Universidad de Alcalá
COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **ALONSO DÍAZ DE DURANA, MARÍA DOLORES**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D325 DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD** DEPARTAMENTO DE: **MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 28/09/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de MONSERRAT FERNÁNDEZ-RIVAS // MARÍA TERESA VILLALBA DÍAZ.

Sobre el siguiente tema: *ALERGÍA A LOS PÓLENES DE CIPRÉS Y OLIVO: FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL[2] de (**no apto, aprobado, notable y sobresaliente**): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 28 de Septiembre de 2017

EL PRESIDENTE

Fdo.:

EL SECRETARIO

Fdo.:

EL VOCAL

Fdo.: Domingo Barber

Con fecha 31 de octubre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- [x] Conceder la Mención de "Cum Laude"
- [ ] No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: Mª DOLORES ALONSO

[2] La calificación podrá ser "**no apto**" "**aprobado**" "**notable**" y "**sobresaliente**". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

Universidad de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 31 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *ALONSO DÍAZ DE DURANA, MARÍA DOLORES*, el día 28 de septiembre de 2017, titulada *ALERGÍA A LOS PÓLENES DE CIPRÉS Y OLIVO: FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 2 de noviembre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ - COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:
Doctorando: ALONSO DÍAZ DE DURANA, MARÍA DOLORES
Secretario del Tribunal: BELÉN DE LA HOZ CABALLER.
Directores de Tesis: MONSERRAT FERNÁNDEZ-RIVAS // MARÍA TERESA VILLALBA DÍAZ

Universidad de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./Dª MARÍA DOLORES ALONSO DÍAZ DE DURANA reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☒ impreso en papel, para el depósito de la misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: 217 se procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a 27 de ABRIL de 2017

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ SERVICIO DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO

Rosa Carrillo Salas

Fdo. El Funcionario

Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

ALERGIA A LOS PÓLENES DE CIPRÉS Y OLIVO:

FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN

Tesis doctoral

MARÍA DOLORES ALONSO DÍAZ DE DURANA

2017

Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

ALERGIA A LOS PÓLENES DE CIPRÉS Y OLIVO: FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN

Tesis doctoral

MARÍA DOLORES ALONSO DÍAZ DE DURANA

Directoras:

DRA. MONTSERRAT FERNÁNDEZ RIVAS

DRA. Mª TERESA VILLALBA DÍAZ

Alcalá de Henares, 2017

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Campus Científico Tecnológico
Ctra. Madrid-Barcelona, km.33,600
28805 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 918854533 -- 4707 - 4790
e.mail: dpto.medesp@uah.es

Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas

INFORMA QUE:

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por Dª. **María Dolores Alonso Díaz de Durana** titulado "**Alergia a los pólenes de ciprés y olivo: fenotipos clínicos y perfil de reconocimiento de alérgenos en pacientes con doble sensibilización**", realizado bajo la dirección de los Dres. Dª. Montserrat Fernández Rivas, y Dª. María Teresa Villalba Díaz, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a cinco de abril de dos mil diecisiete.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ - DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS

Dña. Montserrat Fernández Rivas
Doctora en Medicina y Cirugía
Jefe de Servicio de Alergia del Hospital Clínico San Carlos
Profesora Asociada de Medicina de la UCM

CERTIFICA:

Que Dña. María Dolores Alonso Díaz de Durana, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el proyecto de tesis doctoral titulado: "ALERGIA A LOS PÓLENES DE CIPRÉS Y OLIVO: FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN", para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne a mi juicio los requisitos científicos y formales necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid a 31 de marzo de 2017.

Fdo: Dra. Dña. Montserrat Fernández Rivas

Mayte Villalba Díaz
Catedrática
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense
28040 Madrid (Spain)

Fax: (34) 91-394-4159
Tel.: (34) 91-394-4155
E-Mail: maytevillalbadiaz@gmail.com
mvillalb@ucm.es

Dña MARIA TERESA VILLALBA DIAZ

Doctora en CIENCIAS QUIMICAS

Catedrática deL DEPARTAMENTO BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

CERTIFICA:

Que Dña. María Dolores Alonso Díaz de Durana, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el proyecto de tesis doctoral titulado: "ALERGIA A LOS PÓLENES DE CIPRES Y OLIVO: FENOTIPOS CLÍNICOS Y PERFIL DE RECONOCIMIENTO DE ALÉRGENOS EN PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN", para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne a mi juicio los requisitos científicos y formales necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid a 31 de marzo de 2017.

Mª Teresa Villalba Díaz
Catedrática
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad Ciencias Químicas

Fdo: MARIA TERESA VILLALBA DIAZ

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas resumieran mi sincero agradecimiento a las dos personas que directamente han hecho posible que esta Tesis salga adelante, mis directoras: la Dra. Montserrat Fernández-Rivas, a la vanguardia en investigación clínica en Alergología, a la que debo su criterio, continuas aportaciones y consejos, dedicación, motivación, aliento, paciencia y amistad desde hace años y de la que he aprendido el rigor científico y agradezco su visión crítica; y la Dra. Mayte Villalba, de reconocida experiencia en investigación en el campo de la Biología Molecular con alérgenos, en especial del polen del olivo, a la que debo su dedicación, ánimo, orientación y sus aportaciones que han hecho posible el hilo conductor del desarrollo del estudio inmunológico.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento a las personas que también me han apoyado:

A Elia Pérez-Fernández por el apoyo metodológico en el análisis de la base de datos y en la interpretación de los resultados.

A los miembros de la Unidad de Alergia del HUFA: mi jefe de Unidad, Dr. Miguel Ángel Tejedor, mis compañeras, las Dra. Ana Rosado, Dra. Mar Moro, Dra. Mónica Rodríguez y Dra. Ana Nieto, enfermeros, auxiliares y médicos residentes, por sus muestras de afecto y aliento.

A todo el personal del Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Biobanco y Laboratorio de Análisis Clínicos del HUFA por su colaboración, y en especial a las Dra. Marisa Casas, Dra. Rosa Tolón y Dra. Cristina Benito por su ayuda durante el proyecto.

A Eulalia Grifol, bibliotecaria del HUFA, por su tiempo y ayuda en las búsquedas bibliográficas.

A Sara Abián, técnico del departamento de Biología Molecular de la Facultad de Químicas de la UAM, por la ejecución de los estudios de ELISA e Inmunodetección.

A los pacientes del estudio por su generosa participación.

A Carlota Rouziès, por el diseño y maquetación del documento, elegante y profesional.

Quiero hacer mención especial a la Dra. Eloina González-Mancebo, a quien agradezco de corazón su amistad, apoyo, ánimo y consejo durante todo el proyecto de esta Tesis.

Y por supuesto agradezco a mi marido y a mis hijas su paciencia y comprensión, y al resto de mi familia y amigos sus muestras de ánimo y afecto.

A Valeria y Martina

A Daniel

A la memoria de mis padres

ABREVIATURAS

ßME	ß-Mercaptoetanol
Ca	*Cupressus arizonica*
CAP Cupressus	CAP *C. arizonica y/o C. sempervirens*
Cs	*Cupressus sempervirens*
CtD	Dominio carboxilo terminal
Cup a 1	Alérgeno principal del polen de *Cupressus arizonica*
Cup s 1	Alérgeno principal del polen de *Cupressus sempervirens*
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (**E**nzime **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)
HLA	Antígeno de histocompatibilidad de leucocitos humanos
HUFA	Hospital Universitario Fundación Alcorcón
***Immuno*CAP**	Ensayos cuantitativos in vitro para la medición de anticuerpos
IT	Inmunoterapia
kDa	Kilodalton
LTPs	Proteína de transferencia de lípidos
Mm	Masa molecular
NtD	Dominio amino terminal
Ole e 1	Alérgeno principal del polen de *Olea europaea*
"Ole e"	Cualquier alérgeno del polen de *Olea europaea*
"Ole e menor"	Cualquier alérgeno minoritario del polen de *Olea europaea*
"Ole e 9"	CtDOle e 9 y/o NtDOle e 9.
pAb	Anticuerpo policlonal
PRs	Proteínas relacionadas con patogénesis
pAb anti-rCtD-Ole e 9	Anticuerpo policlonal frente a la proteína recombinante del dominio C terminal Ole e 9
pAb nOle e 1	Anticuerpo policlonal frente a la proteína natural Ole e 1
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Pruebas cutáneas
RIQ	Rango intercuartílico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN

La rinitis/conjuntivitis alérgica es la enfermedad alérgica de mayor prevalencia y que con mayor frecuencia se estudia en Consultas de Alergología (54,7%), seguida del asma bronquial (27,6%) (Alergológica, 2005) con gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes y de gran relevancia sociosanitaria y económica. Los pólenes son las fuentes alergénicas más frecuentemente implicados, y son la causa del 51% de las rinoconjuntivitis y del 43% de los asmas de los centros de Alergia de España Entre los pólenes responsables destacan los pólenes de gramíneas, olivo, cupresáceas y plátano, siendo común en nuestra área la polisensibilización a diversos pólenes. Sin embargo, la coincidencia de sensibilización aislada a polen de cupresáceas y olivo (aunque no inusual), no está documentada en la literatura.

Los árboles con pólenes alergénicos se encuentran distribuidos por todo el mundo, pero la alergia respiratoria es clínicamente relevante en zonas de clima templado de Europa, Norteamérica y Asia, área Mediterránea, norte de África, Sudamérica, Sudáfrica, India, Australia, mientras que en zonas de clima tropical es prácticamente inexistente. Los árboles pertenecientes a los órdenes Fagales, Lamiales, Proteales, y Pinales son las fuentes alergénicas más potentes (Asam y col., 2015).

La ciudad de Madrid se encuentra en la meseta central a 690 m de altitud. El clima es de tipo mediterráneo contrastado (continental extremo), con veranos calurosos, largos y secos (4 meses) e inviernos fríos, con precipitaciones escasas en invierno y abundantes en otoño y primavera, aunque con grandes fluctuaciones interanuales, que condicionan las variaciones de concentración de pólenes en la atmósfera. Su climatología permite que se detecten pólenes alergénicos todo el año, pero el 80% de los pólenes anuales se captan en 4 meses (marzo a junio) (Subiza y col., 1995). Los pólenes de origen arbóreo que se captan en la ciudad proceden principalmente de encinas (de los alrededores), plátano de sombra, cipreses, arizónicas, pinos y olivos (en especial de la zona sur de la provincia), y luego en menor frecuencia de alisos, fresnos, olmos, chopos, morera y castaños, como árboles ornamentales.

Entre las fuentes de polen herbáceo destacan los pólenes de gramíneas, siendo más modestos otros como los del plantago, rumex, urticáceas, quenopodiáceas (Subiza y col., 1995).

En el estudio de Subiza de 1998, el 94% de los pacientes presentaron pruebas cutáneas (PC) positivas a polen de gramíneas, aunque el 95% también presentaron otros pólenes positivos, concluyendo que las gramíneas son la causa más frecuente de polinosis en Madrid, demostrada no sólo por los recuentos polínicos y prevalencia de las pruebas cutáneas sino además por la venta de antihistamínicos durante la época de polinización (Subiza y col., 1998).

1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.1 Cupressaceae

La familia *Cupressaceae tiene una* gran importancia forestal y amplia representación por todo el mundo. Son plantas con semillas al descubierto, por lo que pertenecen a las Gimnospermas. La polinización es anemófila, eliminando grandes cantidades de polen desde la base a la copa.

Dentro de las Gimnospermas, las cupresáceas pertenecen al grupo de las coníferas (clase *Coniferopsida o Pinatae*) en el que se integran también las otras gimnospermas silvestres de la Península. Dentro de esta clase se diferencian 2 órdenes: Taxales y Coniferales (también denominada Pinales). El orden Taxales sólo tiene una familia (*Taxaceae*), y la especie más conocida es el Tejo (*Taxux baccata*).

El orden Coniferales (Pinales) abarca 575 especies de 6 familias: *Pinaceae, Cupressaceae, Cephalotaxaceae, Taxodiaceae, Araucariaceae y Podocarpaceae.* Dentro de la familia *Cupressaceae* existen 150 especies, repartidas en 19 géneros, siendo los más importantes desde el punto de vista alergológico, *Cupressus* con las especies *C. arizonica* (ciprés de Arizona u arizónica) *y C.*

sempervirens (ciprés común)*, Juniperus* con las especies más destacadas *J. communis* (enebro común), *J. oxycedrus* (enebro de la miera) y *J. ashei o J. sabinoides (cedro de montaña),* con importancia este último en EEUU, *Tetraclinis* (*T. articulata*, sabina de Cartagena), *Chamaecyparis (Ch. lawsoniana,* cedro de Oregón)*, Platycladus (P. orientalis,* árbol de la vida chino*), Thuja* (*T. occidentalis*, árbol de la vida)*, Calitris,* entre otros (Pola y col., 2015).

El género *Cupressus* lo constituyen árboles o arbustos resinosos con hojas simples, aciculares o en forma de escama, enteras, que se sitúan en disposición opuesta o verticiladas por 3 ó 4 y que se mantienen sin caer durante todo el año. Producen conos masculinos y femeninos, con escamas enfrentadas o verticilos, que pueden ir en la misma planta o bien en plantas de distinto sexo. Los conos masculinos tienen de 2 a 6 bolsitas de polen debajo de cada escama. Las escamas a veces tienen forma de parasol y otras son casi planas o más o menos triangulares. Los conos femeninos son globosos u ovoides y tiene por lo general las brácteas que suelen formar las escamas de este tipo de piñas (la tectriz y la fructífera) soldadas en una sola, indiferenciadas; hay generalmente de 2 a 15 rudimentos seminales por escama. Producen fructificaciones leñosas a modo de piñas (estróbilos) o carnosas parecidas a bayas (gálbulos o arcéstidas). Las semillas pueden ser a veces aladas y tienen un embrión con dos cotiledones, aunque de forma más infrecuente pueden presentar hasta seis (López González, 2006).

El género *Cupressus* tiene 20 especies, de las cuales *Cupressus arizonica* y *Cupressus sempervirens* son la que tienen mayor interés alergológico en nuestra área.

Cupressus arizonica

Árbol que puede alcanzar hasta 20 m de altura. La copa suele estrecha, cónica o piramidal, que se puede volver abierta y desparramada con la edad. La corteza del tronco es de color pardo rojizo, muy vistosa, y de la que se desprenden tiras o placas. Las ramillas son algo más gruesas y menos densas en su conjunto que las

del ciprés. Hojas de 1,5 a 2 mm de longitud, de color verde azulado y hasta con tonos grisáceos. Los conos masculinos, que son numerosos y nacen en la terminación de las ramillas son pequeños, ovoides, mazudos, verde-amarillentos, con unas 6-8 escamas. Las piñas madura son globosas (esferoidales), de 1,2 a 3 cm de diámetro, de color pardo-rojizo pero recubiertas como de una película cérea azulada, con 6 a 8 (rara vez 10) escamas terminadas en un mucrón agudo. Las semillas, que son numerosas, de 1,5-3 mm, tienen forma alargada o casi triangular, color pardo rojizo y un ala delgada y estrecha.

Es natural de las montañas de Arizona, Nuevo México y Texas, donde habita a grandes altitudes, entre 1000 y 2000 m. En algunas zonas de España se pueden encontrar reforestaciones realizadas con esta especie, por ejemplo, en Despeñaperros.

Se cultiva extensamente como planta ornamental, sobre todo para la formación de setos en jardines. Es muy resistente a la sequía, relativamente tolerante a los fríos y a las heladas y capaz de vivir en casi todo tipo de suelos, incluso en los que son yesosos, pero es intolerante a los encharcados. Se reproduce por semilla o esqueje.

La raza más cultivada es *Cupressus arizonica var. bonita* Lemmon, cuyo nombre viene un cañon norteamericano de Arizona cuyo nombre hispano es el *Bonita Canyon.* (López González, 2006; www.arbolesibericos.es).

Figura 1. *Cupressus arizonica*. Piñas y ramillas con hojas escuamiformes. Tomada de E. L. Greene http://www.arbolesibericos.es/.

Cupressus sempervirens

Árbol que se mantiene verde todo el año. Puede alcanzar hasta 35 m de altura, su tronco es recto y columnar (aunque es ejemplares silvestres puedes ser tortuoso y retorcido), con corteza pardo grisáceas, estriada longitudinalmente. La forma de la copa es muy variada, alargada y estrecha (típica de cementerios y jardines), piramidal, globosa, irregular, etc. Las hojas son escamiformes, de 0,5 a 1 mm de longitud, opuestas y dispuestas como tejas de un tejado, de color verde oscuro. Los conos masculinos son ovoideos de 4-8 mm, y se producen en gran número, cada uno en la terminación de una ramilla. Los conos femeninos son elipsoidales, al principio de color verde, luego pardo-grisáceos, y lustrosos, haciéndose muy leñosos; miden 25-40 milímetros y tienen 8-14 escamas poligonales en forma de maza (con los mucrones poco aparentes), enfrentadas por parejas que se separan en la madurez para dejar salir las semillas; éstas son aplastadas, con un ala estrecha y se producen en número de 6-20 debajo de cada escama.

Es nativa de la región mediterránea oriental, pero su área natural precisa es difícil de determinar, ya que se cultiva desde la Antigüedad, pudiendo ser su origen en la islas del mar Egeo, o en una región comprendida entre Chipre, Siria e Irán.

Es muy resistente a la sequía y a las temperaturas extremas, especialmente las estivales. Puede vegetar en todo tipo de suelos, salvo yesosos, salinos y los prolongadamente encharcados.

Está considerada una especie muy longeva y de ella se citan ejemplares de más de 500 años. Su madera, muy fina y aromática incluso seca, es muy apreciada, especialmente para ebanistería, tornería, tallas, artesanía, y para la fabricación de instrumentos musicales de cuerda. De su madera son algunos sarcófagos egipcios y fenicios y, según la leyenda, formó parte del Arca de Noé y del Templo de Salomón. Las puertas del Partenón de Atenas, la estatua para conmemorar la victoria de los Juegos en Olimpia, la imagen de Apolo en el templo de Delphi eran de ciprés. En España se emplea en jardinería y paisajismo, y está considerada como uno de los elementos que mejor evoca el paisaje mediterráneo. Admite muy

bien la poda y es muy usada para hacer setos y para crear barreras visuales y cortavientos (López González, 2006; www.arbolesibericos.es).

Figura 2. *Cupressus sempervirens*. Porte columnar característico; piñas maduras. Tomadas de E. L. Greene http://www.arbolesibericos.es/.

1.1.2 Oleaceae

La familia de las oleáceas (*Oleaceae*) se encuentra ampliamente distribuida por la cuenca mediterránea y algunas zonas de Norteamérica (California y Arizona). Son angioespermas (plantas con flores) del grupo de las dicotiledóneas. Las flores se polinizan por medio de insectos, lo que les permite ahorrar granos de polen y reducir a dos el número de estambres, aunque en el caso del olivo, la cantidad de polen que pueden liberar es tan grande, debido al gran número de flores y a que es muy ligero y con excelentes propiedades aerovagantes, que facilita que permanezca en el aire grandes cantidades de polen y pueda ser un potente sensibilizador.

Son plantas leñosas, arbustivas o arbóreas, a veces trepadoras. Los géneros destacables desde el punto de vista alergológico son *Olea europaea* (olivo y acebuche) y *Fraxinus excelsior* (fresno). Otros *Ligustrum vulgare* (aligustre), *Syringa vulgaris* (lila), *Forsithya* (forsitia) y *Jasminum* (jazmín).

Olea europaea

En la península ibérica e islas baleares hay una sola especie del género *Olea*, *Olea europaea L.,* que tiene dos variedades, *Olea europaea subsp. europaea* (olivo cultivado) y *Olea sylvestris* (acebuche u olivo silvestre). Este último se suele clasificar como una simple variedad del cultivado por lo que se denomina *Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* (López González, 2006). En Canarias se encuentra la *subespecie africana* (Conde Hernández*,* 2002).

