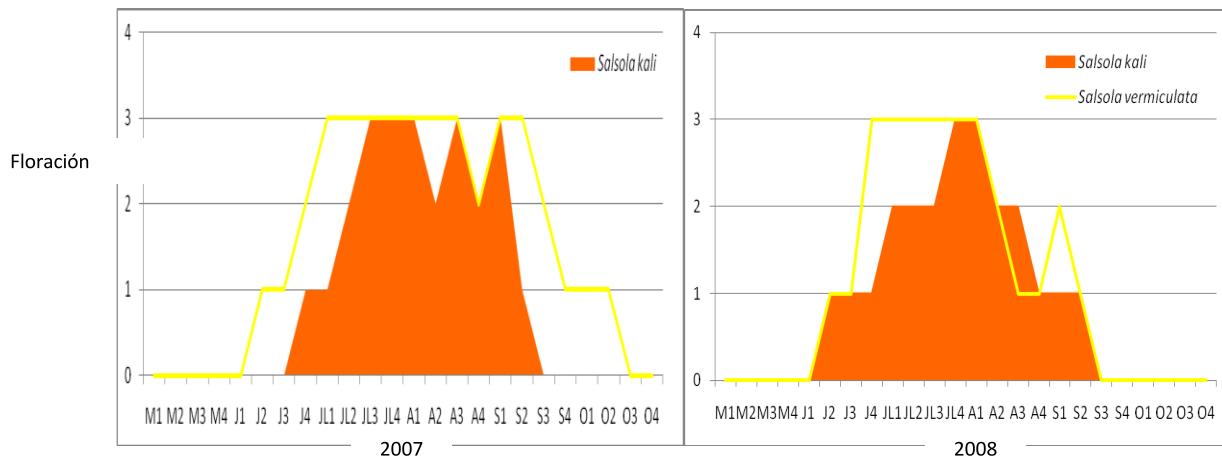


Figura 75- (A y B). A-Floración de las 2 especies de *Salsola* (*vermiculatta* y *kali*) seguidas en el área de Zaragoza en el año 2007; B- Floración de estas especies en el año 2008.

No se encontraron ejemplares de *S. oppositifolia* en nuestra área, por lo que sólo se siguieron las otras dos especies. Tanto *S. kali* como *S. vermiculatta* florecieron en los meses más cálidos. Durante el año 2007 *S. kali* comenzó a florecer la tercera semana de junio, dando sus picos máximos a mediados de julio y agosto, para desaparecer completamente a mediados de septiembre (figura 75-A). Se comportó prácticamente igual a lo largo del año 2008, manteniendo un solo pico máximo de floración la primera semana de agosto (figura 75-B).

Curiosamente *S. vermiculata* comenzó a florecer unas semanas antes que *S. kali*, por lo tanto se encontraron ejemplares en flor desde la primera semana de junio y ofreció

un grado de floración muy alto toda la temporada desde junio hasta octubre en el 2007 y septiembre en el 2008.

➤ Resultados para el **género de Atriplex y Bassia** en el año 2007 y 2008:

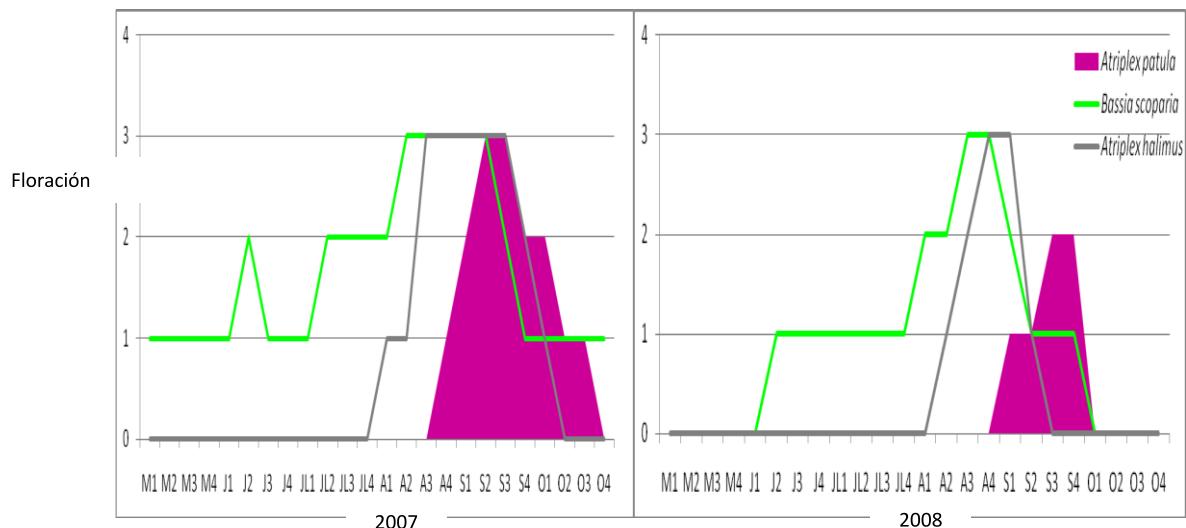


Figura 76 (A y B). A- Floración de *A. patula*, *A. halimus* y *B. scoparia* en el año 2007; B- Floración de estas especies en el año 2008.

B. scoparia ofreció floración de 5 a 6 meses al año, con un grado de floración moderado. Su pico máximo ambos años de estudio fue en la segunda quincena de agosto, manteniéndose durante un mes en el 2007, y tan solo dos semanas en el 2008.

Los *Atriplex* son las *chenopodiaceae* más tardías en la floración. Ambas comienzan durante la primera semana de agosto en los dos años consecutivos, entrando en pocos días todos sus ejemplares en flor, y alcanzaron así el grado máximo de floración que mantuvieron hasta la última semana de septiembre, siendo ambos años equitativos.

- Resultados para el género de las Amaranthaceae en el año 2007 y 2008:

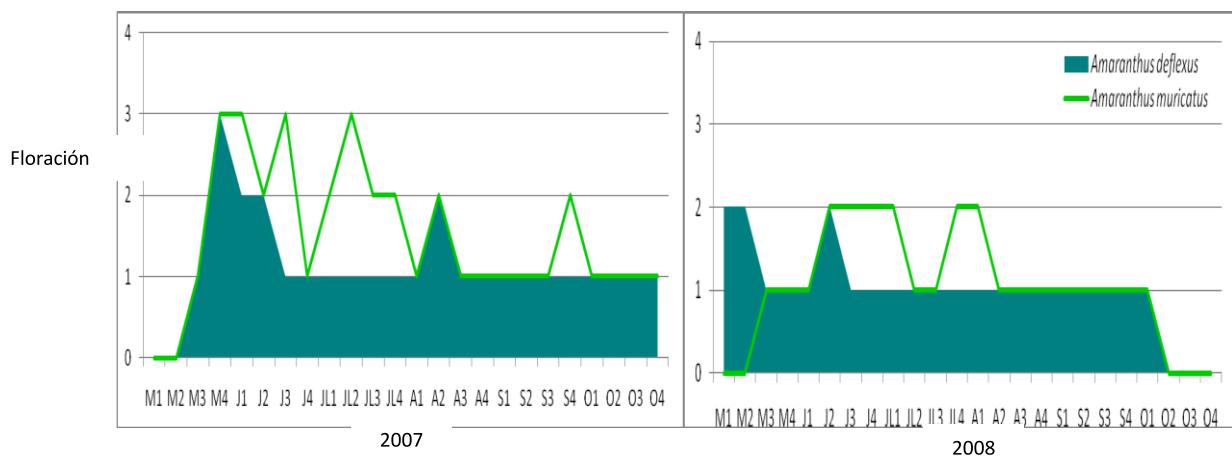


Figura 77 (A y B). A- Floración de las Amaranthaceae en el año 2007. B- Floración de las Amaranthaceae en el año 2008.

Las amaranthaceae se encontraron en floración prácticamente los 6 meses de estudio. *A. deflexus* dió los máximos niveles de floración en mayo ambos años consecutivos, para mantenerse el resto de los meses, pero con niveles muy bajos. *A. muricatus* alcanzó grados más altos de floración de manera constante con picos variables cada año a lo largo de la estación polínica.

4.7.2. Floración por el método específico o semicuantitativo de Orshan

Tal y como se comentó en el material y métodos, dado la complejidad del método únicamente se realizó el seguimiento en 5 especies consideradas como las más significativas del área.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras:

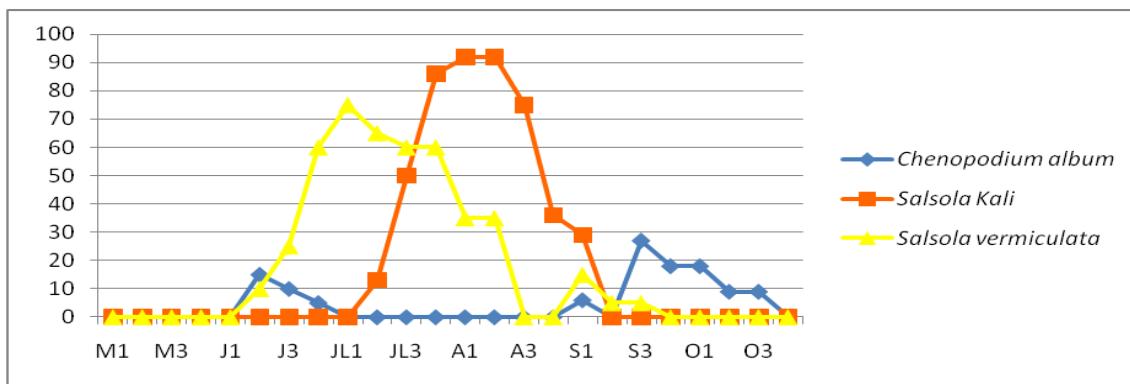


Figura 78. Gráfico del recuento de picos de floración de *C. album* en azul, *S. kali* en naranja y *S. vermiculata* en amarillo, a lo largo de los 6 meses de estudio del año 2007. Los resultados se expresan en porcentaje de plantas con más del 25% de la especie en flor, que coincide con el pico de polinización.

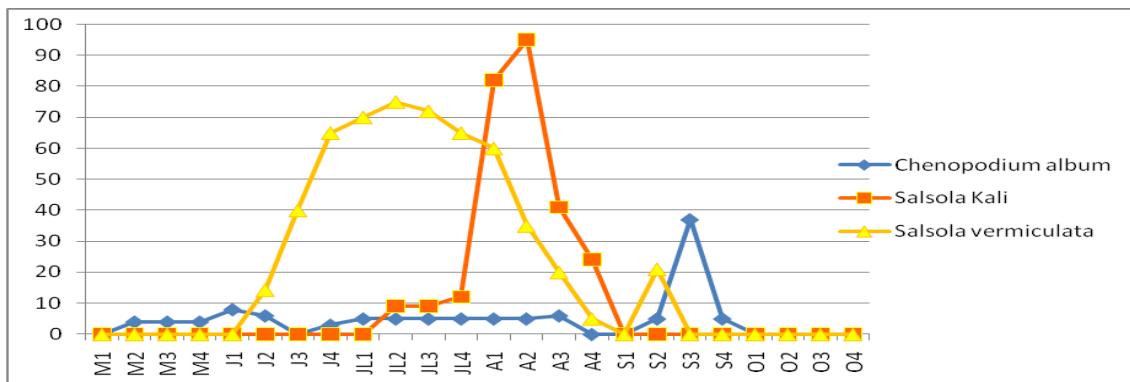


Figura 79. Gráfico del recuento de picos de floración de *C. album* en azul, *S. kali* en naranja y *S. vermiculata* en amarillo, a lo largo de los 6 meses de estudio del año 2008.

Se observó que *C. album* tiene niveles de floración muy escasos a lo largo de los 6 meses, dando un pequeño pico de 30% de ejemplares en floración, en el 2007 y 38% en el 2008, en la tercera semana de Septiembre, en los dos años consecutivos.

S. kali aportó el máximo pico de floración de todas las especies seguidas y varió entorno al 90-98% de ejemplares en floración durante dos primeras semanas de Agosto y coincide también ambos años. *S. vermiculata* fue un poco más precoz que *S. kali*,

dando el pico de polinización en la primera-segunda semana de julio, también en los dos años consecutivos.

Destaca el hecho de que los picos de floración de las especies a estudio por este método son muy similares de un año a otro, tanto por la semana del año que se producen, como por la cuantía de especies que florecen.

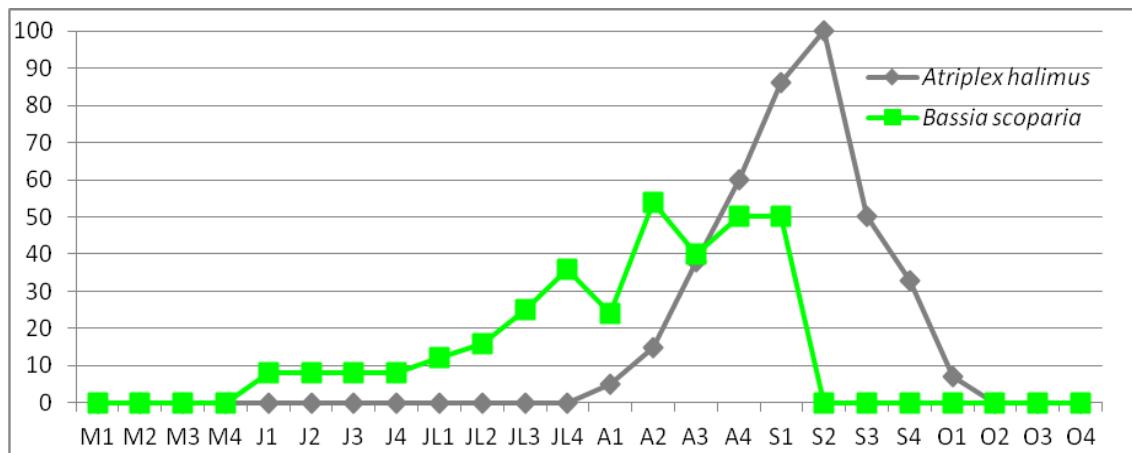


Figura 80. Gráfico del recuento de picos de floración de *A. halimus* en gris, y *B. scoparia* en verde, a lo largo de los 6 meses de estudio del **año 2007**.

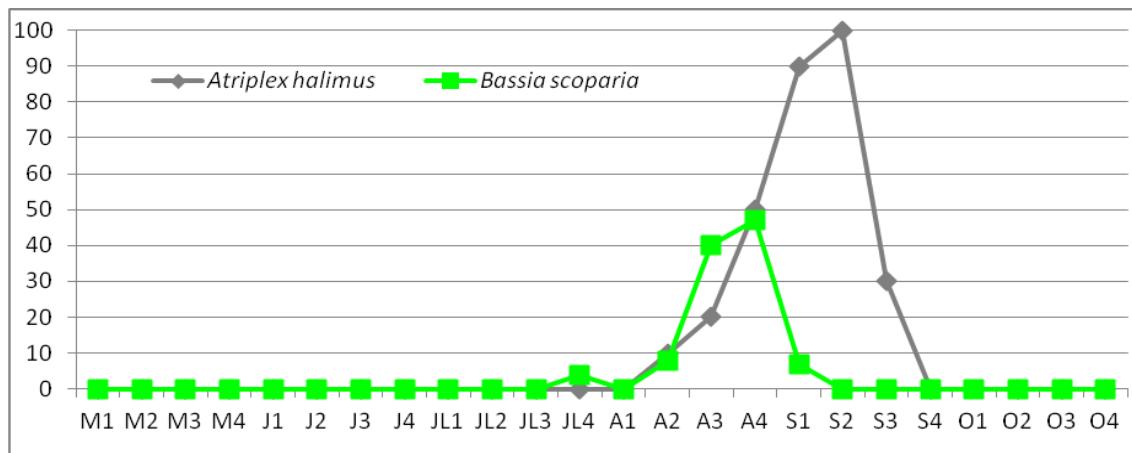


Figura 81. Gráfico del recuento de picos de floración de *A. halimus* en gris, y *B. scoparia* en verde, a lo largo de los 6 meses de estudio del **año 2008**.

A. halimus, ofreció el pico máximo de floración en la segunda semana de septiembre alcanzando casi el 100% de los ejemplares en flor, los dos años consecutivos. *B. scoparia* varió un poco más, pero también presentó su pico máximo en el mes de agosto, en ambos años, concentrando alrededor del 40% de ejemplares en flor en ese mes.