Es un árbol muy longevo. No suele sobrepasar los 10 m de altura, de tronco grueso, corto, con frecuencia retorcido, en ejemplares viejos. En cambio, el olivo silvestre queda reducido muchas veces a un pequeño arbusto de ramillas rígidas y espinescentes y hojas pequeñas que recuerda muy poco a sus parientes cultivados. Tiene ramillas jóvenes blanquecinas y frecuentemente acabadas en espina en los ejemplares silvestres. Las hojas son persistentes, simples, de forma lanceolada, opuestas y con peciolos cortos, de color verde oscuro y brillantes por el haz, y blanquecino por el envés. Las flores son pequeñas, blanco-amarillentas y hermafroditas, reunidas en grupos con aspecto de racimos compactos que nacen en las axilas de las hojas. Tienen 4 pétalos soldados en la base, 2 estambres y un pistilo. El fruto es tipo drupa (carnoso con hueso (endocarpo) muy duro). Es la aceituna o la acebuchina, verde en su comienzo y negra en la madurez; en los ejemplares silvestres de aproximadamente 1 cm de longitud, mientras que en las razas cultivadas puede ser mucho mayor, hasta 3 – 4 cm.

El olivo europeo es nativo del suroeste de Asia, y ha sido ampliamente cultivado desde la época clásica en toda la cuenca mediterránea. Posteriormente con el descubrimiento de América se extendió por todo el continente americano y más recientemente a zonas de China, Japón, Sudáfrica y Australia.

En España, y debido a su resistencia al calor y sequía, al bajo coste de su explotación, se ha convertido en el cultivo de excelencia de Andalucía, Castilla–La Mancha y Extremadura (Pola y col., 2015). La superficie ocupada por olivos en España es de unos 2 millones de hectáreas siendo el 10% de la superficie cultivada. El olivo es el segundo cultivo en superficie después del trigo en nuestro

país. En Jaén la superficie cultivada son unas 500.000 hectáreas y se calcula que existe unos 50 millones de ejemplares en esta provincia (Moral de Gregorio y col., 2016).

Las poblaciones naturales del acebuche ocupan el sur de Europa, Suroeste de Asia, norte de África e islas de la Macaronesia (Madeira, Islas Canarias).

Es una especie muy austera en sus necesidades. Su principal limitación es cierta debilidad frente a los fríos invernales. Tolera la sequía y calores veraniegos intensos, y no tiene preferencias en cuanto al tipo de suelo. En la Península, se encuentra ligada a la vegetación típicamente mediterránea, más abundante en la mitad sur y en Levante, entrando por el valle del Ebro hasta el País Vasco, y hasta el sur de Galicia por la costa atlántica portuguesa. También aparece en las Baleares. Se mezcla con coscojas, encinas, alcornoques, pinos xerófilos, palmitos, lenticos, cornicabras, jaras, romeros, etc.

Se trata de una especie de gran interés económico, la principal en la región mediterránea. El aceite que se obtiene del prensado de los frutos es reconocido como el mejor en sabor y el más saludable. Además, las aceitunas también se pueden comer después de tratadas y aliñadas. Tanto para aceite como para aceituna de mesa se han desarrollado multitud de variedades con diferentes características y sabores, y con distintas posibilidades de tolerancia a las condiciones locales de suelo y clima. La madera es de excelente calidad, de las más duras y pesadas, compacta, de color claro y muy adecuada para instrumentos, recipientes, cubiertos, ebanistería fina, etc. También apreciada para leña y carbón; es uno de los carbones a los que se llama picón. El follaje es muy buscado por el ganado, sobre todo el caprino. Por ello son frecuentes en muchos montes los acebuches de aspecto recomido, casi irreconocibles. Sus frutos son consumidos con voracidad por diversas aves, como zorzales y estorninos. Los olivos viejos son árboles de gran belleza muy apreciados como ornamentales, para lo que se suelen trasplantar ejemplares viejos con sumo cuidado. El olivo además tiene un importante simbolismo mágico-religioso en el entorno mediterráneo. Diversas culturas lo han utilizado en sus ritos, principalmente la

judeo-cristiana (domingo de Ramos). La rama de olivo se ha empleado como símbolo de la paz. Los triunfadores de los Juegos Olímpicos eran coronados con ramas de olivo silvestre, equivalente a la medalla de oro actual. Con su aceite se ungían a los reyes el día de su coronación, y también a los enfermos terminales. Como contrapartida debemos decir que su polen se cuenta entre los más alergénicos que se producen en nuestras latitudes (López González, 2006; www.arbolesibericos.es).

Figura 3. *Olea europaea*. Acebuche (olivo silvestre); olivo cultivado; hojas lanceoladas y fruto maduro (oliva). Tomadas de http://www.arbolesibericos.es/.

1.2 POLEN

Los granos de polen son las células sexuales masculinas de las plantas con flores. Se forman en el interior de los estambres y, una vez maduros, son liberados. Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor de su misma especie y hacer posible la fecundación del ovocito. En algunas especies (plantas *autógamas*) el polen puede realizar su función en la misma flor o en la misma planta que lo ha formado, pero en la inmensa mayoría de las especies (plantas *alógamas*) el polen sólo resulta viable si alcanza una ovocélula de otra planta de su misma especie. El traslado del polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce con el nombre de polinización y puede

efectuarse de maneras diversas, que son características para cada especie. En nuestras latitudes, los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, con el viento como medio de arrastre y diseminación de los granos de polen, y por entomofilia, cuando la polinización corre a cargo de insectos.

El proceso de la polinización requiere que los pólenes sean células especialmente resistentes, ya que se ven sometidos a condiciones ambientales adversas que podrían provocar el colapso y desecación de los componentes celulares, alterándolos y haciendo el polen inviable. Como adaptación a ello, los pólenes están recubiertos por una pared de notable resistencia llamada *exina*. Está constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina, muy resistente a ácidos y bases y que no se afecta por las variaciones térmicas habituales en la naturaleza.

Como cualquier célula, los pólenes se caracterizan por su tamaño y su forma. Pero en el caso de los granos de polen, hay otras características que los describen, como son la estructura y la escultura (*ornamentación*) de su exina y las *aperturas* que pueden presentar, de las que debe observarse el tipo (*poros*, *colpos*, la combinación de ambos o su ausencia), el número y la disposición en la superficie del grano (Belmonte Soler, 2002).

1.2.1 Polen de *Cupressaceae*

Todas las especies del orden *Taxales* y *Coniferales*, excepto las *Pinaceae*, tienen un mismo tipo de polen, diferenciándose sólo en el tamaño, por eso al identificar a estos pólenes al microscopio se les denomina *Cupressaceae-Taxaceae*.

Son pólenes de forma esferoidal, con un tamaño variable entre 19 y 38 µm, sin aperturas y con una exina delgada con gránulos finos y gruesos. La intina es muy característica por su grosor (6 µm). En algunas ocasiones se rompe la exina, saliendo el protoplasto que aparece abrazado por la intina (Luengo, 2002).

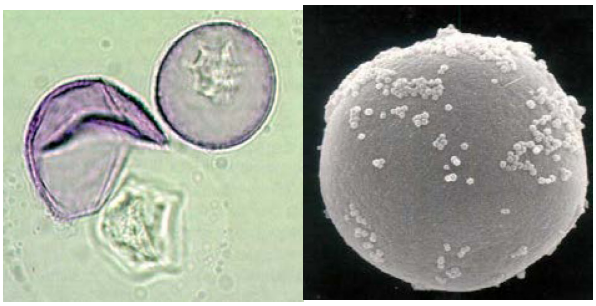

Figura 4. Polen de *Cupressaceae*. Tomadas de Menarini, S.A. Hospital Clínico Barcelona y Clínica Subiza.

1.2.2 Polen de *Olea europaea*

Tiene una forma esferoidal con un contorno ecuatorial subtriangular y un contorno meridional circular o ligeramente elíptico, un tamaño variable entre 18 y 22 µm (pequeño), trizonocolporado, con una exina gruesa, regular y con unas columelas muy visibles. La intina es fina con ulcus (Conde Hernández, 2002).

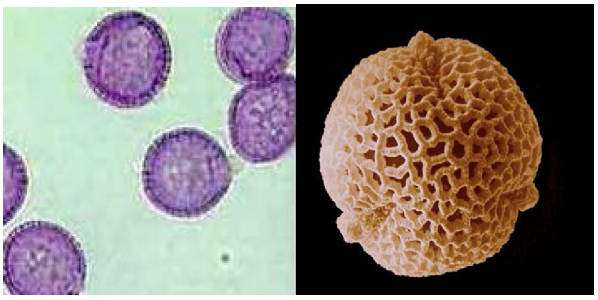

Figura 5. Polen de *Olea europaea*. Tomadas de Menarini, S.A. Hospital Clínico Barcelona y C. Subiza.

1.3 AEROBIOLOGÍA

1.3.1 Cupressaceae

La polinización de las *Cupressaceae* en España abarca desde el mes de octubre hasta abril, pero especialmente los tres primeros meses del año (Pola y col., 2015). La polinización de *C. arizonica* y *Juniperus ashei* abarca de noviembre a marzo; la del *C. sempervirens* de enero a abril; y la del *J. oxycedrus* de octubre a diciembre (Iacovacci y col., 1998). La temporada de polinización ha hecho que la alergia a cupresáceas sea clásicamente confundida con infecciones virales del invierno.

Desde la década de 1970 se ha registrado un incremento en las concentraciones atmosféricas totales anuales del polen de cupresáceas en muchas áreas de la cuenca mediterránea debido a la extensión de su cultivo y la popularización de su uso con fines ornamentales (Charpin y col., 2005). Además, pueden aparecer en pequeñas cantidades en los recuentos en cualquier mes. El viento puede transportar el polen a cientos de kilómetros. El periodo de polinización se puede ver afectado por el efecto barrido de las lluvias, aunque las mayores concentraciones de pólenes suelen recogerse en los años de mayores precipitaciones (Moral de Gregorio, 2003), como ocurre con las gramíneas. El cambio climático puede ser responsable de las diferencias de los tiempos de polinización (D'Amato y col., 2010).

La proporción de pólenes de cupresáceas varía respecto al total de los pólenes, dependiendo de las ciudades y las diferencias internanuales. Según los datos de las estaciones aerobiológicas pertenecientes al Comité de Aerobiología de las SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica), durante los años 1995-2014, la concentración anual media más elevada de pólenes de cupresáceas se produjo en Ponferrada con 49.889 granos/m^3, seguida de Lérida con 17.608 granos/m^3 y Jaén con 17.444 granos/m^3. La concentración anual media de Madrid es de 6.903 granos/m^3. El día pico de máxima recogida de

cupresáceas en Madrid fue de 2.031 granos/m^3, el 26 de enero de 2014. La concentración anual máxima en el mismo periodo 1995-2014, recogida en un solo año en Madrid fue de 14.924 granos/m^3 durante el 2014 (Moral y col., 2016).

1.3.2 Oleaceae

En España la polinización del olivo ocurre durante los meses de abril a junio, aunque los niveles máximos ocurren en la segunda quincena de mayo y primera de junio.

Existen diferencias importantes cuantitativas y en la potencia alergénica entre los pólenes de olivo, no sólo entre las distintas variedades de árbol (el olivo silvestre o acebuche y el olivo cultivado), sino también en los cultivares de las diferentes áreas geográficas y en distintas estaciones. En este polimorfismo influyen factores como las diferencias genéticas, la fecha de recolección, la climatología, la temperatura, la pluviosidad, la diferente composición de la tierra, el ecoambiente y los cuidados habituales. Esta variabilidad interanual parece producirse por una competencia por las sustancias nutritivas de la planta entre las frutas de una temporada y las flores de la temporada siguiente, que tendría como consecuencia una alternancia en la producción/polinización: un rendimiento alto de flores y frutas con otro bajo de pólenes. Un aspecto importante en el polen de olivo es su notable capacidad aerovagante, llegándose a captar a más de 100 Km de distancia del árbol y a cantidades reactivas (hasta 650 granos/m^3 de aire) (Pola y col., 2015).

La exposición alergénica es muy variable, donde existen diferencias importantes entre ciudades. Según los datos de las estaciones aerobiológicas pertenecientes al Comité de Aerobiología de las SEAIC, durante los años 1995-2014, la concentración anual media más elevada de pólenes de *Olea europaea* se produjo en Jaén con 57.911 granos/m^3, seguido de Sevilla con 11.355 granos/m^3 y Toledo con 10.715 granos/m^3. La concentración anual media de Madrid es de 2.664 granos/m^3. El día pico de máxima recogida de cupresáceas en Madrid fue de

2.085 granos/m^3, el 31 de mayo de 2009. La concentración anual máxima en el mismo periodo 1995-2014, recogida en un solo año en Madrid fue de 5.989 granos/m^3 durante 1.999 (Moral y col., 2016).

Se ha demostrado ya que los alérgenos polínicos pueden detectarse a nivel atmosférico independientemente de los pólenes y que proceden de fragmentos de plantas, orbículos o ruptura de antenas. Pero su procedencia principal es la de los propios pólenes como consecuencia de la ruptura bajo condiciones adecuadas de lluvia y humedad, dando lugar a los "aerosoles alergénicos" (Solomon y col., 2002). Se ha encontrado una correlación positiva entre los recuentos de polen de olivo y la concentración de Ole e 1 en las muestras de aire con los síntomas de rinitis y asma en pacientes monosensibilizados a polen de olivo (Brito y col., 2011).

La potencia del polen o concentración de Ole e1/polen parece no ser la misma en zonas distintas, por lo que la cantidad de polen de olivo en una zona concreta puede no ser representativa de la exposición al alérgeno principal del Olivo, Ole e 1. (Galan y col., 2013).

Según el proyecto de alergia alimentaria EuroPreval de la Unión Europea, durante los años 1990-2009, con la participación de 13 ciudades europeas, los pólenes más frecuentes son *Betulaceae,* siendo el doble de frecuentes que las gramíneas y cinco veces más que *Oleaceae* y *Astereaceae* (Smith y col., 2014). Sólo en Zurich se han encontrado niveles de *Oleaceae* superiores a 5.000 granos/m^3 por la presencia de *Fraxinus*. No se han encontrado pólenes de oleáceas en Reykjavik. En Madrid se detecta sobre todo *Olea europaea,* aunque también *Fraxinus y Ligustrum.*

Y por último hay que destacar que en la Península Ibérica hay una tendencia al aumento anual de las concentraciones de polen de árboles en la atmósfera, en la que influyen no sólo las diferencias geográficas, el aumento de plantaciones de árboles, sobre todo para uso ornamental, sino también el cambio climático, las emisiones de CO2, y el régimen de lluvias controlado por la oscilación Atlántico Norte (NAO) (Galán y col., 2016).

1.3.3 Calendario polínico

Se denomina calendario polínico a la representación gráfica que resume la dinámica anual de los principales tipos polínicos. Cada tipo polínico viene expresado en medias de diez días consecutivos de las concentraciones medias diarias (granos de polen/ m^3), recogidas por colectores tipo Burkard siguiendo una metodología estandarizada. Da información de la exposición polínica, lo cual es importante para la población sensibilizada y los profesionales sanitarios, para evaluar la relevancia clínica de la sensibilización.

En la figura siguiente se observan los diferentes tipos polínicos de origen arbóreo y herbáceo (Gutiérrez Bustillo y col., 2007), donde se observa dentro de los tipos arbóreo que *Cupressaceae* es el segundo más frecuente y que registra concentraciones elevadas (200-399 granos/m^3) a mediados de febrero, siendo también elevadas para *Olea* (50-99 granos/m^3). También observamos el periodo de presencia en la atmósfera dilatado en el tiempo del polen de *Cupressaceae* por la gran cantidad de taxones que lo integran con diferentes épocas de floración. Durante el periodo 1994-2004, los tipos polínicos arbóreos por orden de relevancia cuantitativa fueron *Platanus* (25,1%), *Cupressaceae* (22,5%), siendo el *Olea* menos prevalente (3,5%) (Gutiérrez Bustillo y col., 2007).

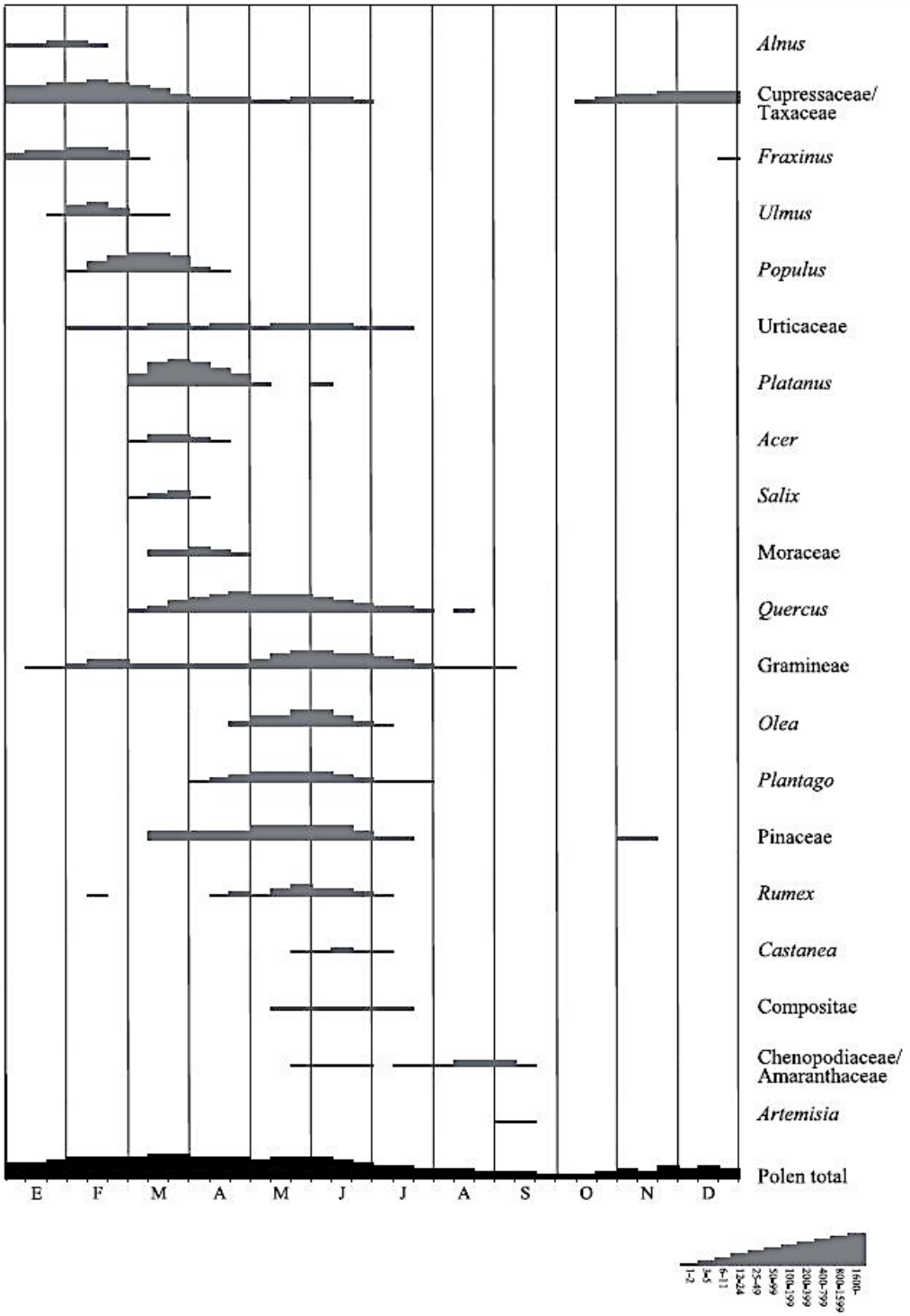

Figura 6. Calendario polínico de la atmósfera de Madrid. Periodo 1994-2004. Tomada de Gutiérrez y col., 2006.