4.7.3. Comparación del método general y específico de Orshan

Se compararon las cinco especies estudiadas a través de ambos métodos (*S. kali*, *S. vermiculata*, *C. album*, *B. scoparia* y *A. halimus*) a lo largo de los dos años consecutivos 2007 y 2008. Se observó que se reproducen los picos de máxima floración para cada una de las especies con ambos métodos y que los picos de floración son similares tanto en cuantía, como en el momento del año que se producen, en los dos años consecutivos.

Se muestran en los gráficos de la izquierda el método general y en la derecha en específico de Orshan para cada una de las especies, comparando el año 2007 y 2008 (figuras 82. A-B, 83. A-B, 84. A-B, 85. A-B y 86. A-B).

➤ *S. kali*:

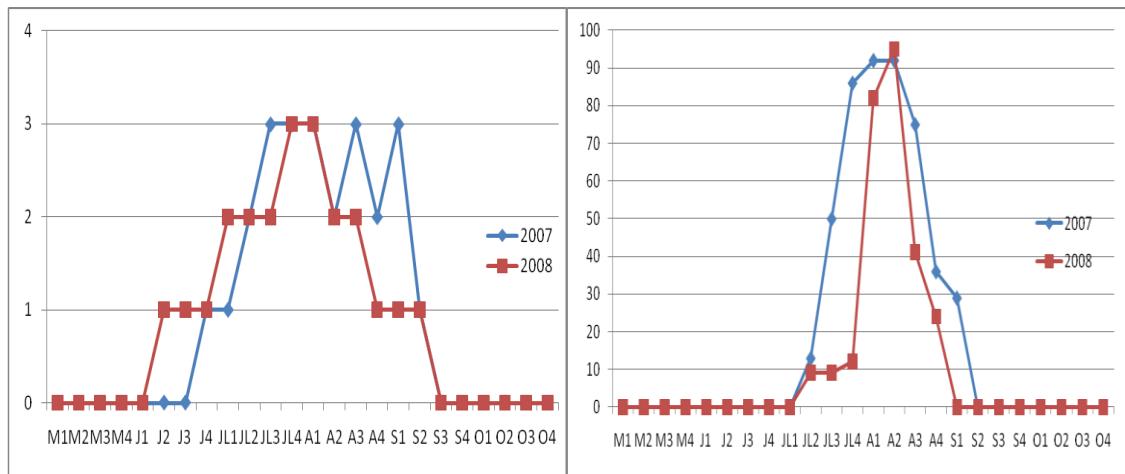


Figura 82 (A y B). A- Método general de visu para *S. kali* en el año 2007 en azul y 2008 en rojo. B- Método específico o semicuantitativo de Orshan para *S. Kali* en azul para el año 2007 y en rojo para el 2008.

➤ *S. vermiculata*:

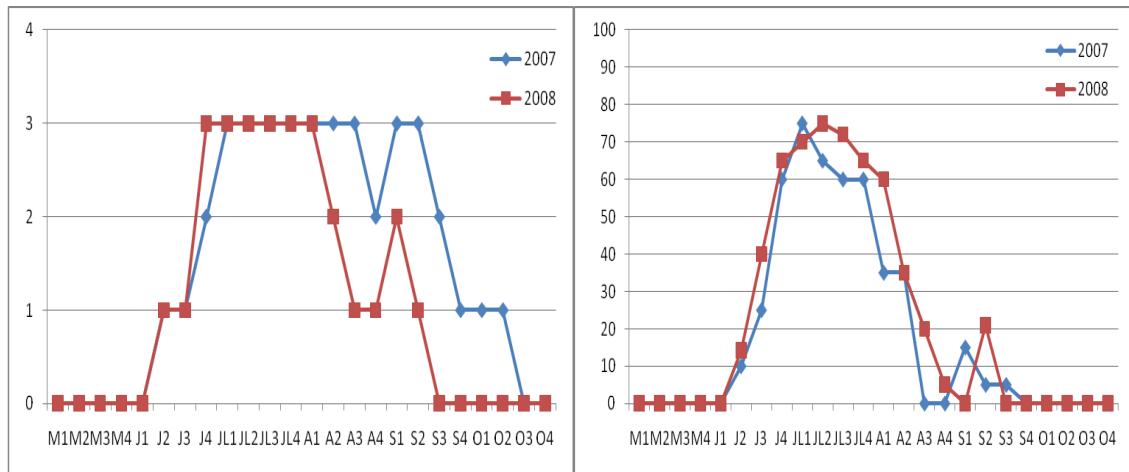


Figura 83 (A y B). A- Método general de visu para *S. vermiculata* en el año 2007 en azul y 2008 en rojo. B- Método específico o semicuantitativo de Orshan para *S. vermiculata* en azul para el año 2007 y en rojo para el 2008.

➤ *C. album*:

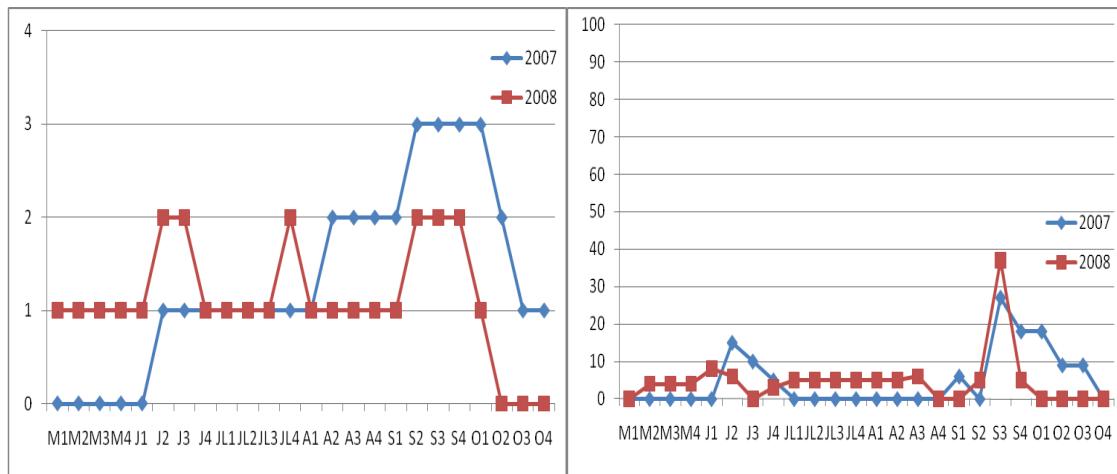


Figura 84 (A y B). A- Método general de visu para *C. album* en el año 2007 en azul y 2008 en rojo. B- Método específico o semicuantitativo de Orshan para *C. album* en azul para el año 2007 y en rojo para el 2008.

➤ *A. halimus*:

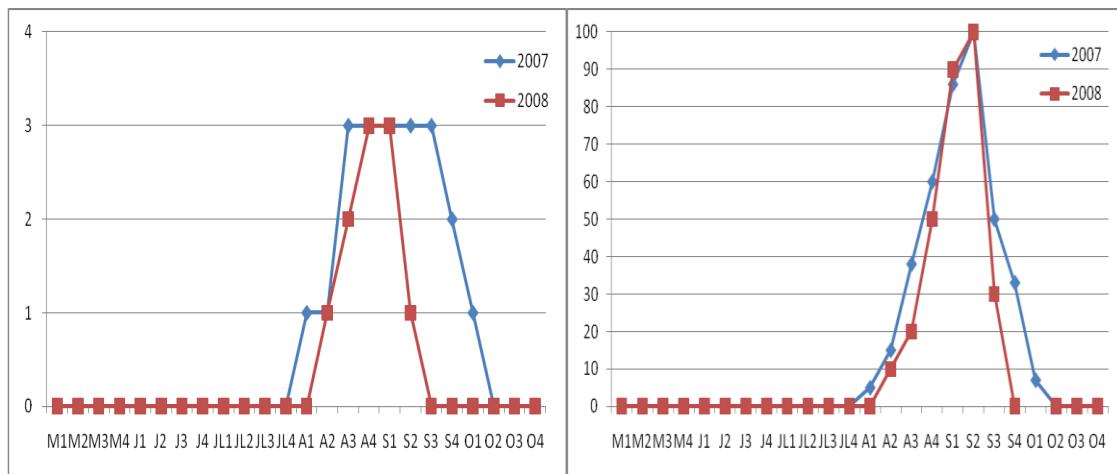


Figura 85 (A y B). A- Método general de visu para *A. halimus* en el año 2007 en azul y 2008 en rojo. B- Método específico o semicuantitativo de Orshan para *A. halimus* en azul para el año 2007 y en rojo para el 2008.

➤ ***B. scoparia*:**

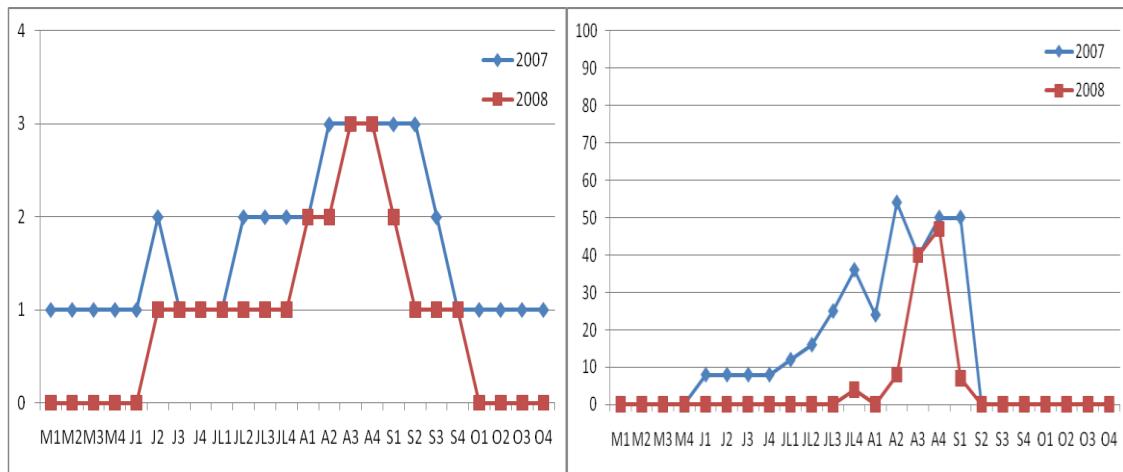


Figura 86 (A y B). A- Método general de visu para *B. scoparia* en el año 2007 en azul y 2008 en rojo. B- Método específico o semicuantitativo de Orshan para *B. scoparia* en azul para el año 2007 y en rojo para el 2008.

4.7.4. Correlación entre la floración y el polen

Como se comenta en capítulos anteriores se observó una tendencia general de concordancia entre la concentración de polen (expresado en granos/m³) y la sintomatología de los pacientes, aunque las variaciones de polen no siempre se siguen de variaciones de síntomas, especialmente en algunos tramos de julio y agosto.

A continuación se comparó el grado de floración de cada una de las 10 especies por el método general de visu, con la concentración de polen medio-ambiental. Se encontró correlación para todo el periodo sintomático sólo frente a las especies de *S. kali*, *S. vermiculata* y *B. scoparia* en el año 2007, siendo *S. kali* la que obtuvo un valor más alto de correlación con una r^2 de 0,7331; (tabla 21). Ahora bien, se realizó también este

análisis acotando el estudio de mayo a agosto, ya que es en el mes de mayo cuando se inicia a contabilizar polen de la familia *Chenopodiaceae/amaranthaceae* obteniéndose valores que van desde mínimos en mayo hasta valores máximos en Agosto, y es durante este periodo de máxima polinización cuando se puede demostrar mejor la correlación. De este modo se observó que si acotamos el estudio de mayo a agosto más especies obtienen correlación con la concentración de polen medioambiental. Estas especies son además de *S. kali*, *S. vermiculata* y *B. scoparia*; *C. album*, *C. murale*, *A. patula* y *A. halimus*. Además se observó que los valores de correlación fueron más altos, obteniendo en prácticamente todas estas r^2 por encima de 0,8.

	r^2 (mayo a octubre)	r^2 (mayo a agosto)
<i>Chenopodium album</i>	0,0071	0,8896
<i>Chenopodium murale</i>	0,0047	0,5184
<i>Chenopodium vulvaria</i>	0,1569	0,0098
<i>Salsola kali</i>	0,7331	0,8402
<i>Salsola vermiculata</i>	0,4542	0,6954
<i>Bassia scoparia</i>	0,4833	0,9941
<i>Atriplex patula</i>	0,2297	0,7913
<i>Atriplex halimus</i>	0,0384	0,7913
<i>Amaranthus deflexus</i>	0,1131	0,0004
<i>Amaranthus muricatus</i>	0,0858	0,0138

Tabla 21. Coeficiente de correlación de las 10 especies seguidas entre su grado de floración y la concentración de polen total medioambiental en el año 2007.

❖ *Chenopodium*

Las tres especies de *Chenopodium* seguidas en el año 2007 ofrecieron floración prácticamente los 6 meses a estudio. No se observó correlación con la cuantificación de polen medioambiental total para todo el periodo estudiado (figura 87.-A, B y C). Los

valores obtenidos fueron de r^2 de 0,0071, 0,0047 y 0,1569 para *C. album*, *C. murale* y *C. vulvaria* respectivamente. Ahora bien, en el cálculo realizado para los meses de mayor polinización, se observó como *C. album* y *C. murale* si obtuvieron correlación con un valor de r^2 de 0,8896 y 0,5184 respectivamente (tabla 21).

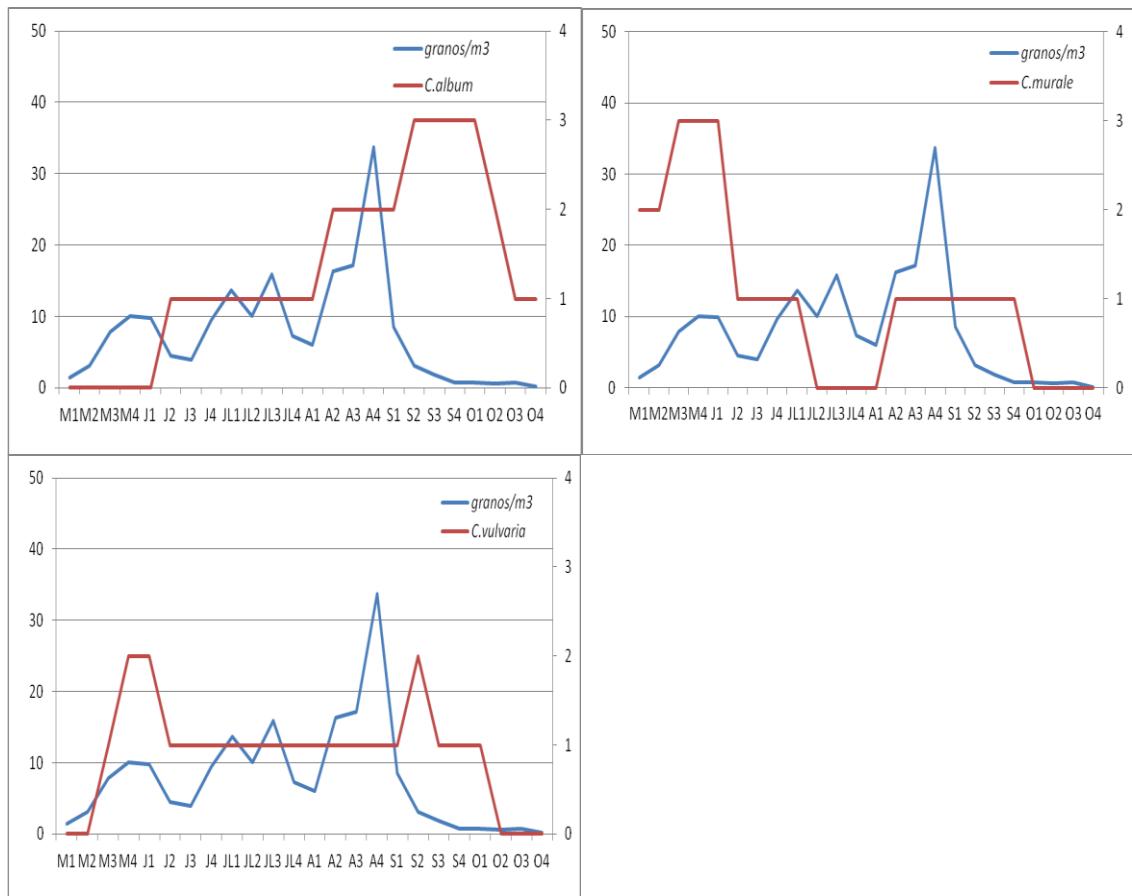


Figura 87 (A, B, y C). A.-Correlación entre *C. album*, en rojo (valores de floración de 0 a 4 expresados en eje secundario), comparandolas con la cuantificación de polen ambiental expresado en polen/ m^3 en azul (eje principal de abcisas). B.- Floración de *C. murale* en rojo y cuantificación de polen ambiental en azul y C.- Floración de *C. vulvaria* en rojo y cuantificación de polen ambiental en azul. Datos del año 2007.