Tabla 1. Tipos polínicos de la atmósfera de Madrid con una representación igual o superior al 0,5 del expectro polínico total (* Excluido *Artemisia*).

TIPO POLÍNICO	*Granos de polen (media 1994-2004)*	*% PT*
Acer	235	0,5
Alnus	149	0,3
Artemisia	61	0,1
Chenop./Amaranth.	308	0,7
Castanea	150	0,3
Compositae*	172	0,4
Cupressaceae/Taxaceae	10599	22,5
Cyperaceae	73	0,2
Ericaceae	60	0,1
Fraxinus	736	1,6
Gramineae	3553	7,5
Moraceae	222	0,5
Olea	1672	3,5
Pinaceae	2221	4,7
Plantago	1045	2,2
Platanus	11850	25,1
Populus	3736	7,9
Quercus	6219	13,2
Rumex	583	1,2
Salix	204	0,4
Ulmus	621	1,3
Urticaceae	535	1,1

Tomada de Gutiérrez y col., 2006. PT: polen total.

1.4 POLINOSIS. PREVALENCIA DE SENSIBILIZACIÓN Y FENOTIPOS CLÍNICOS

Según los datos que se desprenden del estudio Alergológica 2005, los pólenes son los alérgenos causantes de rinitis alérgica más frecuentes en España (51%), seguidos de los ácaros, los epitelios de animales y los hongos. En el mismo estudio, los pólenes son causa del 43% de los asmas alérgicos.

En el análisis por Comunidades Autónomas, los pólenes resultaron ser la primera causa de rinitis en Comunidad de Madrid (75,2%). Dentro de los pólenes, las sensibilizaciones más frecuentes son las gramíneas y el olivo, seguido de chenopodio, ciprés, plátano y otras malezas.

Los pólenes de árboles con interés alergológico en la zona del Mediterráneo son de la familia de cupresáceas y el olivo por la gran cantidad de árboles que existen en dicha zona (D'Amato y col., 2007; Ariano y col., 1994).

1.4.1 Polen de *Cupressaceae*

Prevalencia

La prevalencia de sensibilización a polen de cupresáceas ha aumentado en las últimas décadas debido no sólo a su presencia en la atmósfera cada vez mayor, sino también, a un mejor diagnóstico de este tipo de alergia mediante el uso de extractos de *C. arizonica* en lugar de *C. sempervirens*, así como a mejoras en la caracterización y estandarización de alérgenos (Ariano y col., 2001)

La sensibilización a polen de *Cupressaceae* es variable dependiendo de la exposición y la población estudiada. Así, el porcentaje de sensibilización es del 5% al 13% en la población general, según la exposición al polen, y entre el 9-35%, según los estudios (Charpin y col., 2013), llegando incluso hasta 62,9%, como el observado en población italiana (Sposato y col., 2014).

En Madrid se han realizado diversos estudios multicéntricos del Comité de Aerobiología que han demostrado mediante pruebas cutáneas, que la prevalencia de sensibilización a polen de cupresáceas ha sufrido un incremento notable, desde el 1% de pacientes afectados en 1980 a un 23% en 1995, la mayoría de ellos polisensibilizados en especial con polen de gramíneas, encontrando sólo un 1,2% de monosensibilizados (Subiza y col., 1995). En 2003 el Comité de Aerobiología de la SEAIC, realizó un estudio multicéntrico en 13 ciudades españolas para valorar la prevalencia de sensibilización mediante PC con 3 extractos (Cupressus arizonica, *Cupressus sempervirens* y *Juniperus oxycedrus*). La prevalencia fue muy similar con los tres extractos por reactividad cruzada, pero sí hubo notables diferencias entre las distintas ciudades. Las mayores

prevalencias de PC positivas a cupresáceas se produjeron en Madrid (58%) y Toledo (30%) y la menor en Bilbao (<2%) (Moral de Gregorio y col., 2016).

También se ha demostrado una correlación significativa entre los recuentos de polen de cupresáceas y la prevalencia de sensibilización mediante PC a *C. arizonica* en diferentes ciudades (Moral, 2003).

La duración de la estación polínica de pólenes de ciprés, olivo y parietaria, también puede aumentar el porcentaje de sensibilizaciones a estos pólenes (Ariano y col., 2010).

La importancia creciente del polen de ciprés, así como las diferencias geográficas en cuanto a su prevalencia han quedado constatadas en el estudio epidemiológico nacional Alergológica 2005. Los datos globales (sin especificar ciudades) recogidos de Alergológica 2005 apuntan que un 9,2% de los pacientes con rinoconjuntivitis alérgica (Navarro y col., 2009) y un 7,5% de los pacientes con asma (Quirce, 2009) estaban sensibilizados a polen de ciprés. Hay que destacar los porcentajes de sensibilización a polen de ciprés encontrados en la Comunidad de Madrid: 34,4% (rinitis) y 24,7% (asma), ocupando el primero y segundo lugar, respectivamente, respecto a otras Comunidades Autónomas. En el estudio de Alergológica 1992 no se evidenció la sensibilización a ciprés. En el estudio Ibérico realizado en España y Portugal entre octubre de 2004 y marzo de 2005, la prevalencia de sensibilización cutánea al polen de *C. arizonica* fue similar en los dos países, con valores de 48% en rinitis y 52% en asma (Pereira y col., 2006).

El Hospital Universitario Fundación Alcorcón participó con 50 pacientes del área sanitaria ocho de Madrid en el estudio multicéntrico de la red Vegetalia (2003-2005) (Cuesta-Herranz y col., 2010). Los resultados globales encontrados fueron una frecuencia de PC positivas para polen de *C. sempervirens* del 39% y una frecuencia de IgE específica frente a Cup s 1 mediante sistema ADVIA Centaur® del 34,4%. Sin embargo, en los pacientes de Alcorcón la frecuencia de PC positivas a *C. sempervirens* fue del 44% y la frecuencia de resultados positivos de IgE específica fue del 50% para Cup s 1, alérgeno principal de este polen.

En estudios más recientes en ciudades europeas como Montpellier (Francia) se ha encontrado una prevalencia de sensibilización a polen de ciprés mediante PC del 33,2% de pacientes con síntomas respiratorios, identificándose un 17% de monosensibilizados (Caimmi y col., 2012).

Igualmente, en Italia se observado un incremento de la sensibilización a polen de ciprés. Dos estudios así lo demuestran: uno en Toscana con una prevalencia de 36% mediante PC positivas a *C. sempervirens* y *J communis* (Sposato y col., 2013) y otro estudio en diferentes áreas de Italia (Sposato y col., 2014): el 62,9%, 32,7% y 16,1% de los pacientes que vivían en el centro, sur y norte de Italia, respectivamente, mostraron sensibilización a polen de ciprés ($p<0.0001$). Un 17,2% eran monosensibilizados, sobre todo de la zona sur.

Otros estudios en población italiana encuentran una prevalencia del 42,7% a Cup a 1, mediante microarrays (Scala y col., 2010). El estudio epidemiológico EXPO I, (Barber y col., 2008), observó una prevalencia de Cup s 1 del 14,9%.

Un estudio reciente realizado en la población del sur de la Comunidad de Madrid, encontró una prevalencia de monosensibilización a *C. arizonica* del 12,8% entre los pacientes sensibilizados a coníferas (Domínguez-Ortega y col., 2016).

Clínica

La forma de manifestación es la de una rinitis invernal recurrente, por lo que la alergia a ciprés ha sido tradicionalmente infradiagnosticada (Mari y col., 1997). Los primeros pacientes con alergia a *Cupressaceae* en Madrid fueron publicados en 1996, la mayoría polisensibilizados (Caballero y col., 1996).

La clínica predominante en los pacientes monosensibilizados a *Cupressaceae* es la rinitis en un 100 % y el asma en 19,2% (Bousquet y col., 1993). Otros autores publican 64,4% conjuntivitis, 92,3% rinitis y 39,2% asma en los pacientes alérgicos al polen de ciprés, aunque la mayoría son polisensibilizados (Caimmi y col., 2012).

Autores españoles publican porcentajes de 92,3% de rinoconjuntivitis y 15,3% de asma en pacientes monosensibilizados (Díaz de la Guardia y col., 2006).

En estudios italianos se ha publicado rinitis (90,7-100%) y asma (0-13%) en pacientes monosensibilizados (Sposato y col., 2014). Los mismos autores encuentran que en los pacientes polisensibilizados la prevalencia de rinitis (37%-96%), conjuntivitis (31%-74%) y asma (12,5%-36%) se incrementa del sur al norte de Italia.

Se ha descrito bronquitis eosinofílica por sensibilización a polen de ciprés arizónica (Bobolea y col., 2011). Las cupresáceas pueden producir también clínica cutánea (dermatitis y/o urticaria), por contacto directo en las podas (Palomares y col., 2008).

Debido al solapamiento de la polinización de las diferentes cupresáceas y a la reactividad cruzada entre ellas, es frecuente que los pacientes presenten síntomas de forma continuada durante varios meses. Por ejemplo, *Juniperus oxycedrus* y *Juniperus communis* que florecen antes y después, respectivamente, podrían prolongar la estación polínica (Sposato y col., 2013). Además, la exposición a polen viejo de ciprés podría prolongar la exposición y la sensibilización al mismo, como se demuestra por estudios de actividad *in vivo* e *in vitro* años después de su recolección (Ariano y col., 2006). Otro dato más que apoya la posibilidad de síntomas perennes por este polen, es que hay estudios donde se ha encontrado que los granos de polen de ciprés pueden detectarse en el polvo de casa casi todo el año y que no presentan cambios en la potencia alergénica *in vitro* a lo largo de un tiempo de 10 meses en el interior de las casas, por lo que la exposición se alargaría y podría justificar los síntomas perennes (Shahali y col., 2013). Los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés publicados por (Sposato y col., 2014), residentes en diferentes zonas de Italia, refieren además de la época invernal, síntomas en primavera el 16-100% de los sujetos.

En el estudio de Subiza en pacientes de Madrid, se objetivó correlaciones de los síntomas con los recuentos de pólenes del mismo día, pero sobre todo con los recuentos de dos días después, lo que apunta a la presencia de reacciones inmediatas y tardías, siendo éstas últimas las más intensas en este grupo de pacientes (Subiza y col., 1998).

Los pacientes monosensibilizados a ciprés tienen niveles normales de IgE total o incluso por debajo de lo normal en comparación con los pacientes polisensibilizados, y además suelen presentar sintomatología a una edad más avanzada que el resto de pacientes polínicos de su misma área geográfica (Bousquet y col., 1993).

1.4.2 Polen de olivo

Prevalencia

La frecuencia de sensibilización varía según la zona geográfica (30-40% en Italia, 80% en sur de la península Ibérica) (Matricardi y col., 2016).

En general se observa una correlación significativa entre la prevalencia de las PC y la presencia atmosférica de polen de *Olea,* con elevada prevalencia en provincias olivareras (Jaén, Sevilla, Ciudad real y Toledo). Este hecho ha quedado de manifiesto en 2 estudios multicéntricos de polinosis en nuestro país: 1995, en 12 ciudades españolas (Subiza y col., 1998) y 2003, 13 ciudades españolas (Feo Brito y col., 2003). Sin embargo, en los pacientes de Madrid encontramos porcentajes de sensibilización cutáneas elevados, 61% (1995), 58% (2003), similar a la de Toledo (58% en 2003) a pesar de presentar Madrid recuentos anuales más bajos de *Olea europaea* (2.712 granos/m^3) frente a los 11.008 granos/m^3 de Toledo (Moral y col., 2016). Se ha cuestionado la relevancia clínica de dicha sensibilización en comparación a polen de gramíneas, mediante la valoración de las variaciones en las ventas anuales de antihistamínicos (Subiza y col., 1998).

Según Alergológica 2005 (sin especificar ciudades), la sensibilización a polen de olivo fue 30% de los pacientes con rinitis, aumentando respecto a los datos de Alergológica 1992 que fue 27% (Navarro y col., 2009). Sin embargo, la sensibilización a polen de olivo en 2005 fue 27% de los pacientes asma, en comparación al estudio de 1992 que fue 42% (Quirce y col., 2009). Teniendo sólo

en cuenta los datos de la Comunidad de Madrid, el polen de olivo fue clínicamente relevante en el 45,6% de los pacientes con rinitis y en 34,7% de los pacientes con asma (Alergológica 2005).

Los resultados globales encontrados en el Estudio de la Red Vegetalia fueron: 64% de PC positivas para polen de *Olea*, 46,4% de IgE específica frente a Ole e 1 mediante sistema ADVIA Centaur®, 0%-5% de IgE específica frente a Ole e 9 en los diferentes centros participantes (la mayoría de Madrid y otros de Las Palmas, Barcelona y Pamplona). La excepción fue Jaén (35%), una zona de elevada exposición a polen de olivo. Sin embargo, en los pacientes de Alcorcón la frecuencia de PC positivas a *Olea* fue del 74% y la frecuencia de resultados positivos de IgE específica fue del 56% para Ole e 1, alérgeno principal de este polen, y 0% para Ole e 9 (Cuesta-Herranz y col., 2010).

En el estudio Ibérico la prevalencia de sensibilización cutánea al polen de *Olea europaea* fue similar en los dos países España y Portugal con valores de 48% de las rinitis y 52% de los asmas (Pereira y col., 2006).

Clínica

El polen de olivo es capaz de inducir síntomas de rinoconjuntivitis y asma (Liccardi y col.,1996). La alergia al polen de olivo es más frecuente en mujeres (Feo Brito y col., 2003). El asma es frecuente (60%), según autores (Brito y col., 2011; López-Serrano y col., 1994). La presentación estacional es la más frecuente, pero es peculiar la persistencia de los síntomas perennes en los pacientes alérgicos al polen de olivo por presencia en la atmósfera de pólenes de diferentes plantas de la familia de *Oleaceae* (Liccardi y col., 1996; Kirmaz y col., 2005). En España, se ha publicado que los otros dos géneros de la familia (*F. excelsior, L. vulgare*) pueden producir síntomas febrero y julio, respectivamente, lo que prolongaría los meses de síntomas en los pacientes sensibilizados a oleáceas (Guerra y col., 1995; Cariñanos y col., 2002). En los pacientes alérgicos a oleáceas puede

prolongarse la sintomatología por el efecto “priming” por la polinización de estos pólenes (Cariñanos y col., 2002).

Los altos niveles de polen en las comarcas olivareras podrían prolongar la exposición de los pacientes fuera de la estación polínica, como sucede durante los meses de diciembre-enero, en las tareas de recolección. Pero este fenómeno se presenta también en zonas con baja concentración de polen, lo cual sugiere que los antígenos de olivo no están implicados en este proceso y parece relacionarse más con la respuesta de los enfermos a otros desencadenantes del asma bronquial (contaminantes ambientales, cambios meteorológicos, infecciones víricas, irritantes inespecíficos, etc.), que serían los responsables de la clínica persistente en el resto de las estaciones (Feo Brito y col., 2003).

Es importante señalar que la exposición ambiental al polen de olivo influye en la clínica (Barber y col., 2007). En áreas de máxima exposición ambiental al polen de olivo, los síntomas rinoconjuntivitis y asma en pacientes sensibilizados son más frecuentes (100% rinoconjuntivitis y 60% asma) (Brito y col., 2011) y severos produciéndose verdaderas epidemias de exacerbaciones asmáticas en los periodos de máxima concentración alergénica (Florido y col., 1999). Un análisis de componentes moleculares encuentra que los pacientes de zonas de alta exposición presentaban en el 75% de los pacientes, una sensibilización a tres o más alérgenos del polen de olivo, siendo Ole e 1, Ole e 2, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10 los alérgenos identificados con una frecuencia mayor del 50%, por lo que habría que considerarlos como alérgenos mayores (Quiralte y col., 2007).

El análisis por componentes en diferentes áreas de la geografía española (centro y sur, y levante) demostró la importancia de la exposición al polen de olivo en relación con el perfil de sensibilización, lo que conlleva a que alérgenos secundarios del polen de olivo, como Ole e 7 y Ole e 9, se comporten como alérgenos principales o mayores en áreas de máxima exposición alergénica, y a considerarlos como marcadores relevantes de gravedad clínica debido a su asociación con asma (Barber y col., 2008).

Además, la interrelación de factores genéticos con factores ambientales, influye en el desarrollo de sensibilizaciones y en los diferentes patrones clínicos. Así, analizando marcadores del complejo mayor de histocompatibilidad, se ha encontrado fuerte asociación entre HLA–DR7 y DQ2 con sensibilización a Ole e 1 y Ole e 2 y, entre DR2 con sensibilización a Ole e 10 (Cárdaba y col., 2007).

Un estudio epidemiológico, observacional, transversal y multicéntrico en 1.287 pacientes adultos con patología respiratoria alérgica de toda España, demostró que los pacientes alérgicos al polen tenían peor calidad de vida medida por cuestionarios específicos, que los alérgicos a los ácaros, y que los asmáticos por polen de olivo o polen de gramíneas y olivo presentaban también peor calidad de vida (Delgado y col., 2013).

Se conoce poco sobre el umbral de reactivación de los síntomas por polen de olivo. Se han publicado niveles umbrales de reactivación en Jaén de 400 granos/m^3 de aire en 56 pacientes monosensibilizados al polen de olivo (Florido y col., 1999). Un estudio posterior en Ciudad Real con 20 pacientes monosensibilizados a polen de olivo (Brito y col., 2011), demostró niveles más bajos con umbrales de 162 granos/m^3 y 22,5 ng/m^3 de aeroalérgenos de olivo (equivalentes a 0,9 ng/m^3 de Ole e 1). Los mismos autores (Feo Brito y col., 2003) objetivaron una bajada en el umbral de reactivación bajando al final de la estación polínica (34 granos /m^3), que es debido al efecto facilitador de Connell, que hace que sea necesaria menor cantidad de alérgeno para producir síntomas de alergia (Connell, 1968).

Se han descrito casos de dermatitis alérgica de contacto por aceite de oliva (Malmkvist-Padoan y col., 1990), madera del árbol de olivo (Hausen y col., 1981), asma y/o rinoconjuntivitis por inhalación de partículas de la molienda de la aceituna (Palomares y col., 2008a) y alergia ocupacional por sobreexposición a Ole e 9 en personal de laboratorio (Palomares y col., 2008b).

1.5 ALÉRGENOS DE POLEN DE ÁRBOLES

1.5.1 Generalidades

Los alérgenos, generalmente, son proteínas o glicoproteínas capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas. Este proceso, denominado sensibilización, tiene lugar tras una repetida exposición al alérgeno, ya sea por inhalación (aeroalérgenos), ingestión (alérgenos alimentarios) o por inyección (alérgenos presentes en venenos) (Villalba y col., 2015). También son alérgenos aquellas proteínas que no son capaces de sensibilizar por ellas mismas, pero que inducen reacciones alérgicas en pacientes previamente sensibilizados a alérgenos homólogos de otras fuentes biológicas. Esta reactividad cruzada se produce por la similitud en las secuencias de aminoácidos de estas proteínas que, según los alérgenos implicados puede ser variable. Si la identidad de secuencia entre los alérgenos de dos fuentes alergénicas diferentes es alta, se preservan los epítopos comunes que son reconocidos por moléculas IgE, dando lugar a fenómenos de reactividad cruzada entre alérgenos de diferentes pólenes (Aalberse y col., 2001). Empíricamente se ha observado que para que exista reactividad cruzada entre dos proteínas, es necesario una identidad de secuencia mayor del 65%, mientras que identidades por debajo del 35% difícilmente pueden dar lugar a reactividad cruzada aunque hay excepciones que lo contradicen, pudiendo existir valores intermedios que conducen a una reactividad cruzada en determinados pacientes (Aalberse y col., 2000).

La reactividad cruzada viene dada por la proximidad taxonómica como ocurre entre alérgenos de la misma familia, lo que permite en el caso de alérgenos principales, utilizar uno de ellos como marcador de sensibilización a los pólenes de las plantas de la misma familia con bastante fiabilidad, en sus implicaciones diagnósticas y terapéuticas (Weber y col., 2003). Esto ocurre en el caso de polen de árboles como las Oleáceas (Lombardero y col., 2002) y Cupresáceas (Pham y col., 1994; Mari y col., 1996).

Cuando la reactividad cruzada se da entre plantas no relacionadas y con marcada distancia filogenética, se dice que están implicados panalérgenos. Son proteínas con una función esencial para la planta y cuya estructura se ha mantenido inalterable a lo largo de la evolución, lo que hace que tengan una elevada identidad de secuencia entre muy diferentes especies dando lugar a fenómenos de reactividad cruzada. Dentro del reino vegetal, se puede dar tanto entre pólenes de diferentes familias botánicas, y entre pólenes y otras partes de las plantas, frutos y semillas (Ferreira y col., 2004).

Se denominan alérgenos principales ("major allergens") a aquellos alérgenos procedentes de una determinada fuente con una frecuencia de reconocimiento superior al 50% de los pacientes alérgicos a dicha fuente y se denominan alérgenos secundarios ("minor allergens") cuando los reconocen menos del 50% de los pacientes (King y col., 1995).

1.5.2 Funciones bioquímicas de alérgenos de los pólenes de árboles

Los pólenes han de mantenerse en el ambiente durante largos periodos de tiempo, y son capaces de desencadenar reacciones alérgicas en poco tiempo a través del contacto con mucosas del paciente alérgico. Los alérgenos del polen son moléculas solubles en agua, entre 5-90 kDa. Tienen funciones bioquímicas diversas. Hay proteínas de defensa frente a patógenos (PR), proteínas con actividad enzimática, estructural, reguladora, proteínas que unen ligandos y/o iones y otras con funciones desconocidas. Los alérgenos de polen se han clasificado en 29 de las 7868 familias de proteínas que existen. Las tres familias de alérgenos más frecuentes entre los pólenes con las expansinas, profilinas y proteínas ligantes de calcio (Raudauer y col., 2006).

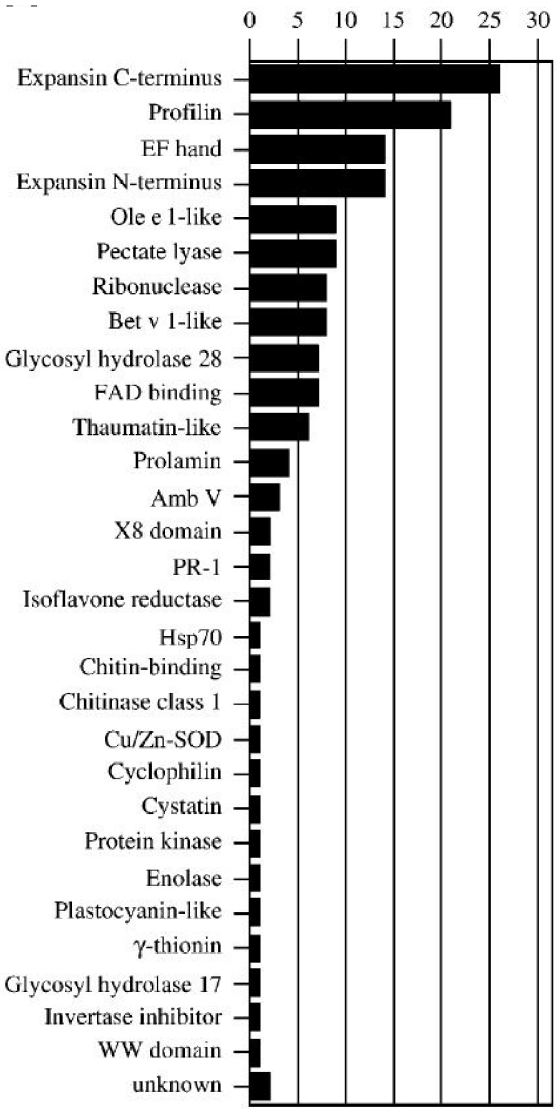

Figura 7. Distribución de las familias de proteínas alergénicas de los pólenes. Tomada de Raudauer y col., 2006.

En los últimos veinticinco años ha tenido lugar un gran avance en la biología molecular, y junto con las técnicas de química de proteínas aplicadas a la caracterización de alérgenos de diferentes fuentes biológicas, se ha podido llevar a cabo su clonaje y su producción como proteínas recombinantes. Esto ha permitido una caracterización estructural y funcional más detallada y sobre todo la opción obtener grandes cantidades de estas moléculas para su aplicación en el diagnóstico molecular o por componentes.

1.5.3 Clasificación botánica y distribución geográfica de los pólenes alergénicos

La distribución geográfica de las plantas condiciona los perfiles de sensibilización alergénica debido a la exposición a sus pólenes. Como se ha dicho al principio del capítulo, los árboles pertenecientes a los órdenes Fagales, Lamiales, Proteales, y Pinales son las fuentes alergénicas más potentes, repartidas por casi todo el mundo (Asam y col., 2015). Los árboles pertenecientes al órden Lamiales y Pinales son los más representativos en el área mediterránea, así como en regiones de clima mediterráneo del sur de África, norte y sur de América y Australia. Los árboles pertenecientes al órden Fagales son frecuentes en climas templados de regiones del norte y centro de Europa, Norteamérica, este de Asia y noreste de África. Los árboles del órden de Proteales predominan en el sur de Europa (Matricardi y col., 2016).

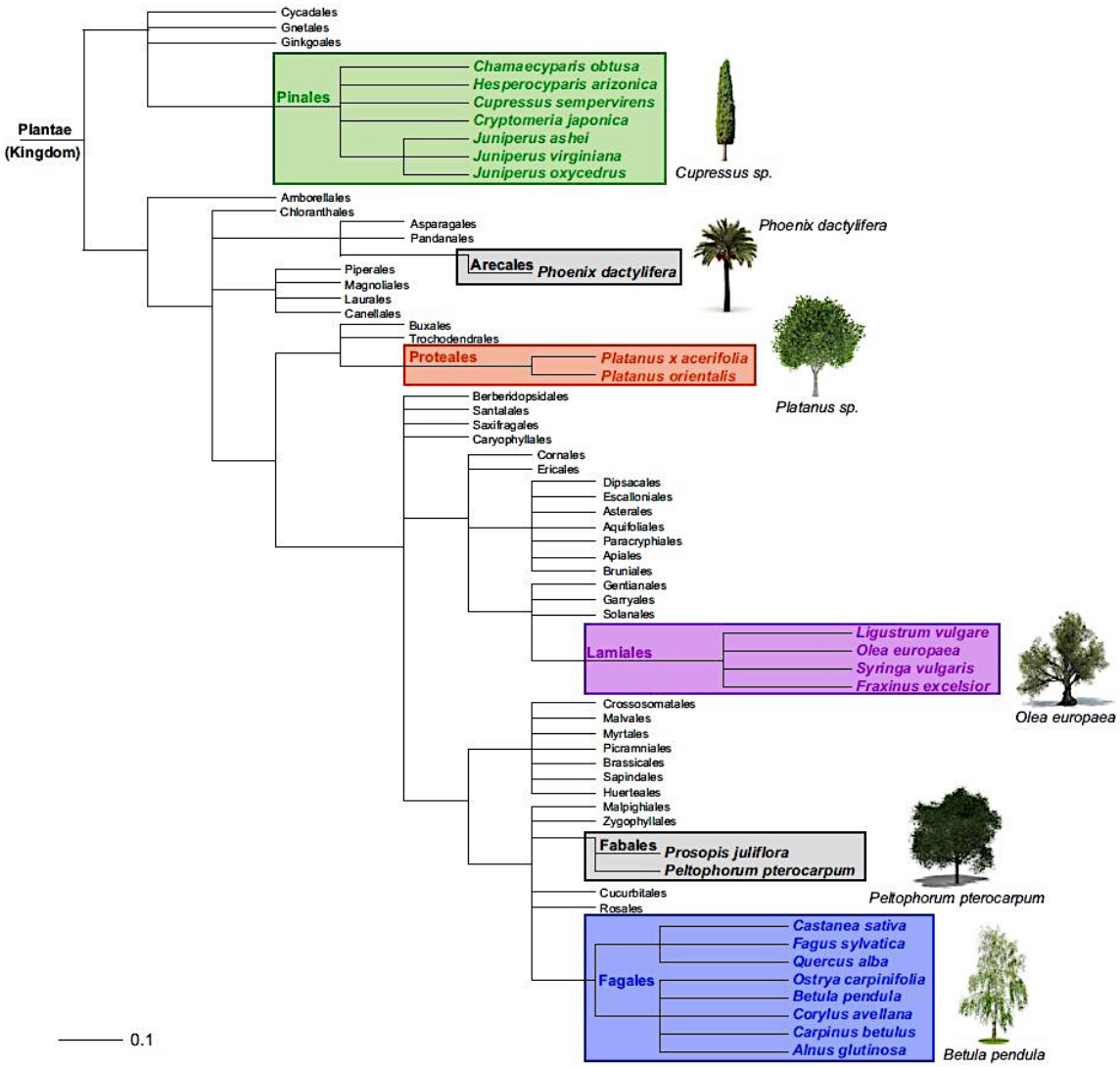

Figura 8. Árbol filogenético basado en taxonomía NCBI (http: // phylot.biobyte.de/).

Se destacan en colores los órdenes taxonómicos que contienen la especie que ha sido reconocida por la base de datos de nomenclatura de alérgeno WHO/IUIS (www.allergen.org). Tomada de Asam y col., 2015.

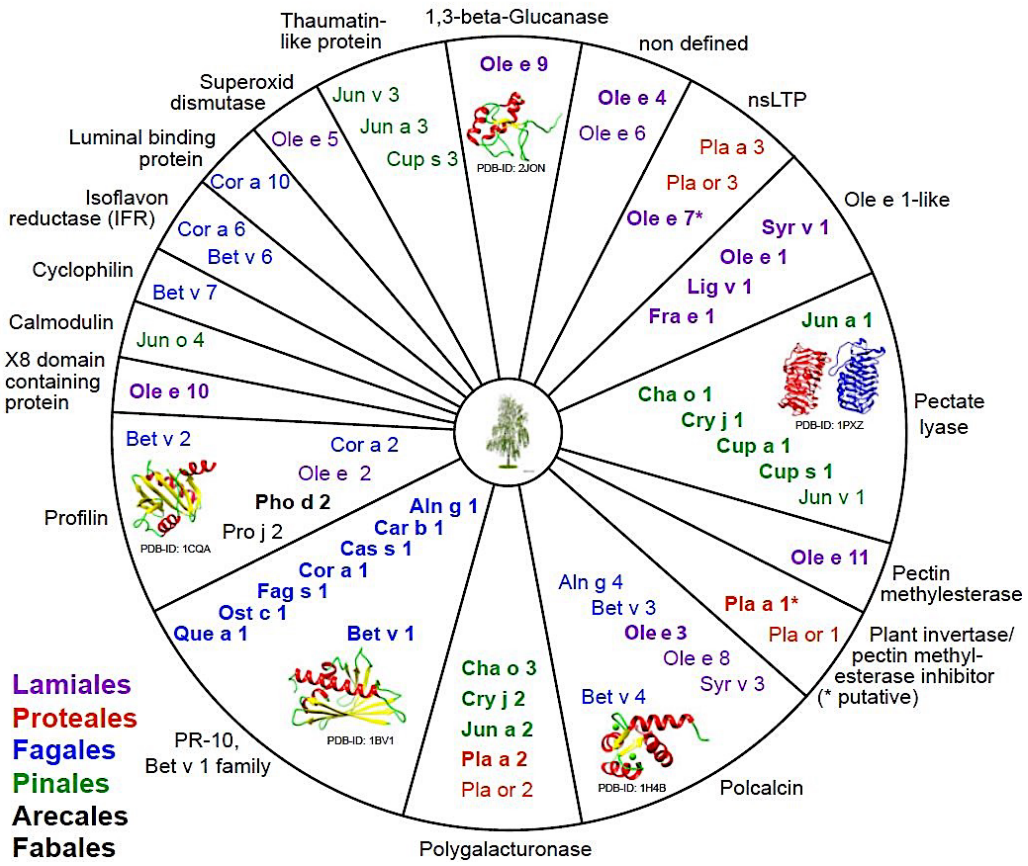

Figura 9. Representación esquemática de los alérgenos de árboles, según familia de proteínas y su función.

Los alérgenos principales están resaltados en negrita y los alérgenos secundarios en letra normal. Los colores varían según la familia a la que pertenecen. Las estructuras de los alérgenos se han obtenido del RCSB PDB (Research Collaborative for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, www.rcsb.org). Tomada de Asam y col., 2015.

1.5.4 Alérgenos de *Cupressaceae*

Existe gran dificultad para producir extractos de polen de ciprés debido a su bajo contenido de proteínas y su elevado contenido en carbohidratos.

Se han purificado 4 grupos de alérgenos que se han subclasificado en relación con su actividad biológica: enzimas como las pectato liasas, poligalacturonasas (ambos alérgenos principales), proteínas relacionadas con la patogénesis de las

plantas, como las taumatinas y proteínas de unión al calcio como alérgenos menores (Charpin y col., 2005).

Tabla 2. Alérgenos de *Cupressaceae.*

Alérgeno	Tejido	Familia	Mm (kDa) (PAGE-SDS)	Prevalencia
Cup a 1	Polen	Pectato liasa	43	100%
Cup a 3	Polen	Taumatina-like	34	33-44%
Cup a 4	Polen	Polcalcina		9,6%
LTP-like	Polen	LTP	15	
Cup s 1	Polen	Pectato liasa	43	100%
Jun o 1	Polen	Pectato liasa		
Jun o 4	Polen	Proteína ligante de Ca^{2+}	29	14,7%
Jun a 1	Polen	Pectato liasa	43	71,4%
Jun a 2	Polen	Poligalacturonasa	43	100%
Jun a 3	Polen	Taumatina-like	30	43%

Modificada de Matricardi y col., 2016. Mm: masa molecular determinada mediante PAGE-SDS (WHO/IUIS, www.allergen.org); [a]: % dependiente de polución ambiental (Cortegano y col., 2004); [b]: Pico de Coaña y col., 2010; [c]: Sánchez-López y col., 2011.

Cup a 1

Cup a 1 (43 kDa) es el alérgeno principal de *C. arizonica* (Di Felice y col., 1994), el cual ha sido purificado y analizada su estructura glicoproteica (Alisi y col., 2001). Además, se ha clonado, secuenciado y producido el alérgeno recombinante en *E. coli*, rCup a 1 (Aceituno y col., 2000).

Cup a 3

Cup a 3 (21 kDa) es una taumatina-like, que pertenece a la familia PR-5, identificada y clonada (Cortegano y col., 2004). La alergenicidad depende del nivel de polución ambiental de diferentes áreas geográficas, siendo más elevado cuanto más polucionadas. Reconocida por el 63% de pacientes alérgicos al polen de *C. arizonica* según Cortegano y col. Se ha demostrado homología con Jun a 3.

Cup a 4

Cup a 4 (24 kDa) pertenece a la familia de polcalcinas (Pico de Coana y col., 2010), con capacidad de unir iones calcio. Se expresa en los granos de polen maduros y es reconocido por el 9,6% de los pacientes alérgicos a *C. arizonica*.

LTP-like

Se ha detectado en 2011 un alérgeno de polen de *C. arizonica* con una masa molecular de 15 kDa, en pacientes con alergia a melocotón por sensibilización a Pru p 3 y alergia respiratoria por polen de ciprés, que podría tratarse de una proteína de transferencia de lípidos (LTP-*like*, lipid-tranfer protein) (Sánchez-López y col., 2011).

Cup s 1

Cup s 1 (43 kDa) fue descrito como el alérgeno principal del *C. sempervirens* (Ford y col., 1991). Es una pectato liasa con identidad del 95% con Cup a 1. Este alérgeno ha sido producido en forma recombinante, rCup s 1 en *P. pastoris* (Monsalve y col., 2003). Se reconoce como alérgeno principal de polen de ciprés (Arilla y col., 2004).

Estudios posteriores han detectado alérgenos “nuevos” de *Cupressus*. Shahali y col. han detectado un alérgeno de 35 kDa de *C. arizonica* en 15 pacientes de Teherán con síntomas en la época de polinización de ciprés y en su mayoría con PC con extracto completo e *Immuno* CAP negativo a *C. arizonica* (Shahali y col., 2009). Otro alérgeno de 14 kDa de masa molecular en *C. sempervirens* (Shahali y col., 2010), reconocido por el 48% de pacientes sensibilizados a polen de *C. sempervirens*, en Marsella (Francia) y con reactividad cruzada sólo con *C. arizonica y Cryptomeria japonica* (Shahali y col., 2012b). Estudios de proteómica han identificado 10 nuevos alérgenos, entre ellos, Glucanasa-like en extracto de polen de *Cupressus sempervirens* (Shahali y col., 2012a).

Jun o 1, Jun o 4

Se han descrito 2 alérgenos en el polen de *Juniperus oxicedrus*: Jun o 1, de 42 kDa (Iacovacci y col., 1998), una pectato liasa; y Jun o 2 (cuya nomenclatura ha sido modificada por Jun o 4). Jun o 4 es una proteína con 4 sitios de unión de calcio al igual que Ole e 8, alérgeno de polen de olivo, aunque con baja similitud de secuencia de aminoácidos (Tinghino, y col., 1998). Esto podría explicar la reactividad cruzada entre taxones.

Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3

Mediante técnicas de biología molecular se han purificado, identificado y clonado los alérgenos del *Juniperus ashei*: Jun a 1 (43 kDa) (Midoro-Horiuti y col., 1999), una pectalo liasa, Jun a 2 (43 kDa), (Yokoyama y col., 2000), una poligalacturonasa y Jun a 3 (30 kDa) (Midoro-Horiuti y col., 2000), una taumatina, proteína relacionada con la patogénesis de las plantas.

Se ha comprobado una identidad de secuencia entre el 71-82% entre alérgenos con la función de poligalacturonasa. Estos alérgenos sensibilizan hasta el 82,5% de los pacientes alérgicos a familia de *Cupressaceae*.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el polen de *J. ashei* es 20 veces más potente que *el de C. sempervirens* y 11 veces más potente que el de *C. arizonica* por presentar mayor contenido del alérgeno principal de 42 kDa (André y col., 2000), por lo que se ha utilizado como estándar para el diagnóstico de la alergia a familia *Cupressaceae* (Hrabina y col., 2003). Sin embargo, y a pesar de la elevada reactividad cruzada con *Cupressus*, *J. ashei* no es una especie endémica de Europa, por lo que podría no representar realmente la exposición de las especies mediterráneas como *Cupressus* (Shahali y col., 2012).

1.5.5 Alérgenos de *Olea europaea*

En las últimas dos décadas se ha producido un gran avance en la identificación de los alérgenos del polen de olivo, con un mejor conocimiento y aplicabilidad práctica de gran interés para los alergólogos y, la consiguiente repercusión clínica sobre los pacientes, que ha permitido un correcto diagnóstico y tratamiento con inmunoterapia específica.

El perfil inmunológico del polen de olivo (*Olea europaea*) comprende varios alérgenos (Villalba y col., 2014).

Tabla 3. Alérgenos de *Olea europaea*.