❖ *Salsola*

De las dos especies de *Salsola* que pudieron ser seguidas en el área a estudio, se observó que ambas pueden explicar los picos de polen en los meses más calidos de julio y agosto del 2007; obteniéndose una correlación alta tanto para todo el periodo estudiado (r^2 de 0,7321 para *S. kali* y r^2 de 0,4542 para *S. vermiculata*) como acotado a los meses de mayor polinización de mayo a agosto (r^2 de 0,8402 para *S. kali* y r^2 de 0,6954 para *S. vermiculata*). Ahora bien, se puede observar con el análisis visual que estas especies no explican el pico de polen obtenido en el mes de mayo, cuando todavía no habían comenzado a florar, ni el pico de septiembre.

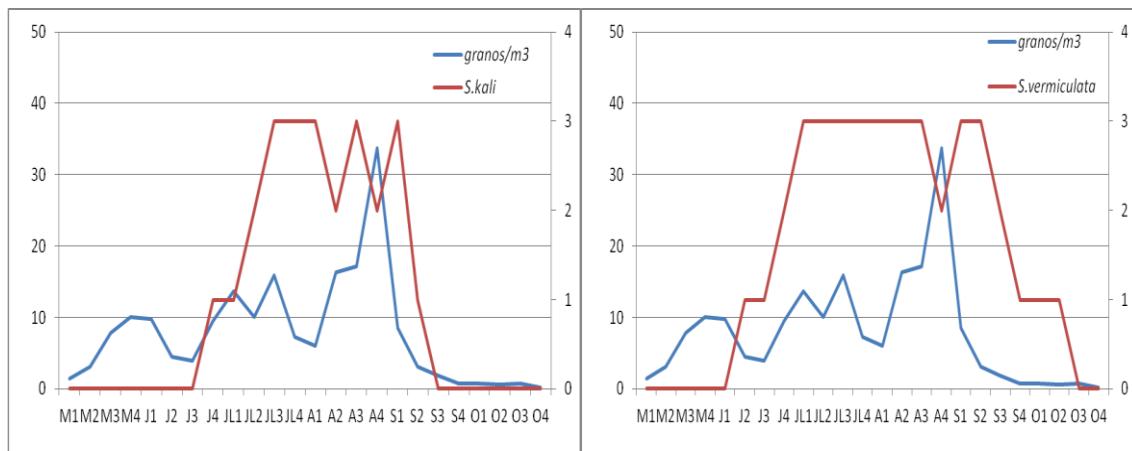


Figura 88 (A y B). A- Correlación entre la floración de *S. kali* en rojo con la concentración de polen ambiental en azul. B- Floración de *S. vermiculata* comparada con la concentración de polen ambiental (expresado en m^3). Datos año 2007.

❖ *Bassia scoparia*

B. scoparia se correlacionó bien con el último pico de polen del mes de septiembre del año 2007, pero no justifica los previos. Se obtuvo una correlación para todo el periodo polínico de 0,4833 y de 0,9941 para los meses de mayor polinización (tabla 21).

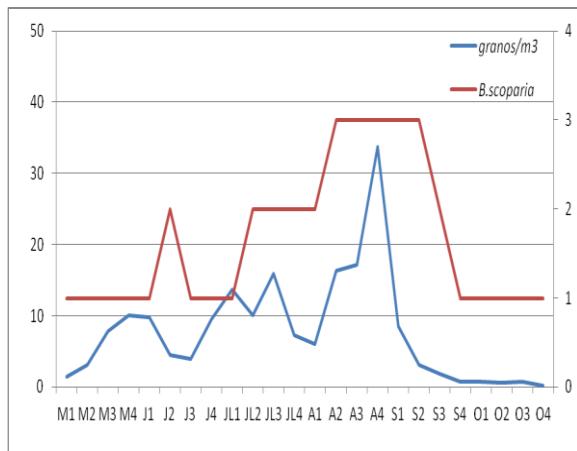


Figura 89. Floración de *B. scoparia* en rojo, comparandola con la cuantificación de polen ambiental expresado en polen/ m^3 . Datos año 2007.

❖ *Atriplex*:

Ambos *Atriplex* florecieron sólo al final del verano y principio del otoño. De las dos especies, tan sólo *A. halimus* se correlacionó bien con el último pico de polen del mes de septiembre del 2007; aun con todo no se obtuvo correlación frente a todo el periodo estudiado, con unos valores de r^2 de 0,2297 y 0,0384 frente a *A. patula* y *A. halimus* respectivamente; pero si se obtuvo ligera correlación cuando se acoto a los meses de máxima polinización con valores de r^2 de 0,7913 para ambas especies (tabla 21).

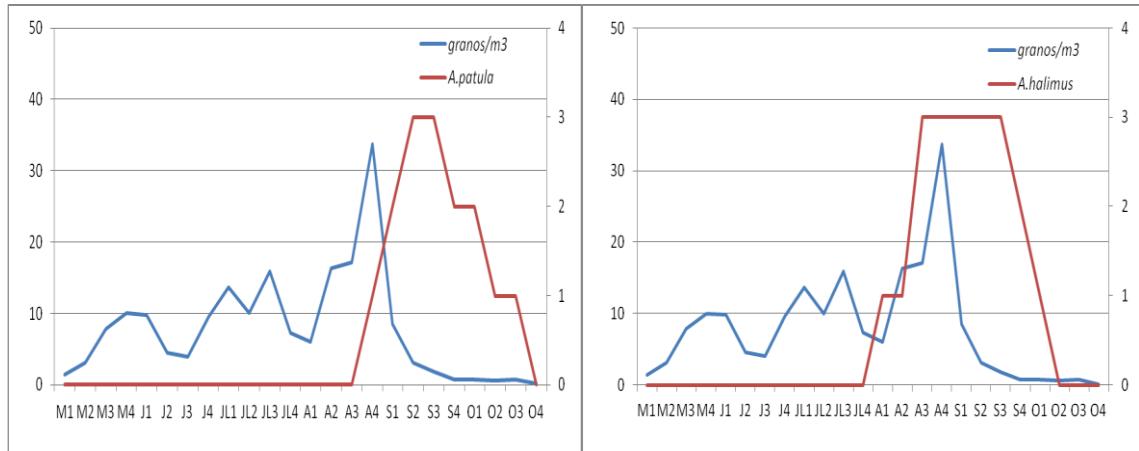


Figura 90 (A y B). A-. Floración de *A. patula* en rojo y polen amiental. B-. Floración de *A. halimus* en rojo, y polen ambiental en el año 2007.

❖ *Amaranthus*:

Las dos *amaranthaceae* seguidas florecieron prácticamente los 6 meses a estudio, pero no se correlacionan con los picos de polen ambiental. Los valores obtenidos fueron de 0,1131 y 0,0858 para todo el periodo y de 0,004 y 0,0138 de mayo a agosto para *A. deflexus* y *A. muricatus* respectivamente (tabla 21).

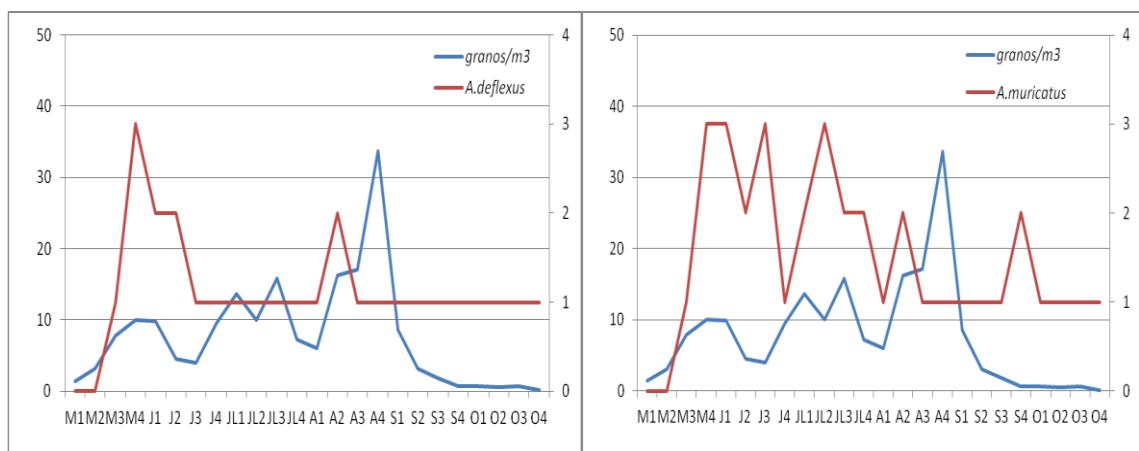


Figura 91 (A y B). A-. Floración de *A. deflexus* en rojo y polen ambiental. B-. Floración de *A. muricatus* en rojo y polen ambiental en el año 2007.

Correlación de polen (expresado en granos/m³) con la floración de cada una de las 10 especies a estudio en el año 2008.

Se realizó el seguimiento de las especies en el año consecutivo 2008 y se correlaciono con la concentración de polen medioambiental, obteniéndose resultados muy similares en ambos años, como se puede observar en la siguiente tabla.

	r ² (mayo a octubre)	r ² (mayo a agosto)
<i>Chenopodium album</i>	0,1908	0,0016
<i>Chenopodium murale</i>	0,1531	0,8004
<i>Chenopodium vulvaria</i>	0,2196	0,1182
<i>Salsola kali</i>	0,9034	0,9981
<i>Salsola vermiculata</i>	0,8234	0,8423
<i>Bassia scoparia</i>	0,6780	0,5883
<i>Atriplex patula</i>	0,0107	0
<i>Atriplex halimus</i>	0,2847	0,2524
<i>Amaranthus deflexus</i>	0,0134	0,9648
<i>Amaranthus muricatus</i>	0,4604	0,2657

Tabla 22. Coeficiente de correlación de las 10 especies seguidas entre su grado de floración y la concentración de polen total medioambiental en el año 2008.

❖ *Chenopodium:*

C. murale fue la primera de los *chenopodium* en comenzar a florar en el 2008 ya a principios del mes de mayo, mientras que *C. album* y *C. vulvaria* fueron más tardíos en el mes de junio para el primero y julio para el segundo. No se observó correlación con el polen ambiental total. Los valores obtenidos fueron de 0,1908 para *C. album*, 0,1531 para *C. murale* y 0,2196 para *C. vulvaria*. Si se observó correlación para el polen de *C. murale* en los meses de mayor polinización con un valor de r² de 0,8004, no así para las otras dos especies.

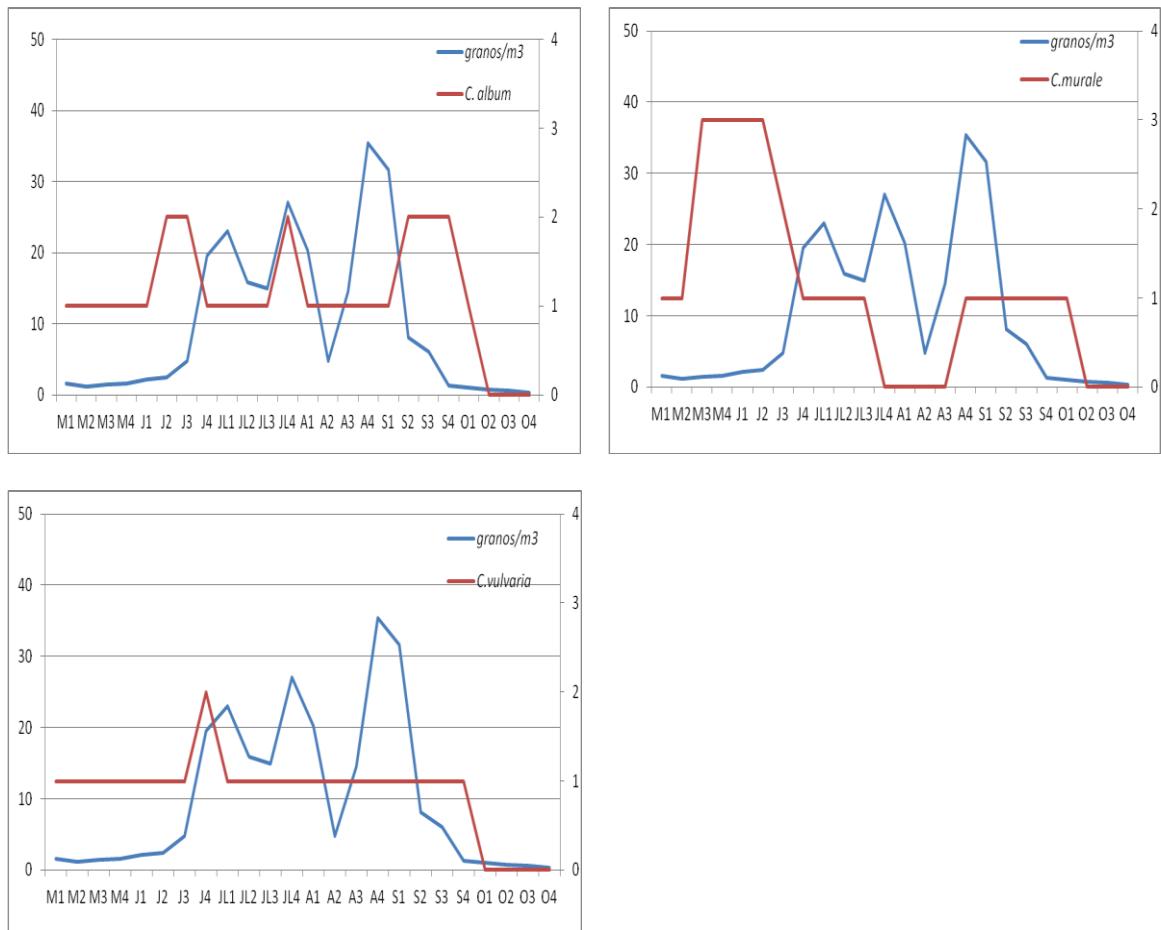


Figura 92 (A, B y C). A-. Floración de *C. album* en rojo y concentración de polen en azul. B-. Floración de *C. murale* en rojo y concentración de polen en azul. C-. Floración de *C. vulvaria* en rojo y concentración de polen ambiental en azul. Año 2008.

❖ *Salsola*

Se observó en ambas especies, tanto para *S. kali* (figura 93-A) como para *S. vermiculata* (figura 93-B) correlación entre los picos de floración y los picos de polen medioambiental sobre todo en los meses más calidos como sucedió en el año anterior, con una pequeña diferencia con el pico de polinización de la primera semana de septiembre, que tan solo *S. vermiculata* ofreció, no así *S. kali*. Fueron de nuevo las dos

especies que se correlacionaron mejor con el polen medioambiental total en todo el periodo r^2 de 0,9034 y 0,8234; y también en los meses de mayor polinización con r^2 de 0,9981 y 0,8423. (tabla 22). Ahora bien, como sucede en años anteriores no justifican los recuentos de polen de los primeros meses cuando todavía están en estado vegetativo.

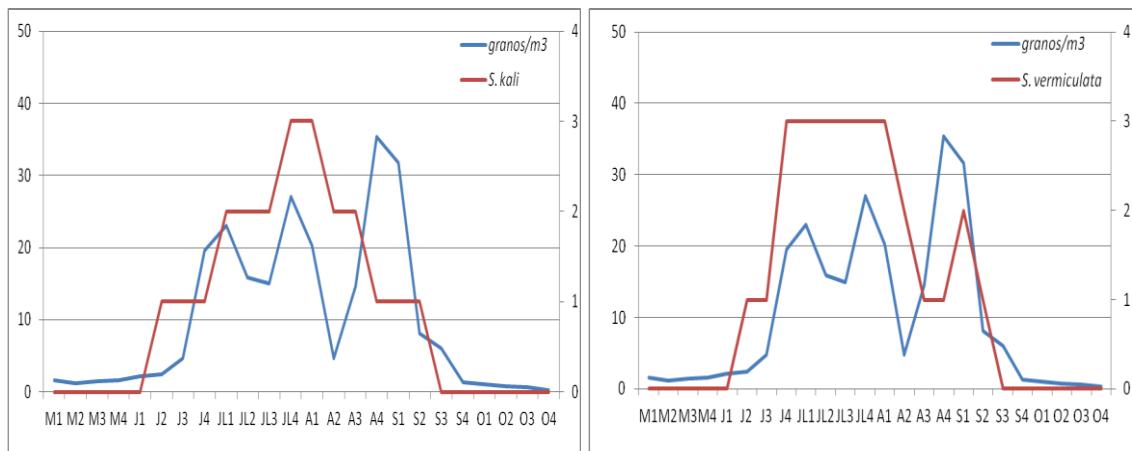


Figura 93 (A y B). A-. Floración de *S. kali* en rojo y polen ambiental en azul. B-. Floración de *S. vermiculata* en rojo y concentración de polen ambiental en azul. Año 2008.

❖ *Bassia scoparia*

La especie de *B. scoparia* comenzó a florecer en junio, dando su pico máximo a final de agosto y primera semana de septiembre coincidiendo con el pico de polen ambiental en esa fecha; pero no justifica los 2 picos previos en los meses de junio y julio. Se obtuvo una correlación de r^2 de 0,6780 para todo el periodo y de 0,5883 desde mayo a agosto.

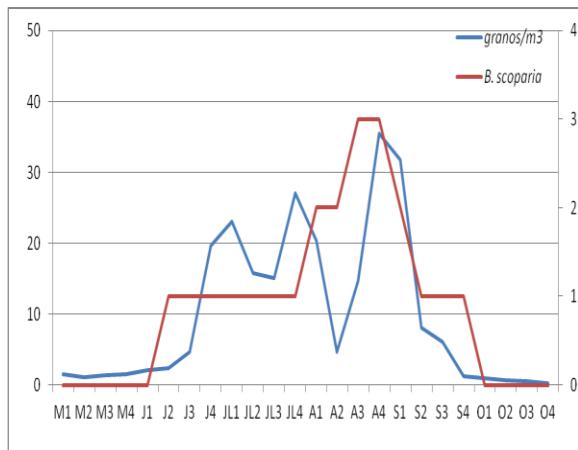


Figura 94. Floración de *B. scoparia* en rojo y polen ambiental en azul.

❖ *Atriplex*

Las dos especies de *Atriplex* estudiadas florecieron como se observa en las gráficas el final del verano, adelantándose *A. halimus*. Solo el último pico de polen ambiental coincide con una de las especies, que como en el año anterior fue *A. halimus*, sin poder justificar tampoco los picos previos. Los valores obtenidos para la correlación fueron bajos de 0,0107 y 0,2847 para todo el periodo y de 0,0001 y 0,2524 para *A. patula* y *A. halimus* respectivamente (tabla 22).

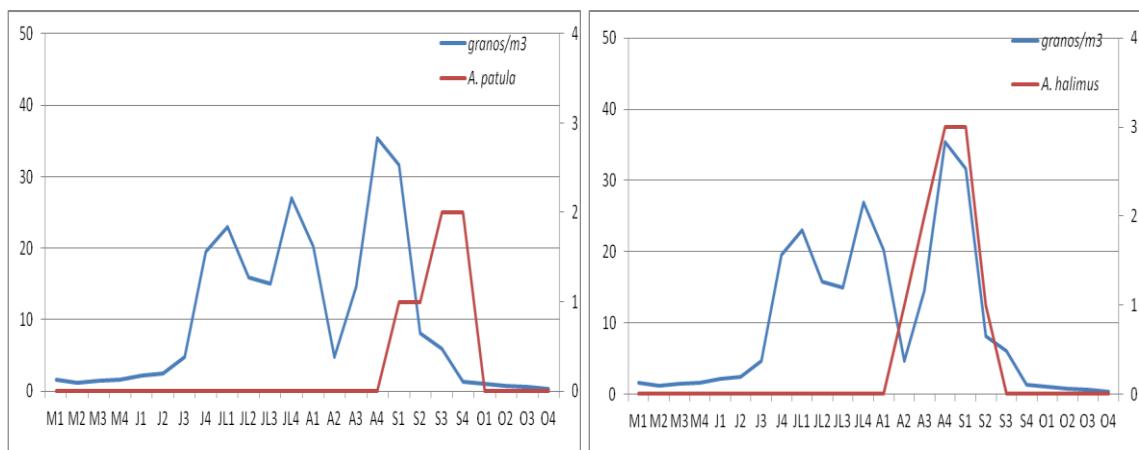


Figura 95 (A y B). A-. Floración de *A. patula* en rojo y polen ambiental en azul. B-. Floración de *A. halimus* en rojo y polen ambiental en azul. Año 2008.

❖ *Amaranthaceae*

La correlación obtenida para estas dos especies fueron bajos para el periodo completo con unos valores obtenidos de 0,0134 y 0,4604 (tabla 22) frente a *A. deflexus* y *A. muricatus* respectivamente, aumentando la correlación frente a *A. muricatus* si acotamos a los meses de floración con r^2 de 0,9648.

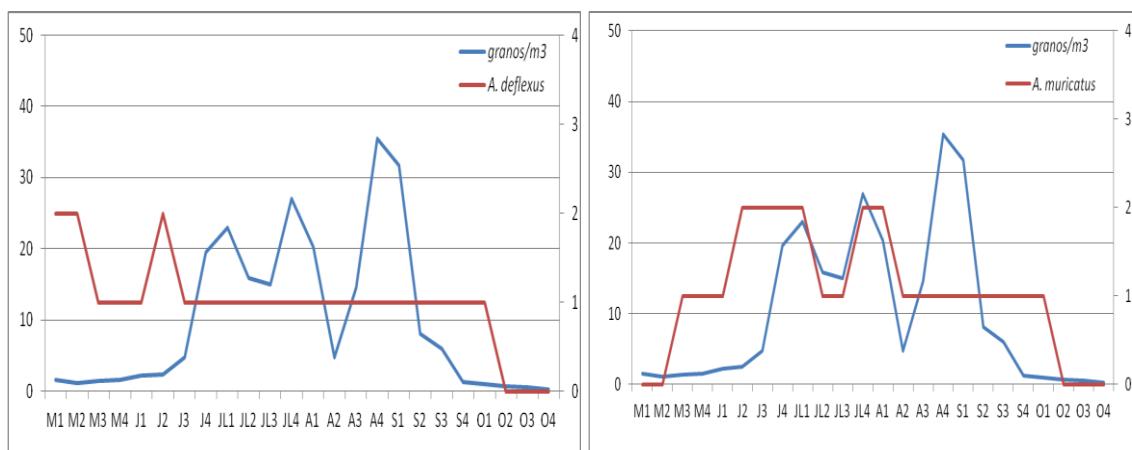


Figura 96 (A y B). A-. Floración de *A. muricatus* en rojo y concentración de polen en azul. B-. Floración de *A. deflexus* en rojo y polen ambiental en azul. Año 2008.

4.7.5. Correlación entre la floración y los síntomas

Para el estudio de correlación entre la floración de las especies y la sintomatología clínica de los pacientes se realizó un análisis multivariante a lo largo de toda la estación polínica en el año 2007 y se observó que tan solo dos ejemplares presentaron correlación con la clínica. Estas especies fueron *C. vulvaria* con el que se obtuvo un valor de $p < 0,001$ y *A. patula* con un valor de $p = 0,031$ (tabla 21).

Como se observa en los gráficos la mayoría de los pacientes presentaron síntomas desde mayo hasta octubre, dando el mayor *score* de síntomas en los primeros meses de estudio (mayo-junio). Tan solo se encontraron 3 especies que polinizaran los 6 meses de seguimiento y estas fueron *B. scoparia*, *C. album* y *C. vulvaria* y de ellas tan solo *C. vulvaria* obtuvo un valor de *p* estadísticamente significativo.

Los ejemplares más abundantes tanto en número como en estado de floración fueron *B. scoparia*, *S. kali*, *S. vermiculata*, *C. album* y *A. halimus*; sin embargo sólo la floración de *S. kali*, *S. vermiculata* y *B. scoparia* se correlacionó bien con la concentración de polen en el 2007 y sin embargo, otras dos especies *C. vulvaria* y *A. patula* fueron las únicas que mostraron un valor de *p* estadísticamente significativo para los 6 meses a estudio o para *A. patula* en su periodo de floración que abarca los últimos meses del estudio.

El significativo indica que la variable independiente (síntomas generales) puede explicarse y predecirse según la variable dependiente que es la floración.

Especie	valor de significación de la <i>p</i>
<i>C. album</i>	0,266
<i>C. murale</i>	0,233
<i>C. vulvaria</i>	<0,001
<i>S. kali</i>	0,317
<i>S. vermiculata</i>	0,299
<i>B. scoparia</i>	0,653
<i>A. patula</i>	0,031
<i>A. halimus</i>	0,335
<i>A. deflexus</i>	0,772
<i>A. muricatus</i>	0,963

Tabla 23. Análisis multivariante para correlacionar especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* y síntomas en el año 2007. Destacan en rojo los valores de *p* estadísticamente significativos (*p*<0,05).

 **Chenopodium:**

De los tres *chenopodium* seguidos tan solo *C. vulvaria* mostró correlación con la sintomatología completa de los pacientes. Se observó que esta especie comenzó a florecer a mediados de mayo, coincidiendo con el inicio de los síntomas de los pacientes y se mantuvo en floración a lo largo de toda la primavera y verano, para hacer un pico en septiembre coincidiendo también con los síntomas (figura 97). El valor de p obtenido fue <0,001.

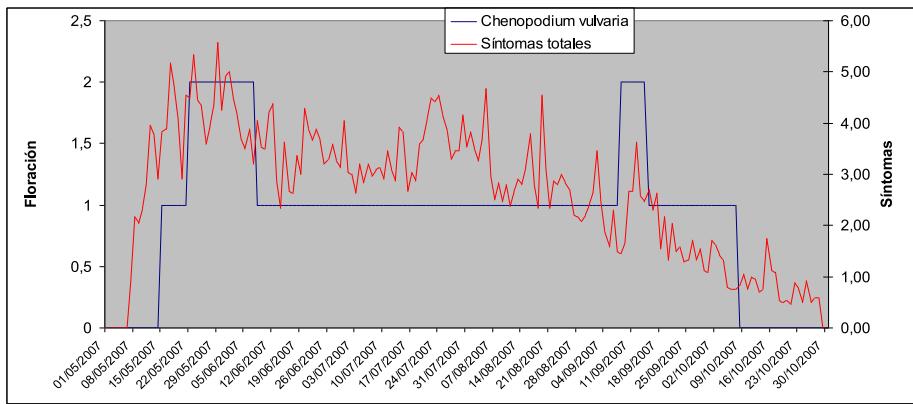


Figura 97. Se observan síntomas totales en rojo y floración de *C. vulvaria* en azul.

C. murale (figura 98) floreció al inicio de la estación polínica dando su máximo grado de floración en el mes de mayo para descender en los meses más cálidos, y dar un pequeño pico en agosto y septiembre. La correlación no fue estadísticamente significativa y el valor de p fue de 0,233.

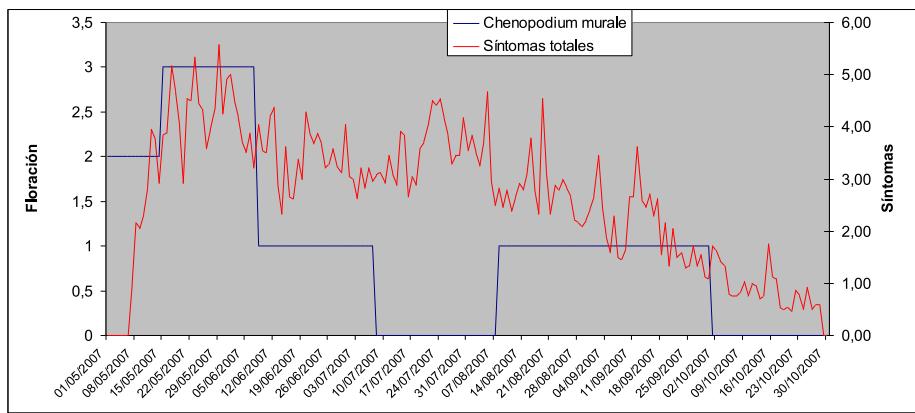


Figura 98. Se observan síntomas totales en rojo y floración de *C. murale* en azul.

Respecto a *C. album*, se observó como la floración fue al revés de la sintomatología clínica de los pacientes y el valor de p obtenido fue de 0,266 con el máximo grado de floración en los meses de septiembre (figura 99).

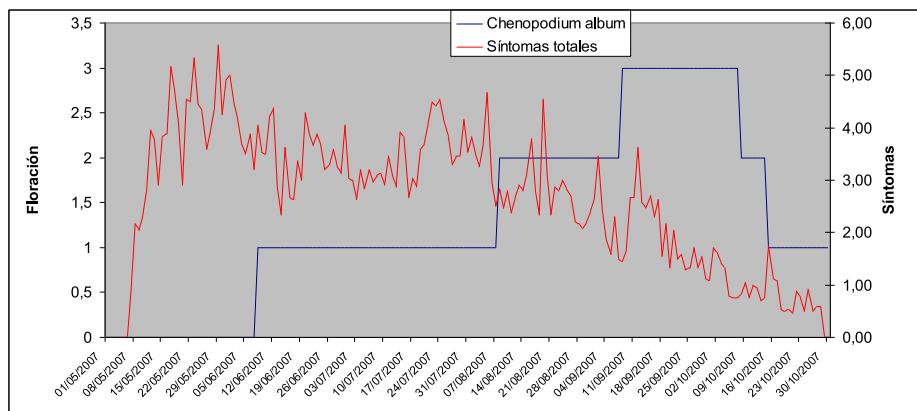


Figura 99. Se observan síntomas totales en rojo y floración de *C. album*

Salsola:

De las dos *Salsolas* estudiadas se observó como *S. kali* únicamente floreció los meses más cálidos, desde mediados de julio hasta las primeras semanas de septiembre, por lo que no justifica la totalidad de la sintomatología clínica que presentan los pacientes (figura 100). Si coinciden los picos sintomáticos con los picos de más floración en los meses centrales. Con el estudio de regresión linear multivariante para todo el periodo sintomático se obtuvo un valor de p no significativo de 0,317.

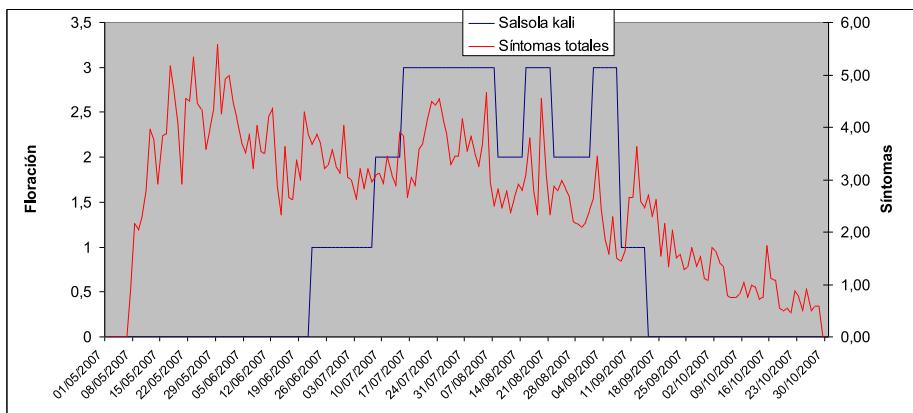


Figura 100. Correlación entre la sintomatología clínica de los pacientes del estudio en rojo y la floración de *S. kali* en azul.

S. vermiculata abarca un periodo más amplio en floración, pero igualmente no justifica los síntomas que presentan en el mes de mayo y junio y los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos ($p=0,299$) (figura 101).