Alérgeno	Tejido	Familia	Mm (kDa) (PAGE-SDS)	Prevalencia
Ole e 1	Polen	Ole e 1-like	16	55-90%*
Ole e 2	Polen	Profilina	15	0,24
Ole e 3	Polen	Polcalcina	9	20-30%
Ole e 4	Polen	Fragmento de Ole e 9	32	0,8
Ole e 5	Polen	Superóxido dismutasa	16	0,35
Ole e 6	Polen	Desconocida	10	10-55%*
Ole e 7	Polen	nsLTP	43017	< 10-47%*
Ole e 8	Polen	Proteína ligante de Ca^{2+}	21	<5%
Ole e 9	Polen	β-1,3-glucanasa	46	< 10-65%*
Ole e 10	Polen	CBM-43	11	< 10-69%*
Ole e 11	Polen	Pectin metilesterasa	39.4	56-77%*
Ole e 12	Polen	Isoflavona reductasa-like	36	< 10-25%*
Ole e 13	Fruto	Taumatina-like	23	Desconocido

Modificada de Villalba y col., 2014 y Matricardi y col., 2016.

CBM: módulo de unión de carbohidratos; Mm: masa molecular determinada mediante PAGE-SDS (WHO/IUIS, www.allergen.org); nsLTP: proteína de transferencia de lípidos no específica; Prevalencia: (*) porcentaje dependiente de la población. .

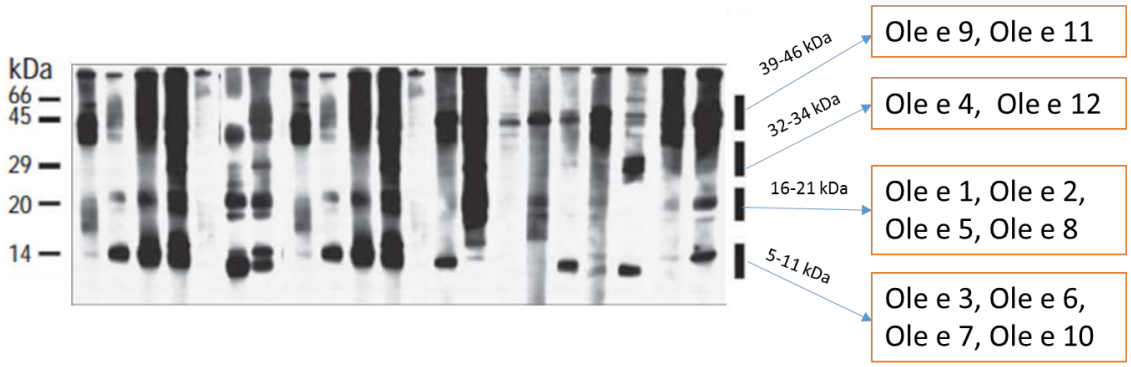

Figura 10. Inmunodetección de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. Alergograma de polen de *Olea*. Modificado de Rodríguez y col., 2007.

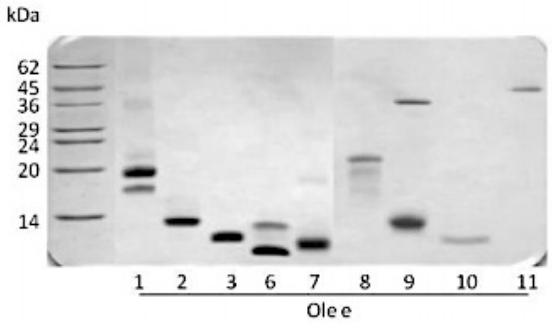

Figura 11. Diferentes alérgenos purificados de polen de *Olea.* Tomado de Villalba y col., 2014.

Ole e 1

Cerca del 80 % de los pacientes alérgicos al polen de olivo son sensibles a Ole e 1, proteína con una cadena polipeptídica de 145 aminoácidos que exhibe dos variantes, una glicosilada con un N-oligosacárido unido a la Asn en posición 111, de 20 kDa de masa molecular y otra no glicosilada de 18,5 kDa (Villalba y col., 1993). Este alérgeno presenta un gran polimorfismo con más de 20 isoformas que contribuyen de forma diferente a la alergenicidad de la molécula y a aumentar la complejidad en el diagnóstico (Villalba y col., 1994; Batanero y col., 1994; Batanero y col., 1996; Batanero y col., 1999). Hasta la fecha no tiene función biológica asignada, pero parece estar implicada en los procesos de hidratación y germinación del polen. Ole e 1 es una proteína muy abundante en el polen de

olivo (aproximadamente el 20% de la proteína total), lo que podría explicar su importante contribución a la alergenicidad. Ole e 1 es el alérgeno mejor caracterizado del polen de olivo, expresado específicamente en el polen y no en el fruto aceituna, hojas o tallo. Es el principal alérgeno del polen de olivo y marcador de sensibilización primaria o genuina al polen de Oleáceas (Palomares y col., 2006). La potencia alergénica y la cantidad de Ole e 1 puede ser muy diferente entre las diferentes variedades del polen de *Olea europaea* (Conde-Hernández y col., 2002; Carnes y col., 2002; Fernández-Caldas y col., 2007).

Ole e 2

La profilina del olivo se ha denominado Ole e 2 (15 kDa), y ha sido purificado (Ledesma y col., 1998) y secuenciado (Asturias y col., 1997), y es responsable de la sensibilización en el 24% de los pacientes (Quiralte y col., 2002) con alergia al polen de olivo. Presenta un 70-90% de identidad con otras profilinas (Sirvent y col., 2011). Por su estructura conservada se comporta como panalérgeno responsable de reactividad cruzada entres profilinas. Se ha relacionado con Síndrome de Alergia Oral (SAO) con frutas frescas.

Ole e 3

Ole e 3 (9,2 kDa) es una proteína específica de polen que une iones calcio (polcalcinas) y su función biológica parece ser tamponadora de iones Ca^{2+}. Tiene una prevalencia del 20 al 50% de los pacientes en zonas con alta densidad de olivares (Ledesma y col., 1998). Es un panalérgeno implicado en reactividad cruzada entre pólenes (Ledesma y col., 2006).

Ole e 4

Ole e 4 (32 kDa) junto con el Ole e 5 han sido aislados y purificados (Boluda y col., 1998). Ole e 4 tiene elevada capacidad de fijar IgE (80%) de los pacientes alérgicos al polen de olivo. Muestra una elevada similitud con el dominio N-

terminal de Ole e 9, lo que podría sugerir que fuese un producto de degradación de este alérgeno.

Ole e 5

Ole e 5 (16 kDa), con homología con las superóxido dismutasas de plantas (espinaca, maíz, tomate), fija IgE en el 35% de los pacientes con alergia al polen de olivo, si bien esa prevalencia podría estar sobreestimada ya que los estudios se han realizado en un número muy reducido de pacientes.

Ole e 6

Ole e 6 es una proteína con un alto contenido en cisteína (50 aminoácidos, 5,8 kDa), cuya prevalencia depende del área geográfica (entre el 10 y el 55%) (Batanero y col., 1997). No se han identificado homólogos en otras fuentes.

Ole e 7

Ole e 7 (10 kDa) pertenece a la familia de las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTPs). Su prevalencia de sensibilización está marcada por el área geográfica; así, es más frecuente en los pacientes que viven en zonas con elevadas concentraciones de polen de olivo como Jaén donde alcanza valores del 60%, a diferencia de otras zonas con baja concentración de polen, como Madrid donde apenas se llega a un 20% (Tejera y col., 1999). Estas diferencias geográficas se observan también con la sensibilización a Ole e 9, tal y como se visualiza en la figura 12.

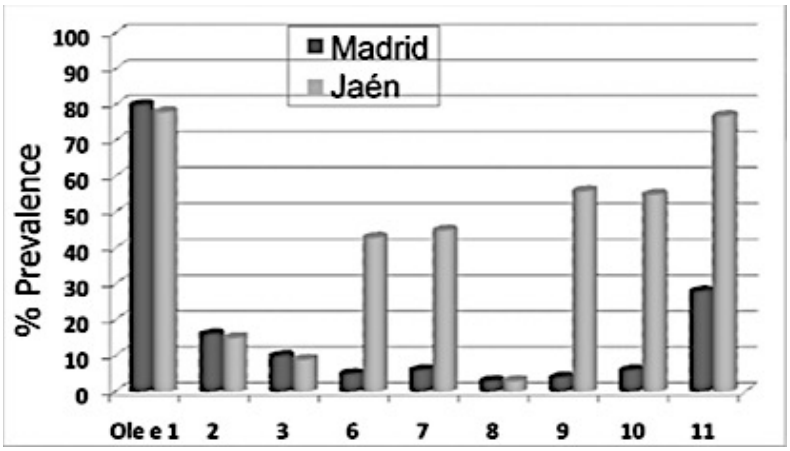

Figura 12. Frecuencia de sensibilización a panel de alérgenos de polen de olivo, comparando 2 poblaciones (Madrid y Jaén). Tomada de Villalba y col., 2014.

Se ha relacionado el Ole e 7 con reacciones a frutas y con reacciones adversas durante el tratamiento con inmunoterapia de los pacientes, lo cual será discutido más adelante, en el apartado de reactividad cruzada.

Ole e 8

Ole e 8 es una proteína de 175 aminoácidos con 4 motivos EF ("EF-Hand") para fijar calcio. Tiene una masa molecular de 18 kDa y muy baja prevalencia (5%) (Ledesma y col., 2000). Su función biológica podría ser regular rutas de transducción de señales. Podría ser responsable de cierta reactividad cruzada con *Juniperus oxycedrus* (Jun o 2), aunque no comparten la misma secuencia fuera de los 4 sitios de fijación para el calcio (Tinghino y col., 1998).

Ole e 9

Ole e 9 (46 kDa) es reconocido por las IgEs de los pacientes alérgicos al polen de olivo hasta el 65% de los casos. Es una enzima (glicoproteína ácida con un pI 5,62), de la familia β-1,3-glucanasas largas implicada en el metabolismo de carbohidratos, que ha sido aislada y caracterizada (Huecas y col., 2001). Posee dos dominios funcionales en su estructura que están unidos por un segmento de

conexión. Un dominio N-terminal (Nt) (36 kDa) con 334 aminoácidos, que posee la actividad catalítica β-1,3-glucanasa de la enzima y está además implicado en el síndrome de reactividad cruzada látex-pólenes-alimentos vegetales (Palomares y col., 2005). Otro dominio, C-terminal (Ct) (10 kDa) con 100 aminoácidos, que es capaz de unir laminarina –un β-1,3-glucano– por lo que se ha sugerido su papel como módulo de captura del sustrato para el dominio catalítico N-terminal (Rodríguez y col., 2007). Además, se ha clasificado como perteneciente a la familia CBM-43 como su homólogo Ole e 10 (Barral y col., 2005) y su estructura 3D se ha determinado por RMN (Treviño y col., 2008). Ambos han sido producidos en la levadura *Pichia pastoris.* Se ha demostrado predominio de Ole e 7, Ole e 9 en zonas de alta exposición a polen de olivo, considerándose como alérgenos mayores y como marcadores de altas concentraciones de polen de olivo (Barber y col., 2008; Cuesta-Herranz y col., 2010). Cuesta y col. describen una prevalencia del 35% en los pacientes de Jaén y un 0 al 4% en los pacientes de diferentes Centros participantes de Madrid, con porcentajes de 0% en la población de nuestro Centro (HUFA) de Alcorcón (Cuesta-Herranz y col., 2010).

Recientemente se ha asociado a Ole e 9 con alta prevalencia de dermatitis atópica (Scala y col., 2016).

Ole e 10

Ole e 10 (10 kDa) pertenece a una familia que une carbohidratos (CBM-43, carbohidrate-binding module). Tiene capacidad de sensibilizar al 55% de los pacientes alérgicos al polen de olivo y al 69,2% de los monosensibilizados a polen de olivo. Tiene un 53% de identidad de secuencia con el dominio C-terminal del Ole e 9 con el que presenta reactividad cruzada y estaría implicado en el síndrome látex-frutas-polen (Barral y col., 2004). Además, Ole e 10 presenta reactividad cruzada con pólenes de gramíneas, betuláceas, cupresáceas, chenopodiáceas y parietaria, así como con látex, patata, kiwi y melocotón (Barral y col., 2004). Ole e 10, junto con Ole e 2 se ha asociado con asma (Quiralte y col., 2002).

Ole e 11

Ole e 11 es una pectín metilesterasa de 342 aminoácidos con masa molecular de 37,4 kDa que ha sido purificada a partir del polen y posteriormente clonada, secuenciada y producida en *P. pastoris* (Salamanca y col., 2010). La prevalencia fluctúa según las zonas geográficas. Así, se ha visto una prevalencia de sensibilización entre 55,9% en pacientes de Madrid, 63,5% en pacientes de Jaén y hasta 75,6% en pacientes de Córdoba (Salamanca y col., 2010). Es homóloga con un alérgeno del polen de *Salsola kali* (Sal k 1) con el que presenta una identidad de secuencia del 54% (Barderas y col., 2007). Muestra baja identidad con alimentos vegetales como tomate (24%), zanahoria (23%) y naranja (25%) y elevada con plantas como *Arabidopsis thaliana* (57%).

Ole e 12

Ole e 12 es una proteína isoflavona reductasa-like, de 34 kDa de masa molecular (Castro y col., 2006) con una prevalencia del 10% en zonas con elevada concentración de polen de olivo, pero mayor del 25% en pacientes con polinosis asociada a alergia a melocotón.

Ole e 13

Es el primer alérgeno ocupacional descrito en la aceituna. Es una taumatina de 23 kDa de masa molecular (Torres y col., 2014). Se han descrito síntomas respiratorios en trabajadores que inhalan partículas durante el procesamiento de la aceituna en las almazaras (Palomares y col., 2008a).

1.6 REACTIVIDAD CRUZADA POR ALÉRGENOS DE PÓLENES DE ÁRBOLES

A continuación, se describen según su función biológica, distintas familias de alérgenos dentro de los pólenes de árboles que se comportan como marcadores específicos de sensibilización a dichos pólenes, aunque también pueden ser responsables de reactividad cruzada.

Tabla 4. Familias de alérgenos de árboles. Comportamiento como marcadores de sensibilización primaria o de reactividad cruzada.

Familia	Marcadores de sensibilización primaria	Marcadores de reactividad cruzada	
		Intrafamilia	Interfamilia
Pectato liasas	Si	Si	No
Poligalacturonasas	Si	Si	No
Homólogos de Ole e 1	Si	Si	Si
Homólogos de Bet v 1	Si	Si	Escasa
Profilinas	No	Si	Si
Pectín metilesterasas	No	Si	No
Glucanasas	No	Si	Escasa

1.6.1 Familia de las pectato liasas

A esta familia de enzimas pertenecen alérgenos de la familia de *Cupressaceae, Taxodiaceae y Podocarpaceae*. Existe reactividad cruzada entre *Cupressaceae* y familias relacionadas (Podocarpaceae y Taxodiaceae) dentro del orden Coniferales (Barletta y col., 1996). Sin embargo, no parece que exista reactividad cruzada con el orden Taxales ni con la familia *Pinaceae* (Schwietz y col., 2000).

Pertenecen a esta familia Cup s 1 (*Cupressus sempervirens*), Cup a 1 (*Cupressus arizonica*), Jun a 1 (cedro de montaña), Jun o 1 (enebro de miera), Jun v 1 (cedro de rojo de Virginia), Cha o 1 (ciprés japonés) y Cry j 1 (cedro japonés). Se consideran alérgenos principales. Existe un elevado grado de identidad entre los mismos: > 90% entre Cup s 1, Cup a 1, Jun a 1; > 70% con Cry j 1, que explicaría la reactividad cruzada existente. Existe una identidad menor al 50% con otras pectato liasas de la familia de *Asteraceae* (Pichler y col., 2015; Pablos y col., 2016).

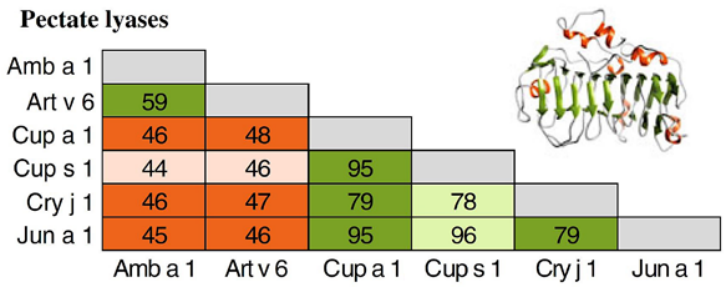

Figura 13. Familia Pectato liasas. Rectividad cruzada. Tomado de Pablos y col., 2016.

1.6.2 Familia de las poligalacturonasas

La forman alérgenos de *Cupressaceae* (Jun a 2) que comparten con otros alérgenos Cha o 2, Cry j 2, de masa molecular de 43 kDa, una identidad de secuencia del 7-82% (Ohtsuki y col., 1995).

1.6.3 Familia de homólogos de Ole e 1

Como se ha comentado previamente, Ole e 1 es el principal alérgeno de polen de olivo. Se han descrito la familia Ole e 1-*like*, alérgenos homólogos de Ole e 1 con alto grado de identidad en la secuencia de aminoácidos, siendo elevada (>80%) entre géneros dentro de la familia *Oleaceae* (Batanero y col., 1996; Obispo y col., 1993; Batanero y col., 1996; Barderas y col., 2005, Barderas y col., 2006). Esta elevada identidad explica la reactividad cruzada de grupo. Son ejemplos fresno

(Fra e 1) con una identidad del 91%, lila (Syr v 1), 90% y aligustre (Lig v 1), 88%. Aunque se han detectado homólogos de Ole e 1 en otras familias de plantas no relacionadas botánicamente como *Lolium* (Lol p 11), *Phleum pratense* (Phl p 11), plantago (Pla l 1), la reactividad cruzada, sin embargo, es baja probablemente debido a la escasa similitud de secuencia (identidad 25-60%) (Weber y col., 2003; Lombardero y col., 2002; González y col., 2000). Pablos y colaboradores han revisado la reactividad cruzada entre alérgenos de pólenes según familias, donde confirman la elevada reactividad cruzada de Ole e 1 con alérgenos de pólenes de otras oleáceas (Fra e 1), pero más limitada para polen de gramíneas (Phl p 11) y malezas (Pla l 1, Che a 1, Sal k 5) (Pablos y col., 2016). Esta reacividad cruzada también ha sido demostrado por Stemeseder (Stemeseder y cols , 2016).

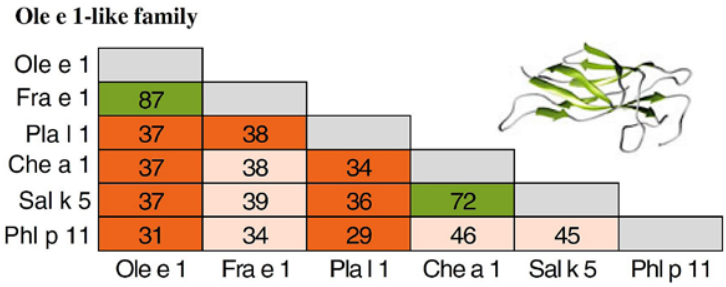

Figura 14. Familia Ole e 1-*like*. Reactividad cruzada. Tomado de Pablos y col., 2016.

1.6.4 Familia de homólogos de Bet v 1

Bet v 1 es el principal alérgeno de abedul, con homólogos en otras *Betulaceae.* También se han identificado homólogos de Bet v 1 responsables de la reactividad cruzada entre plantas no relacionadas filogenéticamente. Así, se han identificado homólogos de Bet v 1 en frutas de la *familia Rosaceae* (Mal d 1 de manzana, Pru av 1 de cereza, Pru ar 1 de albaricoque, Pyr c 1 de pera), en vegetales de la familia *Apiaceae* (Api g 1 de apio), frutos secos (Cor a 1.04 de avellana) y cacahuete (Ara h 8) (Hausen y col., 2010).

1.6.5 Familia de las profilinas

Son proteínas de secuencia altamente conservada, independientemente de la especie (animal o vegetal), cuya función fundamental es la regulación del ensamblaje de los filamentos de actina: Bet v 2, Cor a 2 y Ole e 2. Son panalérgenos por su elevada similitud de secuencia (70-85% entre Bet v 2 y Ole e 2) y su presencia en multitud de fuentes alergénicas diversas (Sirvent y col., 2011).