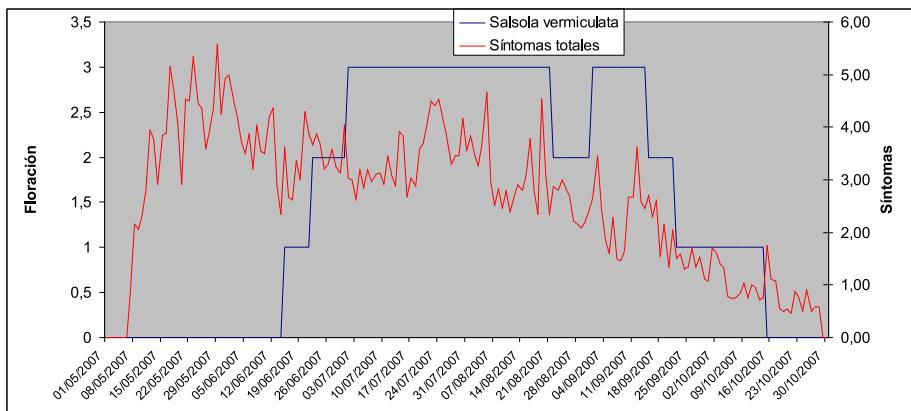


Figura 101. Correlación entre la sintomatología clínica de los pacientes del estudio en rojo y la floración de *S.vermiculata* en azul.

***Bassia scoparia*:**

La *B. scoparia* resultó ser una de las especies más abundantes y que mayor periodo sintomático se mantuvo en flor, sin embargo no se correlacionó la sintomatología con la floración y se obtuvo un valor de p no significativo de 0,653 (figura 102).

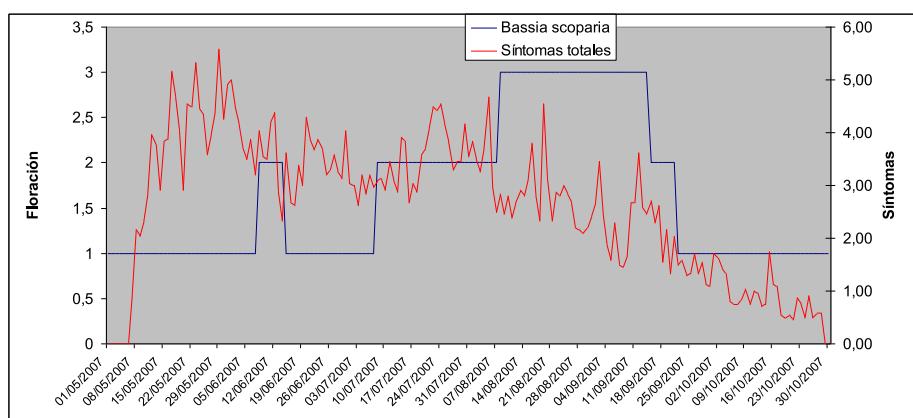


Figura 102. Correlación entre la sintomatología clínica de los pacientes del estudio en rojo y la floración de *B.scoparia* en azul.

 **Atriplex:**

Respecto a la *A. patula* se observó cómo no explica los síntomas hasta mediados de agosto, sin embargo si los justifica en los últimos 3 meses de estudio (figura 103) obteniendo un valor de p estadísticamente significativo de 0,031.

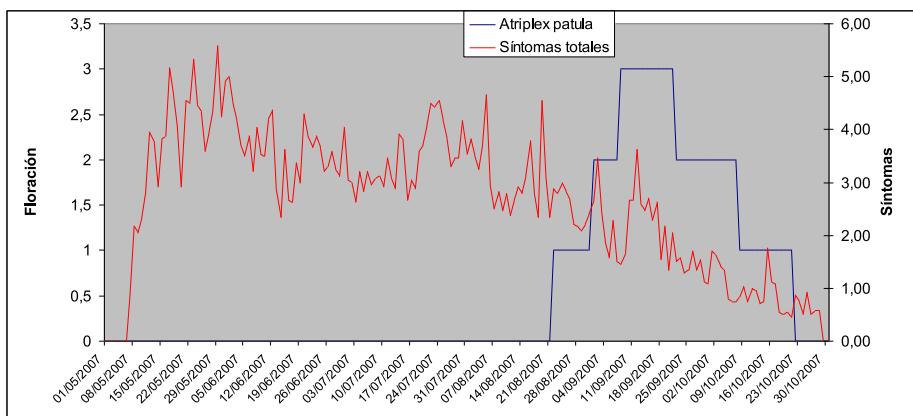


Figura 103. Correlación entre síntomas totales en rojo y floración de ***A. patula*** en azul.

A. halimus sólo floreció las últimas semanas del verano, final de agosto y septiembre y no coincidió con los síntomas generales, el valor de p fue de 0,335 (figura 104).

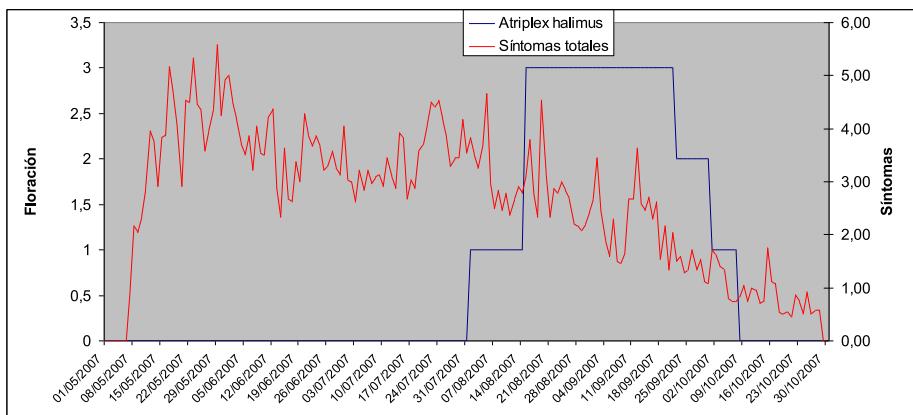


Figura 104. Correlación entre síntomas totales en rojo y floración de ***A. halimus*** en azul.

 **Amaranthaceae:**

Las dos *amaranthaceae* seguidas son especies en floración la casi práctica totalidad de los meses a estudio. Sin embargo, no se obtuvo correlación para ninguna de las especies comparándolas con la sintomatología de los pacientes. Se obtuvo un valor de p de 0,772 para *A. deflexus* (figura 105) y de 0,963 para el *A. muricatus* (figura 106).

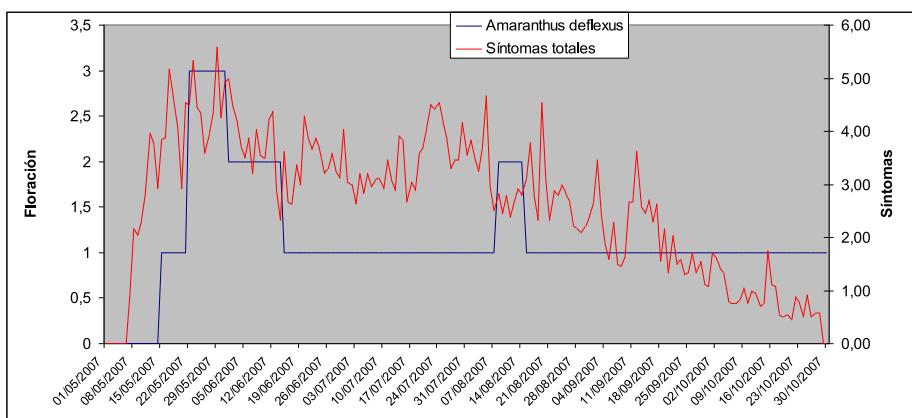


Figura 105. Observamos síntomas totales en rojo y floración de ***A. deflexus*** en azul.

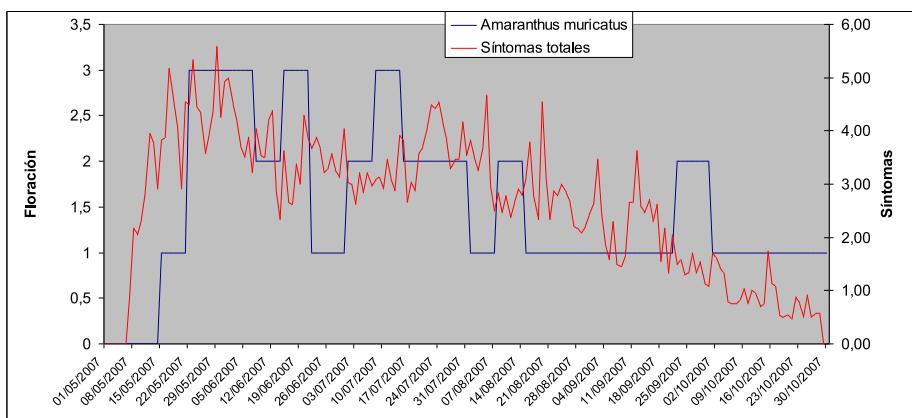


Figura 106. Observamos síntomas totales en rojo y floración de ***A. muricatus*** en azul.

Destaca que sólo dos especies de las estudiadas, *C. vulvaria* y *A. patula* presentaron correlación entre la floración y la sintomatología de los pacientes en los 6 meses a estudio; ahora bien, si se justifican los síntomas de los pacientes con la floración de algunos pólenes si abarcamos períodos concretos de estudio. Así por ejemplo, aunque *S. kali* no explica los síntomas los 6 meses, si coincide el aumento de síntomas en los meses de verano, con sus picos de floración. Lo mismo que pasaría con *S. vermiculatta*. Cabe destacar que no se observa ninguna correlación con *C. album* que va al revés de los síntomas de los pacientes. Ahora bien, en el análisis individual de cada uno de los pacientes por separado podemos encontrar patrones diferentes de síntomas y por lo tanto de sensibilización, que podría explicar estos resultados.

V. DISCUSIÓN

Discusión

La distribución geográfica del polen de las diferentes especies, está fuertemente influenciada por las condiciones geo-climáticas de la zona en la que nos encontramos, y ello contribuye al patrón de sensibilización de los pacientes⁶⁹.

La familia de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* se compone de alrededor de 180 géneros y 2500 especies vegetales. En los últimos años, el polen de estas malezas está adquiriendo una relevancia cada vez mayor como inductor de alergia ya que estas plantas son capaces de colonizar rápidamente los suelos salinos y áridos de zonas desertificadas^{70, 71}.

El aumento de la desertificación en el valle del Ebro, ha hecho que aumente considerablemente el crecimiento y expansión de plantas de la familia botánica de las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*. Estas plantas se incluyen tradicionalmente en el mismo grupo alergénico por su elevada reactividad cruzada, además de que ambas presentan similitudes botánicas, períodos de polinización coincidentes y la característica de presentar un polen indistinguible a microscopia óptica.

En la actualidad sobre todo *C. album* y *S. kali* en nuestra zona³, y más recientemente *S. oppositifolia* en el área mediterránea⁴⁶ y *A. retroflexus*^{72,73} en Irán han sido relacionadas con la producción de patología alérgica.

En este estudio se han descrito 11 especies taxonómicamente similares a las estudiadas hasta el momento, considerando finalmente a 8 especies de *Chenopodiaceae* y 2 *Amaranthaceae* como las más relevantes en el área de Zaragoza tanto en cantidad, como en expansión del nicho ecológico. Estas especies son *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *S. kali* y *S. vermiculatta*, destacando además esta última como una de las especies más frecuentes en cantidad y expansión; aunque posteriormente no se observó

correlación positiva comparándola con la sintomatología total de todos los pacientes en el año 2007. Las especies de *Salsola* seguidas sólo florecieron en los meses centrales del verano; sin embargo se observó que la mayoría de los pacientes presentaron síntomas durante los 6 meses a estudio y además fue al principio de estación en mayo-junio cuando el grado de síntomas fue más intenso, por lo que estas especies de *Salsola* no justifican la clínica, ni las concentraciones de polen total de los primeros meses de polen, a pesar de ser una de las especies más frecuentes de la zona. De las tres especies de *Chenopodium* estudiadas, tan solo una de ellas *C. vulvaria* justificó la clínica con una buena correlación durante toda la temporada polínica, no así en la correlación con la concentración de polen total. No se observaron ejemplares de *S. oppositifolia* especie ampliamente distribuida en otras zonas de la península y que recientemente ha sido estudiada por su relevancia alergénica⁴⁶. De aquí la importancia del conocimiento del medio en el que nos encontramos y del estudio de las especies más relevantes en cada zona, de cara a poder producir sensibilización a los pacientes y presentar relevancia clínica; ya que aunque en otras zonas de la península como el área del levante la especie de *S. oppositifolia* ha sido demostrada como una de las más relevantes con capacidad alergénica, no se han encontrado ejemplares en el área de Zaragoza, y únicamente son especies de zonas costeras más húmedas y con un hábitat diferente, y la positividad hallada en los pacientes tanto en la prueba cutánea como en la IgE específica demuestra sólo reactividad cruzada con otras especies. Se describen también ejemplares de *B. scoparia*, *A. patula*, *A. deflexus* y *A. muricatus* en el área a estudio. Tan sólo con el pico de floración de *A. patula* se observó correlación con clínica total de los pacientes en el último mes del estudio (septiembre), no así el resto de la temporada polínica.

En los últimos años diferentes observaciones clínicas han sugerido que los síntomas en pacientes sensibilizados a polen de *Chenopodiaceae* no siempre se correlacionaban perfectamente con el recuento de polen^{3, 4}. Se han publicado estudios donde se describe un decalaje entre la sintomatología clínica de los pacientes monosensibles a polen de *S. kali* y el periodo de polinización de estas especies; explicando este hecho por diferentes factores como podría ser el efecto “priming”⁷⁴ o por el hecho de que el polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* se obtiene del recuento de manera conjunta de polen de diferentes especies que no tienen por qué coincidir con el pico de polinización más alto obtenido de cada una de las especies. Recientes publicaciones han sugerido que otras especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, que polinizan en periodos diferentes podrían contribuir a los síntomas alérgicos^{46, 73}.

De acuerdo con estos resultados y nuestras observaciones clínicas nos propusimos estudiar el periodo de floración de cada una de las especies que fueran más representativas en nuestra área, así como correlacionarlo con la clínica de los pacientes monosensibles y con la concentración de polen medioambiental. Se seleccionaron 11 especies siguiendo las recomendaciones de S. Pike⁶⁴, J. Puente⁶⁵ y el Atlas virtual de Flora de Aragón⁶⁶ y fueron: *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *S. kali*, *S. vermiculatta*, *A. patula*, *A. halimus*, *B. scoparia*, *A. deflexus* y *A. muricatus*. Tan solo una especie fue incluida sin ser recomendada como representativa del área y fue *S. oppositifolia* que se incluyó por la relevancia demostrada en otras áreas de la península tal y como se ha explicado con anterioridad y que finalmente no se pudo seguir al no encontrar ejemplares en el área a estudio de Zaragoza.

Floración y sintomatología clínica:

Se describe la correlación entre la sintomatología clínica y floración de numerosas especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* que no han sido descritas previamente como causantes de enfermedad alérgica.

De todas ellas tan sólo en dos de las especies estudiadas se obtuvo una correlación positiva para todo el periodo sintomático. Estas especies fueron *C. vulvaria* y *A. patula*.

Siguiendo los picos de floración de *C. vulvaria* es la única especie que encajó con todo el periodo sintomático de los pacientes, ya que comenzó a florecer en mayo, dando picos a lo largo de los meses de julio, agosto y septiembre, finalizando su floración en octubre, al igual que la evolución clínica de los pacientes.

A. patula, sin embargo justificó los síntomas sólo en septiembre, que es cuando presenta el grado más alto de floración obteniéndose significación estadística, pero no justificó el resto de los meses sintomáticos. Probablemente aunque sólo se ha encontrado correlación con estas dos especies, los síntomas son consecuencia de la floración continua de diferentes especies que se van solapando en la floración una con la otra. La elevada reactividad cruzada entre todas estas especies justifica la sensibilidad frente a muchas de ellas, sobre todo si comparten panalérgenos comunes. Estos resultados nos ayudan a dilucidar porque los pacientes presentan síntomas de manera tan temprana en mayo-junio, cuando las especies habitualmente estudiadas como *S. kali* o *C. album* todavía no han entrado en flor. Probablemente todas comparten alérgenos comunes capaces de producir síntomas ya desde el inicio de la floración de otras especies en pacientes sensibilizados a estas familias, sin ser sólo *S. kali* o *C. album* las especies responsables en ese momento.

La prevalencia de sensibilización a *S. kali* en nuestro medio ha sido estimada de alrededor del 42%, y representa el tercer polen en importancia en nuestro área, después del polen de Gramíneas y Olivo^{75, 76}. Sin embargo, como ya se ha comentado, se ha observado en este estudio que su periodo de floración abarca tan solo los meses centrales de julio y agosto, con un pico a principios de septiembre, los dos años consecutivos del estudio, no correlacionándose con los síntomas de la mayoría de los pacientes que comienzan en mayo/junio y persisten hasta octubre, periodos donde *S. kali* todavía está en estado vegetativo. Si bien es cierto que la mayoría de los pacientes presentaron síntomas los 6 meses de estudio, se observó diferentes patrones de sensibilización clínica, y se observó en una minoría de los pacientes que sólo presentaron síntomas los meses centrales de julio y agosto (24,5% de los pacientes estudiados), correlacionándose en estos casos concretos la floración de *S. kali* con su sintomatología.

C. album es otra de las especies relacionadas durante años con producción de patología alérgica en pacientes sensibilizados a polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* y es comúnmente, junto con *S. kali*, utilizada en el diagnóstico y tratamiento³. Sin embargo, se observó en este estudio que no tenía correlación con la clínica de los pacientes, dando además su pico de floración sobre todo al final de la temporada polínica, septiembre, justo al revés que el patrón clínico que siguieron los pacientes.

El resto de especies seguidas *C. murale*, *S. vermiculatta*, *A. halimus*, *B. scoparia*, *A. deflexus* y *A. muricatus* se fueron sucediendo a lo largo de los meses en su floración sin coincidir sus patrones de floración con los síntomas de nuestros pacientes.

Estudio “in vivo” e “in vitro”

Para evaluar la importancia de la sensibilización de estas especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, se prepararon extractos para pruebas cutáneas en prick test para las 11 especies a estudio y se testaron en todos los pacientes. Sorprendentemente, y en vez de mostrar perfiles antigenicos diferentes con los diferentes extractos alergénicos, todos los individuos presentaron pruebas cutáneas positivas frente a todas las especies estudiadas.

Este resultado podría explicar la elevada reactividad cruzada que presentan estas especies^{77,45}, compartiendo alérgenos comunes en sus extractos, que son los responsables de que todos nuestros pacientes presentaran pruebas positivas en mayor o menor medida. Aunque los alérgenos mayores han sido descritos y analizados en diferentes trabajos sólo para *S. kali*, *C. album* y *A. retroflexus*; un alto grado de reactividad cruzada entre alérgenos de la familia de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* ha sido demostrada desde hace más de 2 décadas³¹. Hasta ahora, sólo *Che a1*, y *Sal k5* como homólogos de *Ole e1* y *Che a2*, *Sal k4* y *Ama r2*, como profilinas han sido descritos como alérgenos comunes de estas especies; pero probablemente existan más alérgenos comunes que todavía son desconocidos.

Cabe destacar que dos especies *S. kali* y *A. halimus* obtuvieron los tamaños de pápula más altos con diámetros de alrededor de 70 mm², mientras que *C. murale* y *S. vermiculata* obtuvieron los valores más bajos con 30 mm². Dado que la cantidad de contenido proteico fue similar para todos los extractos preparados, por encima de 75µg de contenido proteico por mg de liofilizado, este resultado se podría deber al hecho de que tanto *S. kali* como *A. halimus* son extractos donde destacan alérgenos de elevado peso molecular, mientras que en los que muestran menos pápula destacan alérgenos de

bajo peso molecular, quizás solo responsables de contener panalergenos que nos muestran además reactividad cruzada con el resto de las especies.

Todas las especies presentaron capacidad de inhibir a la IgE con bandas comunes, sobre todo a expensas de bandas con pesos moleculares medios y altos, de alrededor de 43, 60 y 66 KDa aproximadamente, lo que sugiere de nuevo, elevada reactividad cruzada entre todas estas especies por alérgenos comunes. El alérgeno mayoritario de *S. kali*, *Sal k1*, recientemente medido en granos de polen y extractos alergénicos, con un peso molecular de alrededor de 35 a 45 KDa⁴⁵, parece ser uno de los alérgenos más importantes implicados en la sensibilización de *S. kali*, y también está presente en otras especies de *Chenopodiaceas*, como hemos podido demostrar observando bandas de aproximadamente 43 kDa en todos los extractos, que posiblemente implica que presentan bandas comunes con el grupo de *Sal k1*.

Sin embargo, la sensibilización frente a *C. album* está principalmente mediada por alérgenos de más bajo peso molecular, de entorno a 10-20 KDa.

Por lo tanto, el perfil alergénico reveló diferentes patrones de reconocimiento en las especies estudiadas. Todas las especies reconocen bandas similares de elevado PM de aproximadamente 43-60 kDa; sin embargo el reconocimiento de bandas de bajo PM varía significativamente entre las especies.

Estos resultados demuestran la capacidad diagnóstica de estos extractos de polen y sugieren el potencial alergénico de las especies testadas. Sin embargo, son necesarios más estudios para conocer la reactividad cruzada entre especies y dilucidar sus similitudes y diferencias.

Los valores obtenidos frente a IgE en los 11 extractos no resultaron muy elevados, sin llegar a sobrepasar los 35 ku/l. *S. kali* y *A. halimus* fueron las dos especies

los que presentaron los valores más altos, al igual que sucedió con las pruebas cutáneas y que podría justificarse por los mismos motivos anteriormente descritos.

Concentración de polen total y sintomatología clínica.

Para esclarecer los resultados es muy importante la correlación positiva que se observó entre la concentración de polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* y la sintomatología clínica. La mayoría de los pacientes presentaron síntomas los 6 meses del estudio, ofreciendo los valores más altos de la escala de síntomas al inicio de la estación polínica en el mes de mayo, para mantenerse constante en julio y agosto e ir disminuyendo hasta desaparecer el octubre, correlacionándose bien con la concentración ambiental de polen, con pequeños decalajes de 2-3 días, tal y como se observó en otros trabajos publicados con las *Chenopodiaceae*⁴ e incluso con otras familias de plantas como las Gramíneas⁷⁸. Sin embargo, como he comentado anteriormente, se encontraron también patrones de sensibilización diferentes y aunque, si bien es cierto que la mayoría de nuestros pacientes son sintomáticos los 6 meses de estudio, existe un pequeño porcentaje que únicamente presentan síntomas en los meses de julio y agosto (24.5%), con una buena correlación con la concentración de polen medioambiental sólo en esos meses. Una posible hipótesis de este fenómeno podría ser el hecho de que este pequeño porcentaje de pacientes este sensibilizado sólo frente a alérgenos específicos de especies que polinizan sólo en los meses centrales de verano como por ejemplo *S. kali*, y no frente a otros panalérgenos comunes presentes también en otras especies y por lo tanto reconozcan solo alérgenos de una especie en concreto.

Conclusiones similares se pueden extraer con la determinación de óxido nítrico exhalado y la concentración de polen, donde se observó correlación significativa, aumentando los valores de óxido nítrico conforme aumentaba la concentración de polen medioambiental, lo que apoya que los aumentos de polen se correlacionan con aumento de la inflamación eosinofílica. Sin embargo no se observó correlación con los síntomas de asma en nuestros pacientes, probablemente porque tan solo un pequeño número de pacientes presentaban clínica de hiperreactividad bronquial.

Cabe destacar que el estudio se inició con 60 pacientes, todos ellos monosensibles a polen de *Chenopodiaceae*, con gran dificultad en su reclutamiento, dado que la mayoría de los pacientes presentan co-sensibilizaciones en nuestra área. De estos 60, tan sólo 37 llegaron a concluir el estudio. Las causas de abandono fueron sobre todo la falta de cumplimentación de los cuadernillos (8) que debían realizar a diario y la no asistencia a las visitas programadas (8), que al menos se precisaban de 4 al año, además de los traslados a otras ciudades (5) y la incompatibilidad laboral (2). La dificultad en encontrar pacientes con estas características y el estudio complejo a la hora de valorar sintomatología hace complicado la realización de estudios para poder conocer mejor las características clínicas y alergénicas en este grupo de pacientes.

Floración y concentración de polen medioambiental total.

El grado de floración se estudió con dos métodos de cuantificación diferentes, ambos superponibles por los resultados obtenidos en el grado de floración de cada especie los dos años consecutivos del estudio. El método general de observación visual más sencillo y que se realizó con las 10 especies seguidas en la zona y un método semicuantitativo a través de una técnica botánica (previamente diseñado por Orshan⁶⁷

en 1989) que por primera vez se ha aplicado para el estudio de patología alérgica⁵⁷. La floración de las especies se correlacionó no sólo con la concentración de polen medioambiental, sino también con la clínica de nuestros pacientes. Aunque con este método no obtenemos la concentración exacta de polen medioambiental; los resultados nos aportan información complementaria muy útil y novedosa sobre el estudio del pico de polen de cada una de estas especies, de cara a conocer su relevancia en el área. Tan solo otro estudio sobre fenología, en este caso realizado con la familia botánica de las gramíneas, expone la utilidad en conocer el grado de floración y la polinización para esclarecer las especies más relevantes de cada área⁷⁸. En este trabajo el calendario polínico obtenido por el grupo de los autores italianos con el polen de gramíneas fue similar en las 3 áreas estudiadas, con diferencias de una o dos semanas entre cada una de las tres zonas seguidas; en el norte se obtuvo la mayor semana de polen la tercera semana de mayo, en el centro la primera y en el sur la cuarta semana. Sin embargo, observando las lecturas de la fenología de las especies, no todas ellas florecieron en el periodo de máxima concentración de polen. De hecho, especies tan importantes como *P. pratense* floreció en la zona norte y centro, después del pico polínico y lo mismo sucedió con *C. dactylon* en todo el territorio. En contra, la floración de especies como *P. bulbosa* y *B. sterilis* precedían a los picos polínicos sin variabilidad entre las zonas. Como consecuencia, el pico de polen es debido a algunas y no todas las especies de gramíneas, y de hecho se observó como el pico de polinización de algunas especies se produce fuera del pico polínico total. Resultados similares se observaron en nuestro estudio donde especies tan importantes como *S. kali* dieron su pico de polinización sólo en los meses de julio y agosto, coincidiendo en esos meses con el recuento total de polen, pero no coincidiendo con los recuentos previos, obtenidos en mayo, junio, o los

posteriores, en septiembre. Del mismo modo *C. album* ofreció su pico polínico en septiembre, después del pico en el recuento total de polen. Por otro lado, otras especies como *C. vulvaria* que se correlacionaron bien con la clínica de los pacientes, no presentaron correlación cuando se comparo sus picos de floración con la concentración de polen medioambiental total. Una posible explicación podría ser el hecho de que presente alérgenos específicos de esta especie capaces de inducir clínica, sin tener porque coincidir con el recuento de polen total.

En este trabajo de Frenguelli et cols. se correlacionó sólo polen atmosférico y floración de 12 especies de gramíneas, sin correlacionarlo con la clínica de los pacientes, ni realizar estudios complementarios “*in vitro*”, ni “*in vivo*” de las especies. Ahora bien, también en este trabajo se dilucidó que las diferentes especies de gramíneas florecen en tiempos diferentes a lo largo de la estación polínica y no todas las especies fueron responsables de los picos de polen atmosférico. Se observó de hecho cómo especies conocidas hasta la fecha como más relevantes en la zona, producían su pico de polinización fuera del pico contabilizado en la estación. Estos resultados fueron también observados en nuestro trabajo, donde la floración de las especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* se iba sucediendo a lo largo de los 6 meses de seguimiento, y los picos de muchas de ellas no eran superponibles en su mayoría a los picos de polen medioambiental.

El estudio de la fenología de las especies aporta información novedosa y relevante, como también comentaron Frenguelli y Passalacqua en su trabajo, a la hora de interpretar los patrones anuales de síntomas de los pacientes y pueden explicar algunos fenómenos como el decalaje observado entre síntomas y concentración de polen en algunos estudios o la discrepancia que se observa en ocasiones entre los

síntomas de los pacientes que no coinciden con los picos de polen atmosférico, observando en ocasiones sintomatología respiratoria grave con recuentos de polen bajos o incluso nulos.

El resultado más significativo de nuestro trabajo se obtuvo observando el grado de floración de las especies de *Salsola* (*S. kali* y *S. vermiculata*), consideradas hasta la fecha como una de las especies más relevantes, que florecieron sólo en los meses más cálidos de julio y agosto, sobreponiéndose a la floración de otras especies como *A. halimus*, *A. patula*, *B. scoparia*, *C. album*, *C. vulvaria* y *C. murale*. Ahora bien, sí coincidió la floración de estas dos especies de *Salsola* seguidas con los dos picos observados en el recuento polínico en esos dos meses centrales, pero no justifican los previos de los meses de mayo y junio, ni el posterior de septiembre. Por lo tanto, parece ser que no sólo el polen de *S. kali* o *S. vermiculata* son los responsables de producir patología alérgica. La concentración de polen detectado en los meses de mayo/junio y septiembre/octubre no se corresponden con la floración de estas especies de *Salsola* estudiadas, al igual que sucede con la sintomatología clínica de los pacientes, por lo que concluimos que estas concentraciones de polen deben corresponder a otras especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, apoyándose la idea que otras especies pueden ser responsables de la sensibilización y de la patología alérgica en estos meses.

Destaca también el resultado que se obtuvo con *C. album*, especie que dio su pico de floración sobre todo en el mes de septiembre, y tampoco coincidió con el pico de polen medioambiental, ni se correlacionó con la sintomatología clínica de los pacientes.

Especies como *A. deflexus*, *A. muricatus* o *C. vulvaria*, las cuales comienzan a florecer a lo largo del mes de mayo, pueden ser responsables de la polinización en ese

periodo, en la que se detectan ya granos de polen y además los pacientes comienzan a presentar síntomas.

El polen que se detectó en Junio podría corresponder a *C. album* o *B. scoparia*. A final de septiembre y principios de octubre la concentración de polen se corresponde con la floración de *C. album*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *A. halimus*, *A. patula*, *A. deflexus* o *A. muricatus* y podría explicarlo.

Como consecuencia, la detección de granos de polen entre mayo y octubre parece corresponder a la sucesión de la floración de diferentes especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, explicando así también la sintomatología alérgica durante todo el periodo sintomático.

Cabe destacar que se siguió la concentración de polen y el grado de floración de las especies en dos años consecutivos, 2007 y 2008 y los resultados que se obtuvieron fueron muy similares, obteniendo los picos de polen de manera similar en las dos temporadas estudiadas, con diferencias como máximo de 5 a 7 días entre un año y el consecutivo. Sucedió lo mismo con la floración, las 10 especies florecieron prácticamente las mismas semanas y con el mismo grado de floración en los 2 años 2007 y 2008. Estos resultados demuestran la consistencia de ambos métodos.

Recientes estudios publicados han sugerido la existencia de partículas alergénicas en el ambiente que podrían explicar la existencia de síntomas alérgicos fuera de la estación polínica^{79, 80}. Sin rechazar esta posibilidad, en el caso del polen de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* y de nuestros pacientes, los síntomas se restringen al periodo entre mayo y octubre permaneciendo asintomáticos fuera de la estación polínica.

El estudio del grado de floración parece ser un método eficiente y complementario para correlacionar la concentración de polen de las diferentes especies que presentan un polen indistinguible a microscopía óptica y puede ser una herramienta útil para correlacionar síntomas alérgicos con floración o con concentración de polen atmosférico. El análisis fenológico también es principalmente relevante y utilizado para evaluar los efectos de los cambios climáticos en los ecosistemas⁸¹, y puede representar una herramienta especialmente útil para evaluar la verdadera exposición a polen de Chenopodiaceae/Amaranthaceae. Ahora bien a pesar de la gran información que nos aporta este método frente al convencional, es una técnica laboriosa que precisa de personal entrenado en el reconocimiento y clasificación de las especies y que requiere de un trabajo de campo minucioso y detallado, con múltiples traslados a las zonas de hábitat de las especies seleccionadas para ver su evolución, y de manera semanal, lo que resulta complejo para establecer como análisis de rutina; por lo que estudios más sencillos son necesarios para poder contar con esta valiosa información de una manera más sencilla.

Los resultados a través del estudio de la fenología muestran como varias especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, dan sus granos de polen en diferentes tiempos a lo largo de la estación polínica, mientras que el método de recolección de polen tradicional no distingue entre especies aportando sólo información parcial e incompleta. Por lo tanto, más estudios fenológicos de las especies de polen aportarían datos útiles en áreas geográficas, comparando con la clínica de los pacientes, de cara a fortalecer las observaciones aportadas.

En resumen, con este estudio se confirma que no sólo contribuyen *S. kali* y *C. album* en producir patología alérgica en pacientes monosensibles a

Chenopodiaceae/Amaranthaceae en nuestra área; sino que también pueden contribuir otras especies de estas familias, y en especial *C. vulvaria* y *A. patula*.