1.6.6 Familia de las proteínas ligantes de calcio

Están presentes en especies animales y vegetales. Se caracterizan por poseer entre dos y ocho sitios de unión al calcio, también llamados motivos EF ("EF-Hand"). Pertenecen a esta familia Bet v 4, Ole e 3, Cup a 4 y Jun o 2. Su papel radica en la importancia del calcio en la germinación del polen. Se denominan polcalcinas a las proteínas con dos sitios de unión al calcio, y están presentes sólo en el tubo polínico (Ledesma y col., 1998). El grado de identidad es del 75%. Su incidencia en la población es del 10-30%.

1.6.7 Familia de las proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP)

Pertenecen al grupo PR-14 de las proteínas relacionadas con las patogénesis (PR). Son proteínas de defensa y poseen propiedades antifúngicas. Tienen una estructura tridimensional muy compacta mantenida por cuatro puentes disulfuro. Son verdaderos alérgenos alimentarios. Los porcentajes de identidad varían del 20 al 90%, por lo que la reactividad cruzada intragrupo es variable (Palacín y col., 2012). Algunos pacientes sólo reconocen una LTP y otros, varias. Ejemplos de LTP de pólenes de árboles son Ole e 7, Pla a 3, Cor a 8 y Cas a 8.

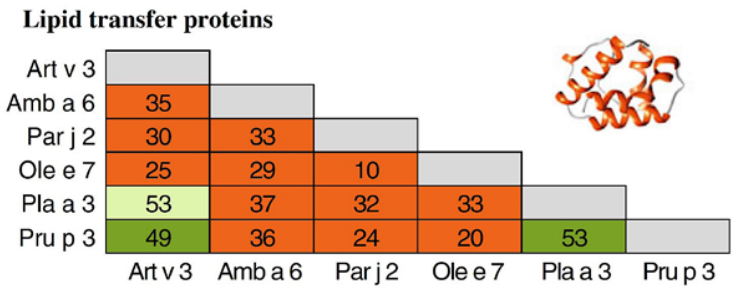

Figura 15. Familia nsLTP. Reactividad cruzada. Tomado de Pablos y col., 2016.

1.6.8 Familia de las β-1,3-glucanasas

Pertenecen al grupo PR-2 de las proteínas relacionadas con las patogénesis (PR). Son proteínas de defensa presentes en diferentes fuentes vegetales. Son enzimas hidrolíticas con actividad antifúngica, pero también están implicadas en procesos fisiológicos de las plantas como la división celular, crecimiento del tubo polínico, floración y almacenamiento de reservas. La mayoría de las β-1,3-glucanasas de origen vegetal son endoglucanasas capaces de hidrolizar polímeros de β-1,3-glucanos. Estas enzimas están presentes en diferentes fuentes alergénicas y se ha descrito su posible implicación en el síndrome látex-frutas, así como en la reactividad cruzada entre polen, frutas y látex (Wagner y col., 2004; Palomares y col., 2005). Se ha demostrado su papel como alérgenos las siguientes β-1,3-glucanasas: Hev b 2 en *Hevea brasiliensis*, látex; Mus a 5 en *Musa acuminata*, banana; Ole e 9 en *Olea europaea*, olivo. Recientemente, se ha identificado una β-1,3-glucanasa en polen de fresno (Torres y col., 2015).

1.6.9 Familia de las TLPs (del inglés “thaumatin-like proteins”)

Estos alérgenos se han identificado tanto en alimentos vegetales, principalmente frutas, como también en algunos pólenes, pudiendo ser responsables de reacciones de reactividad cruzada. Hay evidencias de su implicación en la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos (Wagner y col., 2004). Hay una tendencia en el perfil de reconocimiento de TLPs, en la que los pacientes que presentan alergia a frutas y son polínicos muestran una respuesta de mayor

intensidad. Sin embargo, los pacientes que solo son polínicos, no presentan ningún patrón de reconocimiento claro (Palacín y col., 2012).

1.6.10 Familia de las pectín metilesterasas

De ubicua distribución, parece que participan en el remodelaje y crecimiento de la pared celular. A este grupo pertenece Ole e 11 (Salamanca y col., 2010) que es homólogo de Sal k 1 (Bardera y col., 2007). Debido a las diferencias encontradas en la prevalencia de Sal k 1 en los pacientes alérgicos al polen con o sin alergia a alimentos (Cuesta-Herranz y col., 2010), la familia pectin metilesterasas podría ser de interés en la reactividad entre pólenes y alimentos.

1.6.11 Familia de las isoflavona reductasas

Estas proteínas parecen estar implicadas en el polen en el proceso de germinación y crecimiento del tubo polínico. A esta familia pertenecen Bev v 6 y Ole e 12 (Jiménez-López y col., 2013).

1.7 REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ALÉRGENOS DE POLEN DE *CUPRESSACEAE* Y OTROS ALÉRGENOS VEGETALES

Los panalérgenos como profilinas, proteínas ligantes de calcio, proteínas de transferencia de lípidos (nsLTP) y taumatinas pueden ser responsables de reactividad cruzada entre pólenes. El polen de gramíneas y olivo contienen alérgenos Phl p 12 (profilina), Phl p 7 (polcalcina), Ole e 2 (profilina), que pueden reaccionar con pólenes no relacionados (Sastre y col., 2010; Constantin y col., 2009; Swoboda y col., 2008); y probablemente también, con cupresáceas. Los alérgenos tipo proteínas ligantes de calcio (Cry j 4, Jun o 2, Jun o 4, and Cup a 4),

profilinas (Cup s 8), y taumatinas (Cup a 3, Cry j 3, Cup s 3, Jun a 3) de *Cupressaceae* podrían ser responsables de reactividad cruzada (http//www.allergome.org). El Cup a 4 (proteína ligante de calcio), muestra identidad estructural con otras proteínas ligantes de calcio (Ole e 3, Ole e 8, and Phl p 7) (Pico de Coaña y col., 2010).

Casi el 50% de los pacientes polisensibilizados a polen de ciprés y otros pólenes no tienen síntomas típicos en invierno por la polinización de cupresáceas (Sposato y col., 2014; Sposato y col., 2013, Caimmi y col., 2012). En los pacientes polisensibilizados, sin clínica en invierno, la sensibilización podría ser el resultado de reactividad cruzada a proteínas/epítopos con estructura similar a otros alérgenos de otros pólenes de plantas de diferente taxonomía, según autores (Sposato y col., 2013). Pero parece que no todo lo explicaría la reactividad cruzada debido a la poca cantidad de profilina y polcalcina del polen de ciprés (Barber y col., 2009).

También se ha responsabilizado a los determinantes hidrocarbonados de las cupresáceas de la reactividad cruzada entre pólenes no relacionados taxonómicamente (Afferni y col., 1999; Mari y col., 1999; Iacovacci y col., 2002).

En el síndrome de polen de ciprés-melocotón, se han demostrado reactividad cruzada entre ambos a través de LTPs (LTP de ciprés y Pru p 3) (Sánchez-López y col., 2011), profilinas (Cup s 8, Pru p 4) y taumatinas (Cup s 3, Pru p 2).

1.8 REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ALÉRGENOS DE POLEN DE OLEÁCEAS Y OTROS ALÉRGENOS VEGETALES

La implicación de los alérgenos homólogos de Ole e 1 en la reactividad cruzada entre pólenes de la familia de Oleáceas y otros pólenes ha sido descrita en el apartado 1.6.3.

La reactividad cruzada entre profilinas (Ole e 2, Pru p 4, Pyr c 4, Cuc m 2, Act d 9) y entre nsLTPs (Ole e 7, Pru p 3, Pyr c 3, Cuc m LTP, Act d 10) sería la responsable del síndrome polen de olivo-frutas.

Se ha relacionado el Ole e 7 con anafilaxia por frutas (Florido y col., 2002) y con reacciones adversas durante el tratamiento con inmunoterapia de los pacientes. Sin embargo, Ole e 7 tiene una baja identidad secuencial con la LTP del melocotón, Pru p 3 y otras LTP de origen alimentario. Se ha demostrado baja reactividad cruzada mediante estudios de ELISA inhibición, por lo que su implicación en el Síndrome de LTP por pólenes y alimentos es poco probable según autores (Tordesillas y col., 2011). Sin embargo, Scala y cols. han demostrado recientemente que la sensibilización a Ole e 7 está asociada a reacciones locales y sistémicas por frutas (Scala y col., 2016).

Se ha demostrado reactividad cruzada entre β-1,3-glucanasas, el dominio N terminal de Ole e 9 de polen de olivo y Hev b 2 del látex, en el síndrome de polen-látex-frutas (banana (Mus a 5), tomate, patata) (Quiralte y col., 2007; Palomares y col., 2005). Otros alérgenos responsables de la reactividad cruzada del síndrome de polen-látex-frutas serían profilinas del polen de olivo (Ole e 2), latex (Hev b 8), piña (Ana c 1), banana (Mus xp 1) y kiwi (Act d 9) y, otros alérgenos como superóxido dismutasas de polen de olivo (Ole e 5) y latex (Hev b 10).

Otros alérgenos del polen de olivo, Ole e 10 (Barral y col., 2004) y Ole e 11 (Cuesta-Herranz y col., 2010) desempeñan un papel relevante en procesos de reactividad cruzada con otras especies vegetales.

Se han implicado a los determinantes hidrocarbonados de Ole e 1 en la reactividad cruzada entre pólenes de diferentes especies (Batanero y col., 1996; Batanero y col., 1999).

Se ha descrito una enzima, ß-galactosidasa (ß-GAL), con una Mm de 43 kDa, como un posible panalérgeno responsable de la reactividad cruzada entre cupresáceas y olivo (Bistoni y col., 2005).

1.9 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los pólenes son las causas más frecuentes de sensibilizaciones en Madrid, en especial gramíneas, y árboles como cipreses, olivo y plátano de sombra, reflejo de la exposición ambiental a los mismos. La polisensibilización es un hallazgo muy común en los pacientes que acuden a las consultas de Alergia con síntomas respiratorios estacionales, hecho que se ha demostrado en estudios multicéntricos donde han participado pacientes de nuestro Hospital Universitario Fundación Alcorcón. La coincidencia de sensibilización a polen de cupresáceas y olivo como únicos pólenes implicados en los pacientes alérgicos al polen, no es infrecuente pero no está bien documentada en la literatura. Las cupresáceas y el olivo son especies botánicas no relacionadas filogenéticamente, por lo que la doble sensibilización podría deberse a la sensibilización a: a) alérgenos genuinos de ambos pólenes, b) alérgenos que puedan inducir la reactividad cruzada, c) panalérgenos responsables de reactividad cruzada, lo que induciría sensibilizaciones a otros pólenes. Como primera aproximación, nuestro grupo encontró correlaciones positivas analizando las PC y la determinación de IgE especifica por *Immuno*CAP en pacientes con doble sensibilización a polen de ciprés y olivo, lo que sugería cierto grado de reactividad cruzada que no había sido previamente descrita (Alonso y col., 2003). Por otro lado, con la utilización de extractos completos de fuentes alergénicas es difícil identificar los alérgenos

responsables de la clínica presentada por los pacientes polisensibilizados (Vidal y col., 2014). De ahí la importancia del diagnóstico molecular o por componentes, para identificar los alérgenos responsables y diagnosticar si es por sensibilización genuina (co-sensibilización) o por reactividad cruzada (Sastre y col., 2013), sobre todo en áreas de exposición a pólenes complejas (Barber y col., 2014). La utilización del diagnóstico molecular también es muy importante en el tratamiento, ya que los resultados obtenidos influyen en la decisión terapéutica. Hay estudios donde se ha demostrado que el diagnóstico por componentes puede conllevar un cambio en la composición de la inmunoterapia considerada adecuada según los datos de las pruebas cutáneas hasta en el 54% de los pacientes (Sastre y col., 2012). y hasta en el 56,8% de los pacientes, en un estudio posterior (Moreno y col., 2014).

2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Establecer los fenotipos de la alergia respiratoria en los pacientes que presentan doble sensibilización a los pólenes de cupresáceas y olivo.
2. Identificar los alérgenos de pólenes de ciprés y olivo implicados en la doble sensibilización.
3. Establecer si se trata de una co-sensibilización a los dos pólenes o existe una reactividad cruzada.
4. Relacionar los patrones de sensibilización a alérgenos responsables de la sensibilización con los diferentes fenotipos clínicos observados.
5. Comparar los fenotipos clínicos de los pacientes con doble sensibilización a polen de ciprés y olivo, y sus patrones de reconocimiento a alérgenos con los de pacientes monosensibilizados a polen de ciprés y monosensibilizados a polen de olivo.
6. Generar un algoritmo de diagnóstico molecular para un mejor abordaje diagnóstico y terapéutico de estos pacientes.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población a estudio

El Hospital Universitario Fundación Alcorcón (HUFA) es una institución sanitaria pública sin ánimo de lucro, perteneciente al Servicio Madrileño de Salud de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. La Unidad de Alergia da asistencia sanitaria especializada a toda la población infantil y adulta de Alcorcón, así como desde marzo de 2012 a dos tercios de la población adulta de Móstoles (en total alrededor de 300.000 personas). Desde 1998 hasta marzo de 2012 daba asistencia al Área Sanitaria 8 de la Comunidad de Madrid que comprendía los distritos de Alcorcón y Móstoles y la zona rural (aproximadamente 450.000 habitantes). De este último periodo señalado se seleccionaron de forma consecutiva durante los años 2001-2005 pacientes con edad mayor de 7 años, que acudían refiriendo síntomas respiratorios de rinoconjuntivitis y/o asma, y que presentaban tras ser realizado el estudio alergológico de rutina con batería estándar de neumoalérgenos habituales, PC positivas a *C. arizonica* y/o *C. sempervirens* y *Olea europaea.*

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUFA. Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado Parte del estudio fue financiado por una Beca de la Fundación de la SEAIC. Los documentos se incluyen en el apartado Anexos.

Diseño del estudio

El estudio se diseñó como un estudio observacional de tipo descriptivo.

- **Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión requeridos para los pacientes del estudio fueron:

  - Edad mayor o igual a 7 años
  - Referir síntomas respiratorios de rinoconjuntivitis y/o asma con al menos

dos años de evolución, concordantes con PC positivas a pólenes de *C. arizonica* y/o *C. sempervirens, y Olea europaea*

- Sin inmunoterapia previa
- Aceptación del estudio mediante consentimiento informado

Para los pacientes del grupo control los criterios de inclusión fueron:

- Referir síntomas respiratorios de rinoconjuntivitis y/o asma, con al menos dos años de evolución, concordantes con PC positivas a *C. arizonica* y/o *C. sempervirens*
- Referir síntomas respiratorios de rinoconjuntivitis y/o asma con al menos dos años de evolución, concordantes con PC positivas *Olea europaea*
- Resto de criterios de inclusión, los mismos que para la población a estudio.

- **Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión fueron:

- PC a otros pólenes incluidos en batería estándar de neumoalérgenos, relevantes en nuestra área.
- Pacientes con síntomas respiratorios perennes y PC positivas a neumoalérgenos perennes con presencia en su entorno.

3.2 Materiales

3.2.1 Material para pruebas *in vivo*

- Extractos para PC: mezcla de gramíneas, *C. arizonica y C. sempervirens, Olea europaea, Platanus acerifolia, Plantago lanceolata, Artemisia vulgaris, Chenopodium album,* ácaros *(Dermatophagoides pteronyssinus y farina*hongos

(Alternaria alternata, Cladosporium herbarum, Penicilium notatum, Aspergillus fumigatus), epitelios de perro y gato y cucaracha *(Blatella germanica)* (Alk-Abelló, S.A., Madrid).

- Controles positivo (clorhidrato de histamina 10 mg/ml) y negativo (salino) (Alk-Abelló, S.A., Madrid).
- Lancetas estériles de punta 1 mm (Dome-Hollister-Stier, Stallergenes DHS España).

3.2.2 Reactivos

- *Immuno*CAPs (*C. arizonica y C. sempervirens, Olea europaea, Lolium perenne, Platanus acerifolia*), (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia).
- PBS (Tampón fosfato salino): NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $Na_2H_2PO_4$ 8,1 mM, pH 7,2.
- TBS (Tampón Tris salino): Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5.
- Tampón de aplicación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS: Tris-HCl, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v).
- Gel de poliacrilamida 4-20% (Bio-Rad).
- Placas ELISA (COSTAR; Corning Incorporated, Nueva York, EEUU).
- Anti-IgE humana conjugada con peroxidasa (DAKO, Glostrup, Dinamarca).
- Extracto de *Cupressus arizonica, Olea europaea* (suministrados por Allergon AB Sweden).
- Alérgenos purificados: nOle e 1, rOle e 2, rOle e 3, nOle e 7, rOle e 9 (dominios N-terminal y C-terminal), rOle e 11, rOle e 12, rCup s 1, Bromelina. Todos fueron obtenidos en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con el Servicio de Inmunoalergia del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid, excepto rCup s 1 que fue purificado y donado por el Dr. Rafael Monsalve del

laboratorio de Alk-Abelló, Madrid.

- Anticuerpos policlonales frente a los alérgenos purificados (pAb Ole e 1, pAb-NtD-Ole e 9, pAb-CtD-Ole e 9, pAb Ole e 7, pAb Ole e 11, obtenidos en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con el Servicio de Inmunoalergia del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

3.3 Métodos

3.3.1 Protocolo de estudio

Historia clínica

Se recogieron datos personales de edad y sexo, antecedentes familiares de atopia, tipo de síntomas referidos por el paciente, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas.

Pruebas cutáneas

Se realizaron PC intraepidérmicas (prick), según las guías tras consenso de miembros del grupo de trabajo GA^{2}LEN (Global Allergy and Asthma European Network) y ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) (Bousquet y col., 2012). Consisten en la aplicación del extracto alergénico sobre la piel de la cara anterior del antebrazo para la posterior introducción en la epidermis del paciente de una pequeña proporción del producto por medio de la punción de la piel. Antes de su realización, se debe comprobar que el área de la piel es adecuada, no presenta daño tisular, o alteraciones cutáneas y el paciente no padece ninguna enfermedad o está recibiendo medicación, que interfiera con los resultados de la prueba. La zona de antebrazo es la comprendida entre unos 5 cm de la muñeca y unos 3 cm del codo. Tras marcar adecuadamente con rotulador, se deposita una

gota de cada extracto separados entre sí al menos 2 cm. Se punciona la gota con una lanceta de 1 mm, con un ángulo de 90º con respecto a la piel. La punción a través de la gota del extracto permite que una pequeña cantidad del mismo penetre en las capas superficiales de la piel (se estima que penetra unos 3,3 x 10^{-6} ml). No debe producirse sangrado porque puede ser causa de falso positivo, pero debe penetrar lo suficiente en la piel para que el extracto la traspase porque sería causa de falso negativo.

La lectura de la reacción inmediata se realiza a los 15-20 minutos. Habitualmente se dibuja el habón y eritema con rotulador. Los resultados se comparan con el control negativo. En general, se considera positivo una medición del diámetro mayor de la pápula ≥ 3 mm que el control negativo.

Extracción sanguínea

Se realizó una extracción sanguínea a los pacientes y se guardó el suero congelado a -80ºC en el Biobanco del HUFA, para posterior realización de pruebas *in vitro.*

3.3.2 Estudios *in vitro*

Determinación de IgE total

La determinación de IgE total se realizó mediante nefelometría cinética y se procesó por el sistema de automatización BN-II, siguiendo instrucciones del fabricante (Siemens Healthcare Diagnostics, Alemania). Los valores se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml).