Aunque todas las especies presentan elevada reactividad cruzada, no todas las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* tienen completa reactividad cruzada, observando que cada uno de los 11 extractos comparte similitudes pero también diferencias que los distingue. Esto es de gran importancia de cara a seleccionar un adecuado diagnóstico y posteriormente una adecuado tratamiento alérgeno-específico, donde debería de contenerse en principio todos los alérgenos relevantes frente a los que este sensibilizado cada individuo en particular.

El estudio que nos aporta el conocimiento de la fenología de las especies puede ser también útil de cara a seleccionar un adecuado test diagnóstico en determinadas áreas geográficas.

De acuerdo con nuestra experiencia y con los resultados obtenidos, nosotros sugerimos la inclusión de *S. vermiculata*, *C. vulvaria*, *C. murale*, *A. patula* y *B. scoparia* en la batería común de aeroalérgenos para el diagnóstico en nuestra área.

Aunque la implicación clínica exacta no ha sido demostrada una por una, ni la reactividad cruzada confirmada, nuestros resultados demuestran la importancia de otras especies como agentes sensibilizantes, sin embargo más estudios son necesarios para conocer con detalle la reactividad cruzada entre estas especies, sus alérgenos más relevantes y las especies más importantes en cada área a estudio, para poder llevar a cabo un diagnóstico más preciso y con ello un tratamiento más eficaz.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El estudio del grado de floración resulta una herramienta novedosa y complementaria para poder correlacionar concentración de polen y clínica en especies que presentan un polen indistinguible a microscopía óptica.
2. Todas las especies reconocieron proteínas de elevado MW de alrededor de 43, 60 y 66 KDa. Algunas especies como *C. vulvaria*, *C. murale*, *S. oppositifolia*, *B. scoparia* y los *Amaranthus* reconocen además proteínas de más bajo peso molecular, mostrando un perfil proteico diferente y específico para cada una de las especies.
3. Todos los pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas frente a las 11 especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*.
4. Todos los pacientes salvo uno, reconocieron IgE frente a todas las *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* estudiadas.
5. La mayoría de los pacientes presentaron síntomas los 6 meses a estudio, de Mayo a Octubre, observando una correlación positiva con la concentración de polen medioambiental.
6. La floración de *C. album* no guarda relación con los síntomas de los pacientes.
7. La floración de las especies de *Salsola* no justifican todo el periodo sintomático de los pacientes, por lo que deben considerarse otras especies de *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* como responsables también de los síntomas.
8. Se han estudiado nuevas especies como *A. patula* o *C. vulvaria*, que se correlacionan bien con los síntomas.

9. La detección de granos de polen desde Mayo a Octubre parece corresponder a la sucesión de la floración de las diferentes especies, lo que podría explicar el amplio periodo sintomático de la mayoría de nuestros pacientes.
10. Es muy importante el conocimiento del medio en el que viven nuestros pacientes para el mejor estudio y diagnóstico de su alergia respiratoria. En nuestra área sugerimos la inclusión de algunas especies además de *S. kali* y *C. album*, como *C. vulvaria*, *S. vermiculata*, *A. patula*, y *B. scoparia* en la batería común de aeroalérgenos.

VII. ANEXOS

Anexo I

2. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE SOBRE EL ESTUDIO.

A continuación se detallan los aspectos del estudio que son de interés para usted:

Se le propone participar en un estudio de ámbito regional, propuesto por el servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, en el que se controlara a los pacientes alérgicos a polen de *Salsola* durante 6 meses, para conocer mejor su sintomatología y valorar la correlación con la concentración de polen en el ambiente.

El beneficio que usted conseguirá, en caso de participar, será que estará controlado con una mayor precisión y un mejor seguimiento durante 6 meses. Para ello se le solicita que acuda regularmente a las 5-6 visitas que le va a programar su médico especialista de alergología. Estas visitas tendrán lugar al inicio, a los 15 días, al mes, 4, 5 y 6 meses. Durante estas visitas en el servicio de alergia, su médico le controlará los síntomas y se le realizaran pruebas cutáneas mediante prick test a batería estándar de aeroalergenos que habitualmente se testan en la consulta, con el fin de conocer exactamente su sensibilización, así como espirometría en el caso de precisarlo por tratarse de patología asmática. Usted le contará sus problemas, si los tiene, con la medicación que esté tomando.

En el caso que sus síntomas no se controlen, su médico le aumentará la medicación, para conseguir un buen control. Los fármacos que su médico le indicará, son eficaces y con buena tolerancia, como han demostrado numerosos estudios, estando universalmente aceptado su uso para el tratamiento de la rinitis, siendo de elección para usted y usado habitualmente en numerosos pacientes como usted.

Su participación es voluntaria y toda la información obtenida será tratada confidencialmente de conformidad con la Ley 15/1999 de protección de datos personales.

Sus datos permanecerán en formato papel hasta la finalización del Estudio siendo posteriormente destruidos. Sus datos se documentarán antes de su destrucción de manera anónima y se identificarán mediante un número, sus iniciales y la fecha de nacimiento en una base de datos informatizada, de modo que la información que se obtenga de los mismos no pueda asociarse a persona

identificada o identifiable. Su médico personal será el único que conozca sus datos personales y adoptará las medidas oportunas para evitar su acceso a terceros no autorizados.

Los Cuadernos de Recogida de Datos solo estarán disponibles a representantes autorizados o autoridades sanitarias apropiadas. En ningún caso estarán disponibles para terceras personas. Las personas autorizadas para su uso (médico personal, investigador principal) se comprometen a mantener la confidencialidad de sus datos personales.

Ayúdenos a conocer diferentes aspectos del tratamiento.

Si precisa más información, por favor pregunte a su médico: Dr/a. ***Lucía Ferrer***

Clavería.....

Centro de Salud:Teléfono.....

Anexo II

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,.....

(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:

(Nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio:

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

De igual modo declaro haber sido informado de las medidas que serán adoptadas en aras a garantizar la confidencialidad y disociación de cuanta información sobre mi persona pudiere recogerse durante el desarrollo del estudio, así como de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento.

Acepto que mis datos personales (nombre, edad, sexo, domicilio, teléfono, móvil) sean conocidos únicamente por los investigadores y personal autorizado por estos para la realización del estudio, y utilizados según el protocolo del Estudio. Mis datos personales serán disociados, antes de su destrucción, de modo que la información que se obtenga de los mismos no pueda asociarse a persona identificada o identificable. Solamente mi médico personal conocerá mis datos personales y adoptará las medidas oportunas para evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados.

Acepto y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha ____/____/_____

día mes año

Fecha ____/____/_____

día mes año

Firma del paciente

Firma del investigador

Anexo III- Informe de aprobación del protocolo del estudio



Departamento de Salud y Consumo

CEIC Aragón (CEICA)

Informe Dictamen Protocolo Favorable

C.P. - C.I. PI07/24

08 de agosto de 2008

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que este Comité en su reunión de 6 de agosto de 2008, correspondiente al Acta nº CP06/08/2008, ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: Correlación entre la clínica y la concentración de polen de Chenopodiaceas en la ciudad de Zaragoza (estudio EPOSAL)

Investigador: Lucía Ferrer Clavería

Versión Protocolo: mayo de 2007

Versión Hoja Información al Paciente: V1 de 01/05/07

2º. Considera que

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

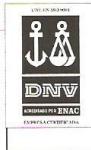
3º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Lo que firmo en Zaragoza, a 08 de agosto de 2008

Fdo:



Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)



Página 1 de 1

Anexo IV- Informe de viabilidad de proyectos de investigación



Departamento de Salud y Consumo



Instituto Aragonés
de Ciencias de la Salud

COMISION DE INVESTIGACION

INFORME DE VIABILIDAD DE PROYECTOS DE INVESTIGACION

El proyecto titulado: **Correlación entre la clínica y la concentración de polen de Chenopodiaceas en la ciudad de Zaragoza (estudio EPOSAL)**, cuyo investigador principal es **Lucía Ferrer Clavería**, ha sido presentado para su evaluación por parte de esta Comisión de Investigación que, una vez evaluado, considera que:

- La hipótesis y los objetivos son claros, concretos y con posibilidades de avance en el área de conocimiento en que se enmarca.
- La metodología es correcta, adecuada a los objetivos y bien planteada en sus distintos aspectos.
- La factibilidad es alta, dada la consistencia del grupo investigador, su trayectoria investigadora y su experiencia en esta línea.
- La relevancia científica y sanitaria prevista es importante.

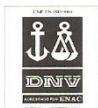
Por todo ello, esta Comisión de Investigación considera que el proyecto es **viable**,



Zaragoza, a 28 de julio de 2008

Alexandra Prados Torres

Presidenta Comisión Investigación



Anexo V-Cartilla de registro de síntomas

iniciales

número:

fecha 1^{er} día:

fecha 7º día:

1

1^{er} día 2º día 3º día 4º día 5º día 6º día 7º día

¿Ha tenido **síntomas**

hoy durante el **día** ?
si/no *si/no* *si/no* *si/no* *si/no* *si/no* *si/no*

¿Ha tenido **síntomas**

hoy durante la **noche** ?
si/no *si/no* *si/no* *si/no* *si/no* *si/no* *si/no*

2 En caso de que haya tenido síntomas, escriba cada 0,1 ó 2 ó 3 en cada casilla del siguiente cuadro, valorando la cuantía de los mismos según se indica a continuación:

0 NINGUNO	→ Sin síntoma
1 LEVE	→ Trivial, el síntoma está presente pero no es molesto
2 MODERADO	→ Molesto, pero <u>no</u> interfiere en su actividad diaria
3 GRAVE	→ <u>Sí</u> interfiere en su actividad diaria

	1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día	4 ^o día	5 ^o día	6 ^º día	7 ^º día
Estornudos	Día Noche						
hidrurrea (agüillita)	Día Noche						
obstrucción nasal (atasco)	Día Noche						
picor nasal	Día Noche						
picor ocular	Día Noche						
lagrimed	Día Noche						
tos	Día Noche						
pitos en el pecho	Día Noche						
ahogo en el pecho	Día Noche						
otro:	Día Noche						
otro:	Día Noche						

Anexo VI- Cartilla de recogida de puntuación de medicación

[3] ¿Ha necesitado emplear hoy la medicación prescrita por su médico?																																																																																	
ción	NO ⇒ escriba 0 (cero) en las casillas correspondientes del siguiente cuadro.																																																																																
	Sí ⇒ escriba en las casillas correspondientes el NUMERO de comprimidos, cápsulas, inhalaciones, gotas, etc que haya utilizado ese día.																																																																																
↓	Marque con una <input type="checkbox"/> Marque con una <input type="checkbox"/>																																																																																
	1º dia 2º dia 3º dia 4º dia 5º dia 6º dia 7º dia																																																																																
	<table border="1"><tr><td>Clarityne (comprimidos) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Stopcold (cápsulas) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Nasa cort (inhalador) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Afluon (colirio) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Pulmicort Turbuhaler (inh.) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Dacortín (comprimidos) ⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>⇒</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>	Clarityne (comprimidos) ⇒								Stopcold (cápsulas) ⇒								Nasa cort (inhalador) ⇒								Afluon (colirio) ⇒								Pulmicort Turbuhaler (inh.) ⇒								Dacortín (comprimidos) ⇒								⇒								⇒								⇒								⇒							
Clarityne (comprimidos) ⇒																																																																																	
Stopcold (cápsulas) ⇒																																																																																	
Nasa cort (inhalador) ⇒																																																																																	
Afluon (colirio) ⇒																																																																																	
Pulmicort Turbuhaler (inh.) ⇒																																																																																	
Dacortín (comprimidos) ⇒																																																																																	
⇒																																																																																	
⇒																																																																																	
⇒																																																																																	
⇒																																																																																	
[4] En caso de que padezca asma																																																																																	
Por favor, escriba la mejor medida de tres obtenida con el medidor de PICO-FLUJO, durante el día y por la noche.																																																																																	
PICO-FLUJO (L/min)																																																																																	
	1º dia 2º dia 3º dia 4º dia 5º dia 6º dia 7º dia																																																																																
Día	<table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>																																																																																
Noche	<table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>																																																																																

Anexo VII-Plantilla de recogida de pruebas cutáneas

<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Histamina</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Salsola Kali</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Salsola Vermiculata</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Salsola Oppositifolia</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Chenopodium Album</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Chenopodium Vulvaria</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Chenopodium Murale</i>		
área (mm ²)					
<table border="1"><tr><td>área (mm²)</td></tr><tr><td></td></tr></table>	área (mm ²)		<i>Atriplex Halimus</i>		
área (mm ²)					

área (mm ²)

Amaranthus Muricatus

área (mm ²)

Amaranthus Deflexus

área (mm ²)

Atriplex Patula

área (mm ²)

Basia Scorapia

Anexo VIII. Especies de Chenopodiaceae/Amaranthaceae (S. Pike, J. Puente, Atlas)

	ZGOZA S. Pike	Valle del Ebro			
		J. Puente		Atlas	
<i>Atriplex halimus</i>	F	x		CC	V-X
<i>Atriplex patula</i>	F	x	VII-IX	C	VII-IX
<i>Atriplex prostrata</i>	C	x		F	VI-IX
<i>Atriplex rosea</i>	D	x		F	VII-IX
<i>Atriplex semibaccata</i>	RR				
<i>Atriplex tornabenei</i>	RR				
<i>Bassia scoparia</i>	C	x	VII-VIII	F	VIII-X
<i>Beta vulgaris</i>	F	x	IV-V	R	IV-IX
<i>Beta maritima</i>	D	x	IV-V	F	IV-IX
<i>Camphorosma monspeliacana</i>	F	x		F	VII-X
<i>Chenopodium album</i>	C	x	VI-XII	C	V-XII
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	F	x		F	V-XII
<i>Chenopodium botrys</i>	R				
<i>Chenopodium chenopodioides</i>	R				
<i>Chenopodium ficifolium</i>	RR				
<i>Chenopodium glaucum</i>	F	x	VII-IX	E	VI-IX
<i>Chenopodium multifidum</i>	D			R	VII-X
<i>Chenopodium murale</i>	F	x	V-XII	E	I-XII
<i>Chenopodium opulifolium</i>	F	x	VII-VIII	F	IV-XI
<i>Chenopodium striatiforme</i>	R				
<i>Chenopodium urbicum</i>	RR				
<i>Chenopodium vulvaria</i>	F	x	VI-XI	F	V-X
<i>Halopeplis amplexicaulis</i>	RR	x			
<i>Kraschenninikovia ceratoidea</i>	RR	x			
<i>Microcnemum coralloides</i>	RR	x			
<i>Salicornia europaea/S. patula</i>	RR	x			
<i>Salsola kali</i>	C	x		C	VIII-X
<i>Salsola vermiculata</i>	C	x		C	VII-X
<i>Suaeda spicata</i>	R				
<i>Suaeda vera</i>	D	x		C	III-X
<i>Amaranthus albus</i>	R			E	V-XII
<i>Amaranthus blitoides</i>	C	x	VI-XII	F	IV-I
<i>Amaranthus blitum</i>	RR				
<i>Amaranthus blitum emarginatus</i>	D	x	VII-VIII	RR	VI-IX
<i>Amaranthus deflexus</i>	C	x	V-XI	E	V-I
<i>Amaranthus graecizans</i>	D			E	VI-XII
<i>Amaranthus hybridus bouchonni</i>	D			RR	VI-XI
<i>Amaranthus h. cruentus</i>	F			RR	V-XII
<i>Amaranthus h. hypochondriacus</i>	R				
<i>Amaranthus muricatus</i>	C	x	VI-XI	E	IV-I
<i>Amaranthus retroflexus</i>	C	x	VI-XII	F	V-I
<i>Amaranthus viridis</i>	R				

Abundancia S. Pike

Abundancia H. Jaca

C>F>D>R>RR

CC>C>F>E>R>RR

Bibliografía

¹ www.mma.es

² Ge-lin Z. Origin, Differentiation, and Geographic Distribution of the *Chenopodiaceae*. Acta Phytotax Sin 1995; 34: 486 -504.

³ Colas C, Monzón S, Venturini M, Lezaun A. Double-blind placebo-controlled study with a modified-therapeutic vaccine of *Salsola kali* (*Russian thistle*) administered through use of a cluster schedule. J Allergy Clin Immunol.2006 April 117 (4): 810-816.

⁴ Colas C, Monzón S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, Fernandez-Caldas E. Correlation between *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* pollen counts and allergic symptoms in *Salsola kali* monosensitized patients. J Investig Allergol Clin Immunol 2005; 15 (4): 254-8.