Determinación de IgE específica frente a extractos completos mediante ImmunoCAP

La determinación de IgE específica frente a extractos completos *Cupressus arizónica y C. sempervirens, Olea europaea, Lolium perenne, Platanus acerifolia* se llevó a cabo mediante el procedimiento *Immuno*CAP Specific IgE en la plataforma Phadia Laboratory System 250 (Phadia Diagnostics, Uppsala, Suecia), que está diseñado para ofrecer resultados de pruebas precisos y reproducibles (tanto en diagnósticos de alergias como de autoinmunidad). Detectan los anticuerpos IgE en un intervalo de 0 a 100 kU/L. El resultado se expresa de forma cuantitativa. Normalmente, en la práctica clínica el valor 0,35 kU/L se ha utilizado como valor de corte. Se han realizado numerosos estudios en los que se ha evaluado el rendimiento clínico de las pruebas *Immuno*CAP Specific IgE para el diagnóstico de alergia. El rendimiento clínico se expresa como sensibilidad, que oscila entre el 84 y el 95%, y especificidad, que oscila entre el 85 y el 94%. La sensibilidad y especificidad se han descrito a partir de estudios realizados con numerosos pacientes a los que se les ha realizado pruebas con diferentes alérgenos.

La tecnología se basa en un inmunoanálisis en sándwich. En una primera fase de la reacción, la IgE específica sérica del paciente se une al alérgeno, que está unido de forma covalente a la fase sólida, y en una segunda fase dicha IgE específica es detectada por un anticuerpo anti-IgE conjugado con una enzima, la cual catalizará la transformación de un substrato en un producto con fluorescencia evaluable. La fase sólida es un polímero hidrofílico activado y los anticuerpos detectores están conjugados con ß-glactosidasa. Esta enzima transforma el substrato metilumbeliferil-ß-D-galactósido en un producto fluorescente, 4-metil-umbeliferona de forma proporcional a la IgE unida al alérgeno. La concentración de IgE específica, que se correlaciona con la fluorescencia registrada, se calcula interpolando desde una curva patrón realizada a partir de 6 puntos (Sanz Larruga y col., 2015).

Preparación de extractos proteicos alergénicos

Los extractos proteicos se prepararon tras la suspensión al 5% (p/v) de los diferentes pólenes en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,0, 1 mM fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF). Se homogeneizaron en potter y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo la mezcla se centrifugó durante 20 min a 10.000 g a 4 °C. El sobrenadante se recogió y con el sedimento se repitió la operación dos veces más. Los sobrenadantes de cada etapa se reunieron y liofilizaron. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1955). Posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

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

Las electroforesis se llevaron a cabo en un sistema discontinuo siguiendo el procedimiento descrito por (Laemmli, 1970). La polimerización de los geles y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Se usaron geles de 0,75 mm de espesor. Se prepararon al 12% ó al 15% de poliacrilamida, con un gel concentrante al 4%.

Las muestras de proteína (20-40-80 µg de extracto proteico) se disolvieron directamente en tampón de aplicación. La electroforesis se desarrolló en tampón de electroforesis constituido por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1% (p/v). En algunos casos se añadió ß-mercaptoetanol (ßME) al 0,5%, en cuya presencia las muestras se calentaron durante 20 min a 90 °C. La intensidad de corriente aplicada fue de 25 mA por gel y ésta se mantuvo hasta que el marcador del frente (azul de bromofenol) alcanzó el extremo inferior del gel. Finalizada la electroforesis las proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Coomassie brilliant blue R-250 0,3% (p/v), metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)). El exceso de colorante se eliminó mediante sucesivos lavados con metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Como patrones de peso molecular se utilizaron las proteínas contenidas en el kit MW-SDS-70L de Sigma disueltas a 0,5-1 mg/ml en tampón de aplicación con ßME al 5% (v/v).

Transferencia electroforética

La transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) se realizó básicamente según el procedimiento descrito por (Towbin y col., 1979). La transferencia se realizó en tampón Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) y metanol 20%(v/v), con una intensidad de corriente de 1 mA/cm^2 durante 1 h. La eficacia de la transferencia se comprobó mediante visualización directa de los patrones de proteínas preteñidas con azul de Coomassie (Prestained SDS-PAGE Standard, low range; Bio-Rad).

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa

Después de la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a las membranas de nitrocelulosa, éstas son lavadas con PBS/Tween-20 0,1% y se bloquean posteriormente con tampón de saturación PBS/Tween-20 0,1%/leche en polvo 3%) durante 2 h a temperatura ambiente. Después se incuban las membranas con el suero de los pacientes diluido 1:10 o 1:5, dependiendo del ensayo, en tampón de saturación durante 2 horas o, con los anticuerpos policlonales en el mismo tampón durante 1 hora. Tras tres lavados con PBS/Tween-20 0,1%, se incuban las membranas, en el caso de los policlonales con el anticuerpo policlonal anti-IgE hecho en cabra y marcado con peroxidasa de nabo (GAR-HRB) y, en el caso de los sueros humanos (pacientes alérgicos) con un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón (1/5000). En este último caso y tras tres nuevos lavados con PBS/Tween-20 0,1% se incuban finalmente las membranas con un anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa de nabo (GAR-HRP) frente a la IgE humana durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas se lleva a cabo una exposición detectando la actividad peroxidasa mediante el método quimioluminiscente ECL (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Enzimoinmunoensayo (ELISA, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay") indirecto

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano y de alta capacidad de unión. Para cada punto se utilizaron un mínimo de dos determinaciones independientes.

Se tapizan las placas con 100 µl por pocillo de una disolución del antígeno (1 µg/ml) en PBS, pH 7,2, incubándose a 4ºC durante 12-16 h, o bien durante 2 h a 37ºC. A continuación, se lavan los pocillos con PBS/Tween-20 0,5% y se bloquean los sitios de unión inespecíficos con 200 µl de tampón de saturación (PBS/Tween-20 0,1%/leche en polvo 3%) durante 2 h a 37ºC. Después se incuban las placas en el tampón de saturación (100 µl/pocillo) con el anticuerpo (usado a distintas diluciones) durante 1 h o con los sueros (diluidos 1/10) durante 2h. Tras un nuevo lavado, se incubaron las placas durante 1 h con el segundo anticuerpo (100 µl/pocillo) en el tampón de saturación diluido a la mitad con PBS. Para el suero de conejo se usó como segundo anticuerpo una dilución 1/3.000 de GAR-HRP, y en el caso de suero humano (pacientes alérgicos) se empleó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón (1/5.000). En este último caso, se debe realizar una última incubación con GAM-HRP (1 h a 37ºC). Después de lavar exhaustivamente las placas, se añadió el sustrato de la peroxidasa, o-fenilendiamina (OPD, 0,63 mg/ml) en citrato sódico 0,1 M, pH 5,0, con 4% de metanol y un 0,2% de H_2O_2 (100 ml/pocillo). La reacción se detuvo con 100 ml de ácido sulfúrico 3 N. La lectura de densidad óptica de cada pocillo a 492 nm se realizó en un lector de ELISA Titertek Uniskan II (Flow Labs.).

Ensayos de inhibición

El protocolo que se ha seguido es el mismo que se ha explicado en la transferencia a membranas e inmunodetección, pero realizando una etapa previa en la que se preincuban sueros individuales con extractos proteicos (200-500 µg) o con proteínas purificadas (5-10 µg) como inhibidores.

3.3.3 Análisis estadístico

Soporte informático

El análisis de los datos se ha realizado mediante los programas estadístico SPSS 17.0 y STATA 13.1.

Estadística descriptiva

Las variables cuantitativas se describen con medidas de centralización y de dispersión (media y desviación típica o mediana y rango intercuartílico, Q1-Q3). Las variables cualitativas se describen mediante frecuencias absolutas (N) y relativas (%).

Estadística analítica

Se ha realizado un estudio univariante para estudiar las diferencias entre los grupos en cuanto a edad, sexo, síntomas y estacionalidad. Se han utilizado el test chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher para estudiar la asociación entre variables cualitativas. Y para comparar la distribución de las variables cuantitativas se han utilizado los test no paramétricos U de Mann Whitney y el de Kruskal Wallis por el pequeño tamaño muestral y la distribución asimétrica de los datos. Para comparar diferencias dos a dos en análisis post hoc se aplica la corrección de Bonferroni que consiste en dividir el nivel de significación global (0.05) entre el número de comparaciones, que en nuestro caso ha sido tres.

Los mismos métodos estadísticos se han utilizado para comparar la distribución de las PC, determinaciones de IgE específica mediante *Immuno*CAP y determinaciones de IgE específica frente a alérgenos mediante ELISA.

Todos los contrastes se realizarán con un nivel de confianza del 95%.

Para representar la asociación entre los grupos de pacientes (doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, monosensibilizados a polen de ciprés, y

monosensibilizados a polen de olivo), los síntomas y la estacionalidad por un parte, y entre los grupos de pacientes y la sensibilización a alérgenos individuales por otra, se ha aplicado el Análisis de correspondencias múltiple. Este análisis distribuye la variabilidad total en dimensiones. Se representan las dos primeras dimensiones que son las que más variabilidad explican. Un gráfico de correspondencias se interpreta proyectando las variables en el eje de las X y en el eje de las Y. Dichas variables se asocian en mayor grado cuanto más a la derecha o a la izquierda del 0 estén. La posición de los puntos en el gráfico viene determinada por las coordenadas en las dimensiones 1 y 2, y esas coordenadas están determinadas por el número de casos. Si dos puntos están más cerca es porque hay mayor número de casos que han contestado a esos dos puntos. El eje X es la primera dimensión y la más interesante porque es la que más variabilidad representa.

4 RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA

Estudiamos una población de 85 pacientes alérgicos a pólenes de ciprés y olivo con síntomas respiratorios concordantes y PC a polen de ciprés (*C. arizonica* (*Ca*) y/o *C. sempervirens* (*Cs*)) y olivo (*Olea europaea*). Además, se incluyeron como controles pacientes con alergia respiratoria, pero monosensibilizados mediante PC a polen de ciprés (n=21) o a polen de olivo (n=15). La muestra total fue 121 pacientes.

Pruebas cutáneas positivas polen de ciprés y olivo

- 85 pacientes (70,2%)

Pruebas cutáneas positivas polen de ciprés

- 21 pacientes (17,4%)

Pruebas cutáneas positivas a polen de olivo

- 15 pacientes (12,4%)

Las características clínicas de la población total (n= 121) fueron las siguientes: la mediana de edad fue de 36 años (RIQ 27-45 años). La distribución por sexos fue 73 (60,3%) mujeres y 48 (39,7%) varones. 47% referían antecedentes personales de atopia. La distribución de los síntomas fue: 79 casos (65,2%) con rinoconjuntivitis exclusivamente, 7 casos con asma exclusivamente (5,7%) y con ambos síntomas 35 (28,9%).

Por lo tanto, 114 pacientes (94,2%) presentaban rinoconjuntivitis y 42 (34,7%) asma. 102 pacientes (84,3%) referían síntomas estacionales y 19 (15,7%) síntomas perennes. En cuanto a los pacientes con síntomas estacionales (n=102), 29 (28,4%) presentaban síntomas durante el mes de febrero, 23 (22,5%) durante el mes de mayo y 50 (49%), durante los meses de febrero y mayo.

4.2 CARACTERISTICAS CLINICAS E INMUNOLÓGICAS DE LOS 3 GRUPOS DE POBLACIÓN

4.2.1 Edad y sexo

Se observa que los pacientes con monosensibilización a polen de ciprés tienen mayor edad (*p* 0,012). Los grupos son homogéneos en cuanto al sexo.

Tabla 5. Diferencias en cuanto a la edad y sexo.

		Ciprés+Olivo	Ciprés	Olivo	*p*
		n=85	n=21	n=15	
Edad	Media ± DE	34,71 ± 12,73	45 ± 13,17	33,87 ± 11,14	0,012
	Mediana (RIQ)	35 (26 - 43,5)	43 (35 - 54)	32 (25 - 44)	
	Rango	7 - 66	26 - 68	13 - 50	
Sexo	Hombre	36 (42,4%)	8 (38,1%)	4 (26,7%)	0,512
	Mujer	49 (57,6%)	13 (61,9%)	11 (73,3%)	

DE: Desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico.

44% de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, 67% de los monosensibilizados a polen de ciprés y 33% de los monosensibilizados a polen de olivo referían antecedentes familiares de atopia.

4.2.2 Síntomas respiratorios, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas

Síntomas respiratorios

Observamos que, aunque la clínica predominante en los tres grupos (ciprés+olivo, ciprés y olivo) es rinoconjuntivitis, los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés y con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo tienen mayor porcentaje (96,5% y 100%, respectivamente) (*p* 0,008). El asma predomina en los pacientes con monosensibilización a polen de olivo (53,3%) (*p* 0,014). En 4/15 (26,7%) de los pacientes con sensibilización a olivo encontramos que el asma es exclusivamente la clínica presentada. En cuanto a la variable estacional se observa que los tres grupos tienen mayor porcentaje de síntomas durante la estación de polinización, aunque el 40% de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo tienen síntomas perennes (*p* 0,032).

Tabla 6. Síntomas respiratorios y estacionalidad.

		Ciprés+Olivo	Ciprés	Olivo	*p*
		n=85	n=21	n=15	
Rinoconjuntivitis		82 (96,5%)	21 (100%)	11 (73,3%)	0,008
Asma		32 (37,6%)	2 (9,5%)	8 (53,3%)	0,014
Estacionalidad	Estacional	74 (87,1%)	19 (90,5%)	9 (60%)	0,032
	Perenne	11 (12,9%)	2 (9,5%)	6 (40%)	

Asma: Asma con/sin rinoconjuntivitis; Rinoconjuntivitis: Rinoconjuntivitis con/sin asma.

Mes de presentación de los síntomas

Si analizamos el mes el cual los pacientes con clínica estacional refieren síntomas, se observa que los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo tienen clínica en febrero el 12,9%, en mayo el 16,4% y en ambos meses febrero+mayo el 57,6%. En el grupo de monosensibilizados a polen de ciprés, encontramos que un 85,7% de los pacientes tienen síntomas en febrero y en el grupo de monosensibilizados a polen de olivo, el 60% tienen síntomas en mayo.

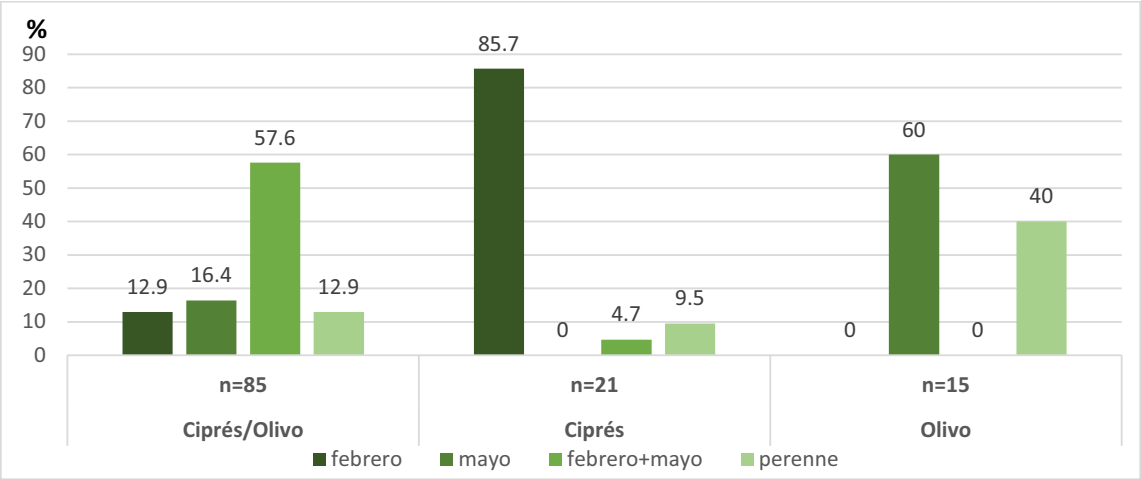

Figura 16. Distribución de los meses de presentación de los síntomas según el grupo de pacientes.

Los pacientes con síntomas estacionales congruentes con la estación de polinización del polen al que están sensibilizados se distribuyen de la siguiente manera: ciprés en febrero (85,7%), olivo en mayo (60%) y ciprés+olivo en ambos meses febrero+mayo (57,6%).

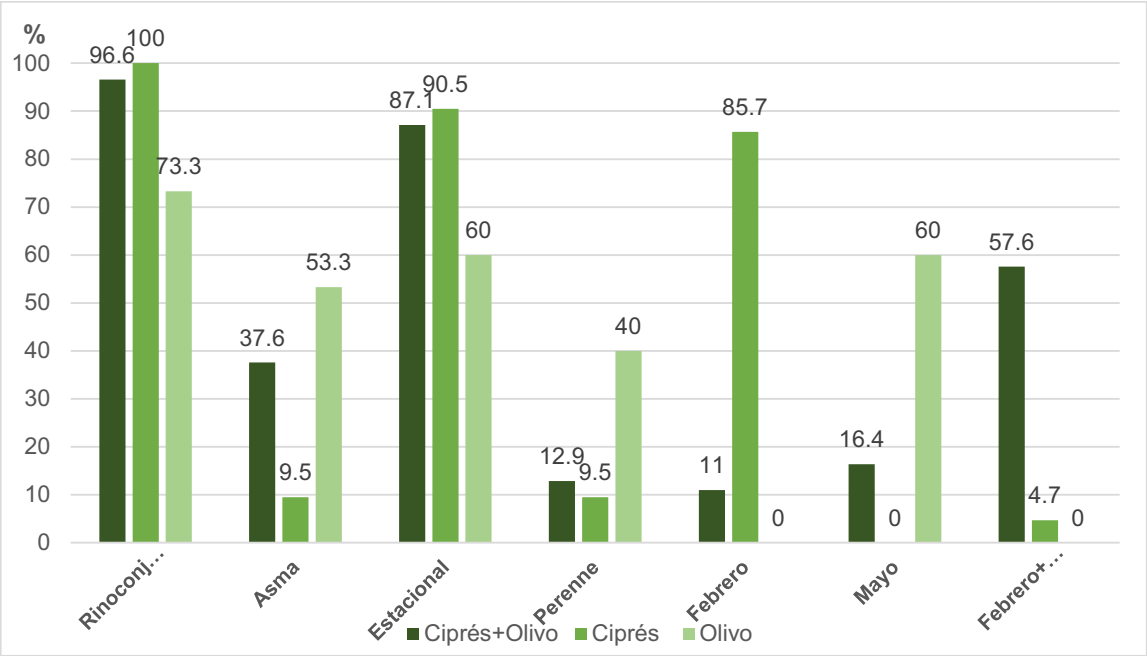

Figura 17. Resumen de los datos clínicos más relevantes de nuestros pacientes.

4.2.3 Análisis de correspondencia

El siguiente gráfico (Fig. 19) representa los resultados del análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre síntomas, estacionalidad y el grupo de pacientes. Mientras con una sola dimensión (dimensión 1) se explica un 73% de la variabilidad total, con las 2 dimensiones se explica el 86% de la variabilidad total. La dimensión 1 (elipse color negro) viene determinada principalmente por la asociación de sensibilización a polen de olivo con síntomas perennes y de asma, y por la asociación entre sensibilización a polen de ciprés con rinoconjuntivitis y con síntomas estacionales, al igual que los pacientes con doble sensibilización a ciprés+olivo con síntomas estacionales,–aunque en estos pacientes es más débil la asociación. En el 12,7% (elipse color rojo) la sensibilización a polen de ciprés se asocia a rinoconjuntivitis y la doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo se asocia a síntomas de rinoconjuntivitis y asma.