⁵ Atencia R, Bernedo N, Ansótegui I.J. Inflamación, complemento y reacciones de hipersensibilidad. En: Pelaez A, Dávila I.J. Tratado de Alergología. Ed Ergon. 2007. ISBN: 978-84-8473-576-2 (Tomo I). Pag 55-65.

⁶ Janeway C, travers P. Inmunología. 2000. Masson.

⁷ Holgate S, Church M, Lichtenstein L. Allergy. Mosby 2001.

⁸ Pacáková V, Stulík K, Tichá M. High-performance separations in isolation and characterization of allergens. J Chromatogr B, 1997; 699: 403-418.

⁹ Alfaya T, Marqués L. *Chenopodiaceas/Amaranthaceas*. Polinosis. Polen y alergia. 2002. 69-78.

¹⁰ Castroviejos ED. Chenopodiaceae. En Castroviejo et al. Eds. Flora Iberica II, Madrid, CSIC: 476 -553.

¹¹ Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcín (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences and immunologic properties. J Allerg Clin Immunol, 2004; 113 (6): 1192 -1198.

¹² Ceballos, A: Diccionario Ilustrado de los nombres Vernáculos de las plantas en España, 1986. I.C.O.N.A.

¹³ Carnes J, Fernandez-Caldas E. Alergenos del polen de *Salsola kali*. Libro de resúmenes de ponencias de la VI reunión anual de Alergoaragón. Formigal. Febrero 2002.

¹⁴ Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts Mills TA. Allergen nomenclature. Bull World Health Organ, 1986: 64 (5): 767-74.

-
- ¹⁵ De la Hoz B. Rino-conjuntivitis y asma por hipersensibilidad al polen de *Salsola kali* (*Chenopodiaceae*): Aspectos clínico-inmunológicos y valoración de la inmunoterapia. Tesis doctoral Madrid. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid; 1995.
- ¹⁶ Carnes J, Fernández-Caldas F, Marina A, Alonso C, Lahoz C, Colas C, Lezaun A. Immunochemical characterization of *Russian thistle (Salsola kali)* pollen extracts. Purification of the allergen Sal k1. Allergy. 2003; 58: 1152: 1156.
- ¹⁷ Comité de Aerobiología de la SEAIC. Curso de Aerobiología.
- ¹⁸ Lamson RW, Waltry A. The importance of *Chenopodiaceae* in pollinosis with special reference to Winslow and Holbrook, Arizona. J. Allergy 1933; 4: 255-281.
- ¹⁹ Lewis WH, Dixit AB, Wedner HJ. Aeropollen of weeds of the western United States Gulf Coast. Annals of allergy, 1991; 67: 47-52.
- ²⁰ Silvers WS, Ledoux RA, Dolen WK, Morrison MR, Nelson HS, Weber RW. Aerobiology of the Colorado Rockies: pollen count comparisons between Vail and Denver, Colorado. Ann Allergy, 1992; 69 (5): 421-426.
- ²¹ Consentido S, Pisano PI, Fadda ME, Palmas F. Pollen and mold allergy: aerobiologic survey in the atmosphere of Cagliari, Italy (1986-1988). Ann Allergy, 1990; 65 (5): 393 -400.
- ²² Halwagy M, Halwagy R. Seasonal distribution of pollen grains in the atmosphere of Kuwait. Pollen spores, 1984; 9: 443- 447.
- ²³ Paternal R, Culig J, Mitin B, Vukusic I, Sostar Z. Analysis of airborne pollen concentration in Zagreb, Croatia 2002. Ann Agric Environ Med, 2003; 10 (1); 107 -112.
- ²⁴ Subiza J, Feo Brito F, Pola J et al. Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. Rev. Esp. Alergol Inmunol Clin. 1998, 2: 45-58.
- ²⁵ González Minero FJ, Morales J, Candor P, Tomás MC, Pérez Tello AM. Aerobiological study of *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae* in the Mediterranean area of southwestern Spain. J Investig Allergol Clin Immunol, 1998; 8(6): 370 -375.
- ²⁶ Belmonte J, Roure JM. Introducción. Polinosis. Polen y Alergia. 2002. 7 -16. Menarini.
- ²⁷ De la Hoz B. Rino-conjuntivitis y asma por hipersensibilidad al polen de *Salsola kali chenopodiaceae*. In Senent C editor. Sesiones inter-hospitalarias curso 1994-1995. Madrid, Lab Astra - SEAIC 1995: 277-291.

-
- ²⁸ Pola J, Zapata C, Sanz E. *Chenopodiceae-amaranthaceae*. Descripción y distribución en España. En Atlas de Aerobiología y polinosis. SEAIC y Forum s.XXI (Schering-Plough).
- ²⁹ Guerra F, Galan C, Miguel R et al. Occurrence and clinical profile of the sensitization to *Chenopodium* in the province of Cordoba Spain. Allergol et Immunopathol. 1990; 18: 161 -166.
- ³⁰ Shafiee A, Yunginger JW, and Gleich GJ. Isolation and characterization of *Russian thistle (Salsola pestifer)* pollen allergens. J Allergy Clin Immunol 1981, 67: 472-481.
- ³¹ Lombardero M, Duffort O, Sellés JG, Hernández J, Carreira J. Cross-reactivity among *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae*. Ann Allergy 1985; 54: 430-436.
- ³² Gomez J, Mansfield LE, Frederick RW, Rael ED. Analysis of the individual allergens of Russian thistle pollen by an enzyme-linked immunoblotting technique. Journal Asthma 1989;26:243-250.
- ³³ Würtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H, Pisen H. Characterization of Chenopodiales (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. Allergy 1995;50:489-497.
- ³⁴ Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodriguez R. Identification and characterization of Che a1 allergen from *Chenopodium album* pollen. Int Arch Allergy Immunol 2002; 127: 47-54.
- ³⁵ Florido JF, Quiralte J, Saénz de San Pedro B, Bartolomé B. Cross-reactivity between *Olea europaea* and *Chenopodium album* pollens. Allergy 2000; 55(supl. 63): 158.
- ³⁶ Barderas R, Villalba M, Batanero E, Pascual CY, Rodríguez R. Role of profilin and polyclacin in chenopod pollen allergy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:1132-1133.
- ³⁷ Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Teherani M, Jabbari F, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k3), as a novel allergen of *S. kali* pollen. Mol Biol Rep. 2011; 38: 65 -73.
- ³⁸ Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Teherani M, Jabbari F, Falak R, Varasteh A. Sal k4, a new allergen of *salsola kali*, is profiling: a predictive value of conserved conformational regions in cross reactivity with other plant- derived profilins Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74: 1441-1446.
- ³⁹ Castro L, Mas S, Barderas R, Colas C, Garcia-Selles J, Barber D, Rodriguez R, Villalba M. Sal k5, a member of the widespread Ole e1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola Kali*) pollen. In Arch Allergy Immunol. 2014; 163: 142-53.

-
- ⁴⁰ Lamson RW. Evidence of biologic relationship among species of *Chenopodiales*. Proc Soc Exp Biol Med 1931; 28: 502-504.
- ⁴¹ Sellers ED, Adamson WB. A study of apparent atopic similarity of certain chenopodiales pollens. Journal of allergy. 1932; 11: 166 -171.
- ⁴² Mas S, Barderas R, Colas C, Quiralte J, Rodriguez R, Villalba M. The natural profilin from *Russian thistle* (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform- molecular and immunological characterization. FEBS Journal. 2012. 279: 4338-4349.
- ⁴³ Weber R, Nelson NH. Pollen allergens and their interrelationships. Clin Rev Allergy 1985; 3: 291-318.
- ⁴⁴ Barderas R, García-Selles J, Salamanca G, Colas C, Barber D, Rodríguez R, Villalba M. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola Kali*) pollen. Clin Exp Allergy. 2007 Jul 37 (7): 1111-1119.
- ⁴⁵ Arilla MC, Ibarrola I, Brena S, Martínez A, Colas C, Asturias JA. The Russian Thistle (*Salsola kali*) Pollen Major Allergen, Sal k 1, Can Be Quantified in Allergenic Extracts and Airborne Pollen. Int Arch Allergy Immunol. 2010 Feb 26;152(4):319-326.
- ⁴⁶ Ferrer A, Larramendi CH, Huertas AJ, Pagán JA, Andreu C, García-Abujeta JL, López-Matas MA, Carnés J. Allergenic differences among pollens of three *Salsola* species. Int Arch Allergy Immunol. 2010;151 (3):199-206.
- ⁴⁷ Chardin H, Peltre G. Allergome: the characterization of allergens based on a 2D gel electrophoresis approach. Expert rev Proteomics, 2005; 2(5): 757 -590.
- ⁴⁸ International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994; 49: S1-34.
- ⁴⁹ Van-Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica G, Durham S et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. EAACI Position paper. Allergy 2000; 55: 116-134.
- ⁵⁰ Dykewicz MS, Fineman S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parametres on Diagnosis and Management of Rhinitis. Ann Allergy Asthma Immunol 1998; 81: 463-468.
- ⁵¹ Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. ARIA workshop Report. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 147 -336.

⁵² Bousquet J et al. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis: ARIA update. Allergy 2006; 61: 1086-1096.

⁵³ Global strategy for asthma management and prevention. WHO/NHLBI workshop report. Lung and blood Institute: National Institutes of Health, National Heart, Publication Number 95-3659.1995.

⁵⁴ Global strategy for asthma management and prevention. Revised 2002. <http://www.ginasthma.com> 2002.

⁵⁵ Global Initiative for Asthma. Revised 2006. <http://www.ginasthma.com> 2006.

⁵⁶ Global Initiative for Asthma. Revised 2014. <http://www.ginasthma.org> 2014.

⁵⁷ Ferrer L, Carnes J, Rojas-Hijazo B, Lopez-Matas MA, Sobrevia MT, Colas C. Assessing Degree of Flowering Implicates Multiple *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* Species in Allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2012; 158(1):54-62.

⁵⁸ Valero A, Alonso J, Antepara I, Baró E, Colas C, del Cuillo A, Ferrer M, Herdman M, Martí-Guadado E, Monclús L, Mullol J, Navarro-Pulido AM, Navas C, Sastre J, Baltasar M, Bartra J, Serrano C, Cardona V, Castillo JA, Cerda MT, Cistero A, Conejero A, Davila I, Escudero C, Hernandez E, Vereda A, Fernandez B, Mencia J, Fernández J, Florido J, Quiralte J, Guardia P, Malek T, Montoro J, Orta JC, Oehling A, Pascual MJ, de la Parte B, Raga E, Rubira N, Ranea S, Rivas P, Serra J, Tabar A. Development and validation of a new Spanish instrument to measure health-related quality of life in patients with allergic rhinitis: the ESPRINT questionnaire. Value Health. 2007 Nov-Dec; 10(6):466-77.

⁵⁹ National Heart, Lung and Blood Institute. Global Initiative for asthma. NIH Publication NO.95-3659. 1995

⁶⁰ Osterballe O, Week B. A new lancet for skin prick testing. Allergy 1979;27:439-469.

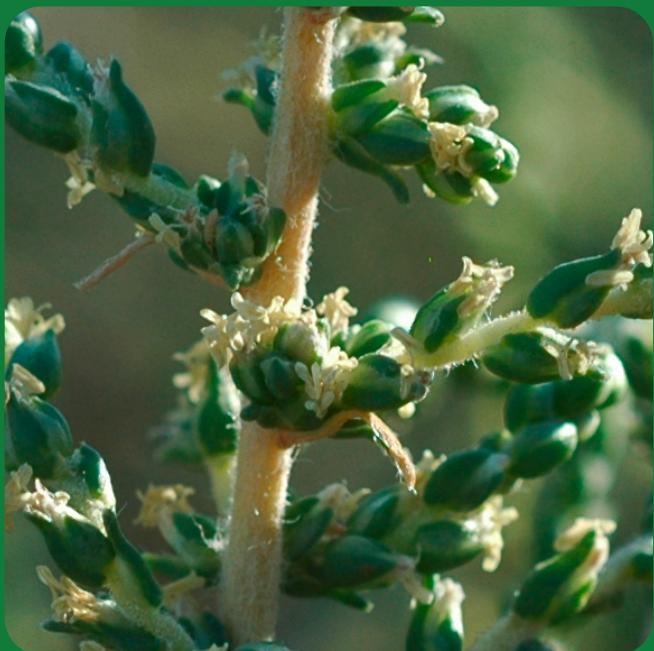
⁶¹ The use of standardizer allergen extracts. Position Statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (A.A.A.A.I). J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 583-586.

⁶² Lowry, OH, Rosebrough MJ, Lewisfar A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent J Biol. Chem 1951;193: 265-275

⁶³ Jäger S. Recommendations for methodology for routinely performed monitoring of airborne pollen. Practical Workshop II: Collection and identification of pollens. In: "Syllabus" of Postgraduate courses and practical workshop (XVI EAACI 95, Madrid). Torrent (Valencia): Basomba A, Sastre J. 1995:329-330.

-
- ⁶⁴ Pike, S. Catálogo de plantas vasculares de Zaragoza. 2003. Consejo de protección de la Naturaleza de Aragón. Zaragoza 2003.
- ⁶⁵ Puente Cabeza J. Guía de la flora de la depresión del Ebro (2º edición). Consejo de protección de la Naturaleza de Aragón. Zaragoza 2006.
- ⁶⁶ Atlas de la Flora de Aragón: <http://www.ipe.csic.es/floragon/index.html>
- ⁶⁷ Martí M, Palacio S, Gutiérrez M,: Fenología y características funcionales de las plantas leñosas mediterráneas: in Valladares F (ed): Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Madrid, Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, 2004, pp 129-133.
- ⁶⁸ Domenech J. El modelo de investigación científica: Diseño de estudios. 1998. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Unidad 7: 7-67.
- ⁶⁹ Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Koegevinas M, Burney P, Jarvis D: Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey i. Allergy 2007; 62: 301-309
- ⁷⁰ Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. Biology of weed pollen allergens. Curr Allergy Asthma Rep. 2004;4: 391-400.
- ⁷¹ Mohapatra SS, Lockey RF, Polo F. Weed pollen allergens. Clin Allergy Immunol. 2008;21:127-39
- ⁷² Villalva M, Barderas R, Mas S, Colas C, Baterner E, Rodriguez R. *Amaranthaceae* pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. J Investig Allergol Clin Immunol 2014; 24 (6): 371-81.
- ⁷³ Teherani M, Sankian M, Assarehzadegan MA, Falak R, Jabbari F, Varasteh A. Immunochemical characterization of Amaranthus retroflexus pollen extract: extensive cross reactive allergenic components among four species of Amaranthaceae/Chenopodiaceae. Iran J Allergy Asthma Immunol 2010; 9: 87-95
- ⁷⁴ Connell JT. Quantitative intranasal pollen challenges. III. The priming effect in allergic rhinitis. J Allergy 1969; 43: 33- 44.
- ⁷⁵ Belmonte J, Roure JM, Colas C, Duce F, Garcia RM, Laborda M et al: Ceñigos y Amarantos; in: Aerobiología de Aragón. Barcelona, Quasar Serveis d'imatge, 2001, pp 41- 46.
- ⁷⁶ Colas C, Lezaun A,: Russian thistle polinosis: from allergen characterization to specific immunotherapy treatment. Front Biosci 2009; 14: 4652- 4657.

-
- ⁷⁷ Amini A, Sankian M, Assarehzadegan MA, Vahedu V, Varasteh A. Chenopodium album pollen profilin (Che a2),: homology modeling and evaluation of cross-reactivity with allergenic profilins based on predicted potential IgE epitopes and IgE reactivity analysis. Mol Biol Rep. 2011; 38: 2579-2587.
- ⁷⁸ Frenguelli G, Passalacqua G, Bonini S et col. Bridging allergologic and botanical knowledge in seasonal allergy: a role for phenology. Annals of Allergy Asthma and Immunol. 2010; 105: 223-227
- ⁷⁹ Butters Jt, Weichenmeier I, Ochs S, Pusch G, Kreyling W, Boere Aj, et al: The allergen Bet v1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. Allergy 2010; 65: 850-858.
- ⁸⁰ Feo-Brito F, Mur P, Carnes J, Fernandez-Caldas E, Lara P, Alonso AM, et al: Grass pollen, aeroallergens and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. J Investig Allergol Clin Inmunol 2010 (4); 20: 295-302.
- ⁸¹ Cleland EE, Chuine I, Mendez A, Mooney HA, Schwartz MD. Shifting plant phenology in response to global change. Trends Ecol Evol. 2007; 22: 357-365.



Universidad de Zaragoza
Facultad de Medicina