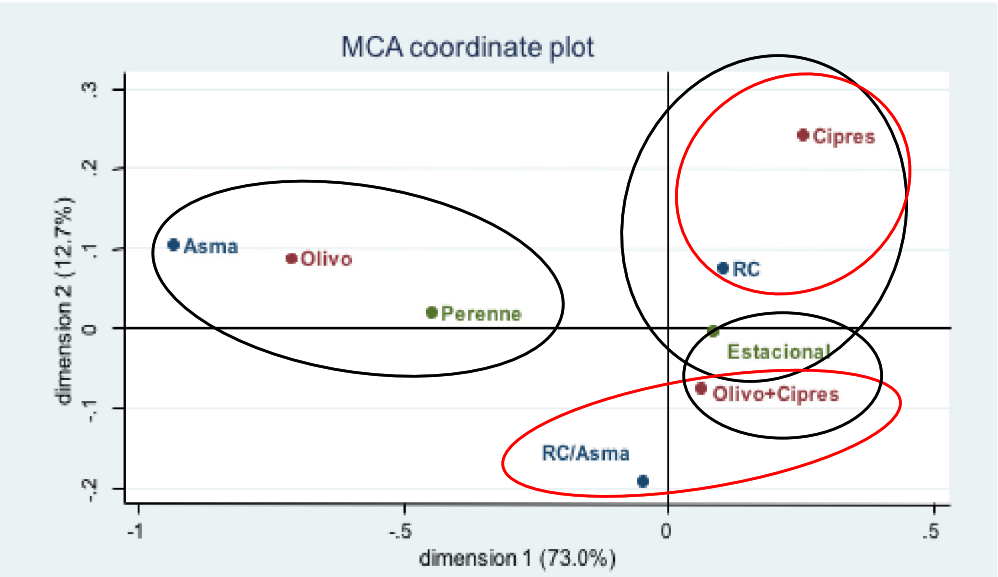

Figura 18. Análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre síntomas, estacionalidad y grupo de pacientes.

Ciprés: monosensibilización a polen de ciprés; Olivo: monosensibilización a polen de olivo; Olivo+Ciprés: sensibilización a polenes de ciprés y olivo; RC: rinoconjuntivitis.

4.2.4 Pruebas cutáneas

En la Tabla 7 podemos observar los resultados de las PC con los dos extractos de polen *C. arizonica* (*Ca*) y *C. sempervirens* (*Cs*), cuando comparamos los grupos de monosensibilización y doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo.

Tabla 7. Resultados de las pruebas cutáneas con extractos de *C. arizonica* (Ca), *C. sempervirens* (Cs) en los pacientes.

		Ciprés+Olivo n=85	Ciprés n=21	*p*
PC *Ca* (mm)	Mediana (RIQ)	5 (4 - 7)	5 (4,5 - 8)	0,455
	Rango	3 - 11	3 - 12	
PC *Cs* (mm)	Mediana (RIQ)	4 (2 - 5)	5 (4 - 6)	0,034
	Rango	0 - 10	0 - 8	
PC *histamina*	Mediana (RIQ)	6 (5 - 8)	6 (5 - 7,75)	0,170
	Rango	4 - 10	4 - 10	
R PC *Ca /Pc histamina*	Mediana (RIQ)	0,83 (0,63 - 1,17)	0,95 (0,7 - 1,08)	0,652
	Rango	0,4 - 2	0,5 - 1,67	
R PC *Cs /Pc histamina*	Mediana (RIQ)	0,6 (0,4 - 0,77)	0,71 (0,6 - 1)	0,035
	Rango	0 - 1,6	0 - 1	

PC Ca: PC extracto *C. arizonica*; PC Cs: PC extracto *C. sempervirens*; R: Proporción; RIQ: rango intercuartílico.

Los resultados de las PC con los extractos de polen de *Ca*, *Cs* cuando comparamos doble sensibilización y monosensibilización, son similares al comparar el polen de *Ca*. En cambio, son mayores en el grupo de monosensibilización al comparar el polen de *Cs* (*p* 0.034).

En la Tabla 8 podemos observar los resultados de las PC con el extracto de polen de *Olea* cuando comparamos los grupos de monosensibilización a olivo y doble sensibilización a ciprés+olivo.

Tabla 8. Resultados de las pruebas cutáneas con polen de *Olea* en los pacientes.

		Ciprés+Olivo	Olivo	*p*
		n=85	n=15	
PC *O* (mm)	Mediana (RIQ)	7 (6 - 9)	10 (7 - 12)	0,062
	Rango	4 - 17	4 - 16	
PC *histamina*	Mediana (RIQ)	6 (5 - 8)	6 (5 - 7,75)	0,170
	Rango	4 - 10	4 - 10	
R PC *O* /Pc *histamina*	Mediana (RIQ)	0,6 (0,4 - 0,77)	1,71 (1,13 - 2,2)	0,014
	Rango	0 - 1,6	0,8 - 3,2	

PC O: PC extracto *Olea europaea*; R: Proporción; RIQ: rango intercuartílico.

Son particularmente notables las diferencias entre pacientes con monosensibilización a polen de olivo y doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo, 3 mm, al comparar el polen de *Olea europaea* (*p* 0.062), lo que se observa igualmente en Fig. 19.

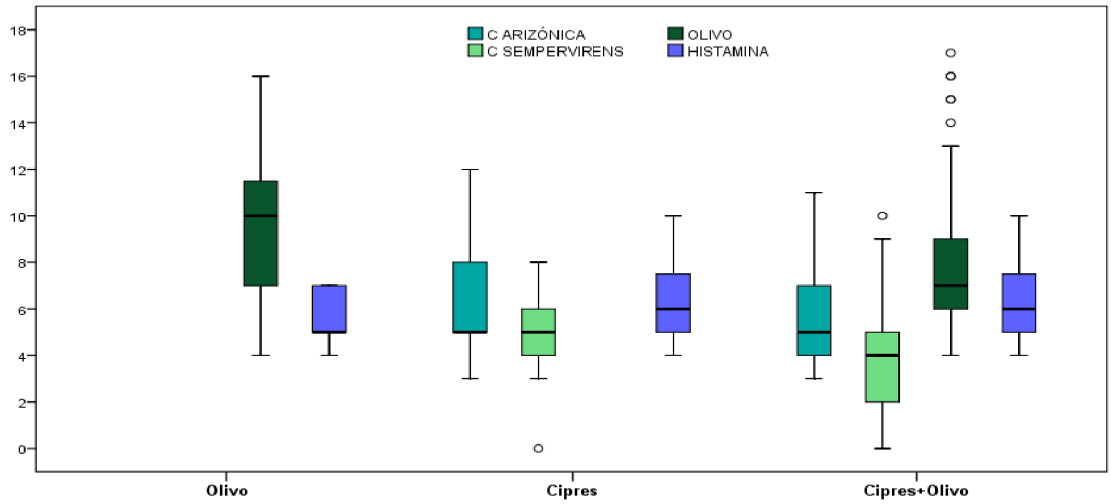

Figura 19. Pruebas cutáneas (mm).

C. ARIZÓNICA: PC extracto *C. arizonica*; C. OLIVO: PC extracto *Olea europaea*; C. SEMPERVIRENS: PC extracto *C. sempervirens*; HISTAMINA: PC histamina.

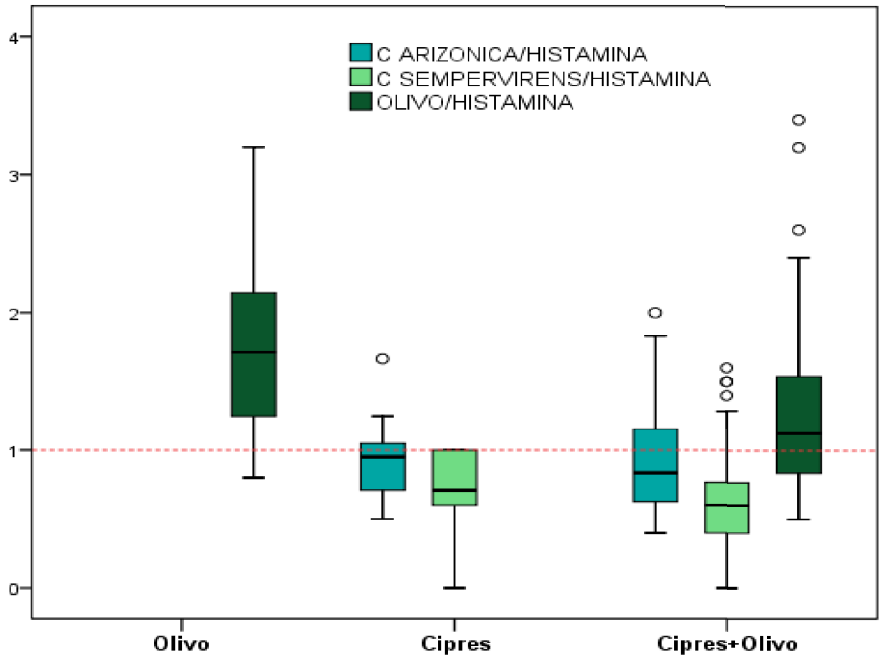

Figura 20. Proporción entre pruebas cutáneas a pólenes y prueba cutánea a histamina.

C. ARIZONICA/HISTAMINA: proporción entre PC extracto *C. arizonica* y PC histamina; C. OLIVO/HISTAMINA: proporción entre PC extracto *Olea europaea* y PC histamina; C. SEMPERVIRENS/HISTAMINA: proporción entre PC extracto *C. sempervirens* y PC histamina; HISTAMINA: PC histamina.

Con respecto a la proporción con la histamina también se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de monosensibilización y doble sensibilización con el polen de *Cs* y con polen de *Olea.* En el primer caso, aunque ambas proporciones son <1, la prueba respecto a la histamina es superior en los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés; en el caso de la PC con polen de *Olea europaea*, la prueba es mayor que la histamina (proporción >1) en ambos grupos, siendo la proporción superior en los pacientes monosensibilizados a polen de olivo (Fig. 20).

4.2.5 Determinación de IgE específica *in vitro* mediante la técnica ImmunoCAP

En la Tabla 9 se presentan los resultados de la determinación de la IgE específica *in vitro* mediante la técnica *Immuno*CAP.

Tabla 9. Determinación de IgE específica *in vitro* por ImmunoCAP a *C. arizonica* (Ca), *C. sempervirens* (Cs) y ambos (*Cupressus*).

		Ciprés+Olivo n=85	Ciprés n=21	*p*
CAP *Ca*	Mediana (RIQ)	1,34 (0,39 - 4,55)	3,1 (1,09 - 5,4)	0,291
	Rango	0 - 18,9	0,37 - 27,5	
	Positivo (>0,35kU/L)	21 (77,8%)	16 (100%)	0,069
CAP *Cs*	Mediana (RIQ)	0,88 (0 - 2,54)	1,01 (0,59 - 2,45)	0,611
	Rango	0 - 8,85	0 - 10,7	
	Positivo (>0,35kU/L)	44 (68,8%)	6 (85,7%)	0,665
CAP *Ca*+*Cs*	Positivo (>0,35kU/L)	65 (76,5%)	20 (95,2%)	0,067
IgE total	Mediana (RIQ)	85,6 (39,65 - 172,5)	83,7 (49,13 - 209,75)	1
	Rango	6,2 - 2080	2 - 382	
R CAP *Ca*/IgE total	Mediana (RIQ)	0,02 (0,01 - 0,04)	0,04 (0,01 - 0,07)	0,072
	Rango	0 - 0,11	0 - 1,43	
R CAP *Cs*/IgE total	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,03)	0,01 (0 - 0,03)	0,283
	Rango	0 - 0,17	0 - 0,06	

CAP: ImmunoCAP; CAP Ca: CAP extracto *C. arizonica*; CAP Cs: CAP extracto *C. sempervirens*; R: proporción; RIQ: rango intercuartílico. Unidades de CAP: kU/L; unidades de IgE total: IU/ml.

El resultado del CAP a *Ca* y *Cs* es mayor en el grupo de pacientes monosensibilizados a polen de ciprés, pero sin significación estadística. Se observan que los valores son más llamativos con CAP a *Ca* con una mediana de 3,1 kU/L (RIQ: 1,09 - 5,4) frente a 1,34 kU/L (RIQ: 0,39 - 4,55)

Además, el porcentaje de positividad del CAP a *Ca* y del CAP a *Cs* en el grupo de pacientes monosensibilizados a polen de ciprés es mayor, cuando lo comparamos con el grupo de doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo, aunque no de manera estadísticamente significativa. Al combinar ambos resultados de CAP (CAP *Ca* y/o CAP *Cs)* en la variable CAP a cupresáceas (*Cupressus*), encontramos también mayor porcentaje (95,2%) aunque no llega a ser significativo (*p* 0,067).

Tabla 10. Determinación de IgE específica *in vitro* por ImmunoCAP a *Olea europaea.*

		Ciprés+Olivo n=85	Olivo n=15	*p*
CAP *Olea*	Mediana (RIQ)	7,08 (1,3 - 18,1)	0,4 (0 - 1,57)	<0,001
	Rango	0 - 100	0 - 6,72	
	Positivo (>0,35kU/L)	78 (91,8%)	8 (53,3%)	0,001
IgE total	Mediana (RIQ)	85,6 (39,65 - 172,5)	28,2 (19 - 70,7)	0,006
	Rango	6,2 - 2080	8,37 - 479	
R CAP *O*/IgE total	Mediana (RIQ)	0,09 (0,01 - 0,2)	0 (0 - 0,08)	0,002
	Rango	0 - 0,67	0 - 0,73	

CAP Olea: CAP extracto *Olea europaea*; R: proporción; RIQ: rango intercuartílico. Unidades de CAP: kU/L; unidades de IgE total: IU/ml.

El resultado del CAP *Olea europaea* es mayor en el grupo con doble sensibilización a ciprés+olivo con un valor de mediana de 7,08 kU/L (RIQ: 19 - 70,7), respecto al de monosensibilizados a olivo con una mediana de 0,4 kU/L (RIQ 0- 1,57) (*p*< 0,001).

Se observa mayor porcentaje de positivos a CAP de *Olea europaea* en el grupo de doble sensibilización ciprés+olivo (91,8%, *p* 0,001), respecto al grupo de monosensibilizados a polen de olivo.

El resultado de la IgE total es mayor en los pacientes del grupo ciprés+olivo con una mediana de 85,6 (RIQ: 39,65 - 172,5) y en el grupo de monosensibilizados a ciprés

con una mediana de 83,7 (RIQ 49,13 - 209,75) respecto al valor de la IgE total del grupo de monosensibilizados a olivo con una mediana de 28,2 (RIQ: 19 - 70,7), con una *p* 0,006.

En la Tabla 10, los pacientes monosensibizados al olivo comparados con los de doble sensibilización ciprés+olivo, tienen menores valores de IgE específica a polen de *Olea* y de IgE total. Al hacer la proporción de IgE a *Olea*/IgE total se corrige, pero aún así, se observa que los pacientes con doble desensibilización a ciprés+olivo tienen una proporción mayor (*p* 0,002), con lo que parece que son capaces de generar una mayor respuesta de IgE específica al polen de *Olea*.

Se ha confirmado con los resultados del *Immuno*CAP que ningún paciente del grupo monosensibilizados a ciprés tiene IgE específica mediante esta técnica frente al polen de olivo (extracto completo), al igual que todos los pacientes monosensibilizados a polen de olivo, tienen el CAP a extracto de ciprés (*Ca* o *Cs*) negativo.

4.2.6 Determinación de IgE específica *in vitro* mediante ELISA

Estas determinaciones se realizaron en 77 pacientes del grupo con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, 21 pacientes con sensibilización a polen ciprés y 15 pacientes sensibilizados a polen de olivo.

La Tabla 11 muestra los resultados de la determinación de IgE específica mediante ELISA para extracto de polen *Olea, Cupressus*, y alérgenos purificados nOle e 1, rOle e 2, rOle e 3, rOle e 9 (dominios Nt y Ct), rOle e 11 y rOle e 12 de polen de olivo y rCup s 1 de polen de ciprés. En todos los pacientes se testó el alérgeno nOle e 7, con resultado negativo en todos los pacientes. La determinación de IgE específica frente a bromelina fue positiva en el 7,1% de los pacientes con doble desensibilización a pólenes de ciprés+olivo, 19% de los pacientes con sensibilización a polen de ciprés y 20% de los pacientes con sensibilización a polen de olivo.

Tabla 11. Resultados de IgE específica mediante ELISA.

		Ciprés+Olivo n=77	Ciprés n=21	Olivo n=15	*p*
Ext *Olea*	Mediana (RIQ)	0,34 (0,06 - 0,64)	0,04 (0,03 - 0,21)	0,01 (0 - 0,04)	0,002
	Rango	0 - 2,91	0 - 0,78	0 - 0,15	
	Positivo (>0,10)	54 (70,1%)	1 (4,8%)	4 (26,7%)	< 0,001
Ext *Cipres*	Mediana (RIQ)	0,06 (0,02 - 0,15)	0,11 (0,06 - 0,17)	0,09 (0,06 - 0,12)	0,186
	Rango	0 - 0,3	0 - 0,31	0,04 - 0,3	
	Positivo (>0,10)	33 (42,9%)	12 (57,1%)	7 (46,7%)	0,507
Ole e 1	Mediana (RIQ)	0,45 (0,1 - 1,25)	0 (0 - 0,01)	0,03 (0,03 - 0,19)	< 0,001
	Rango	0 - 3,09	0 - 0,08	0 - 1,13	
	Positivo (>0,10)	57 (74%)	0 (0%)	5 (33,3%)	< 0,001
Ole e 2	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,01)	0,01 (0 - 0,02)	0,01 (0 - 0,03)	0,210
	Rango	0 - 0,11	0 - 0,11	0 - 0,05	
	Positivo (>0,10)	1 (1,3%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0,538
Ole e 3	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,01)	0 (0 - 0,01)	0,828
	Rango	0 - 0,58	0 - 0,02	0 - 0,01	
	Positivo (>0,10)	2 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	1
NtDOle e 9	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,01)	0,01 (0 - 0,04)	0,04 (0,01 - 0,08)	< 0,001
	Rango	0 - 2,55	0 - 0,08	0 - 0,12	
	Positivo (>0,10)	3 (3,9%)	0 (0%)	3 (20%)	0,045
CtDOle e 9	Mediana (RIQ)	0,03 (0 - 0,05)	0,05 (0,02 - 0,1)	0,05 (0,02 - 0,08)	0,016
	Rango	0 - 2,4	0 - 0,21	0,01 - 0,15	
	Positivo (>0,10)	8 (10,4%)	5 (23,8%)	2 (13,3%)	0,251
Ole e 9	Positivo (>0,10)	9 (11,7%)	5 (23,8%)	5 (33,3%)	0,060
Ole e 11	Mediana (RIQ)	0,03 (0 - 0,08)	0,05 (0,03 - 0,1)	0,05 (0,02 - 0,07)	0,055
	Rango	0 - 0,48	0,02 - 0,14	0,01 - 0,29	
	Positivo (>0,10)	15 (19,5%)	5 (23,8%)	2 (13,3%)	0,767
Ole e 12	Mediana (RIQ)	0,02 (0 - 0,04)	0,01 (0 - 0,03)	0,02 (0,01 - 0,03)	0,781
	Rango	0 - 0,29	0 - 0,08	0 - 0,12	
	Positivo (>0,10)	3 (3,9%)	0 (0%)	2 (13,3%)	0,173
Ole e	Positivo (>0,10)	61 (79,2%)	9 (60%)	9 (42,9%)	0,004
Ole e menor	Positivo (>0,10)	23 (29,9%)	9 (42,9%)	6 (40%)	0,425
Cup s 1	Mediana (RIQ)	0,17 (0,05 - 0,39)	0,26 (0,17 - 0,85)	0,02 (0 - 0,03)	< 0,001
	Rango	0 - 1,97	0,04 - 2,23	0 - 0,15	
	Positivo (>0,10)	46 (59,7%)	19 (90,5%)	1 (6,7%)	< 0,001

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥0,10. Ext: extracto; "Ole e": cualquier alérgeno de polen de olivo; "Ole e menor": cualquier alérgeno minoritario de polen de olivo; RIQ: rango intercuartílico.

Con respecto a los resultados de la IgE específica mediante ELISA, encontramos diferencias estadísticamente significativas con extracto de polen de *Olea* ($p<0.001$) y Ole e 1 ($p<0.001$), de forma que el grupo con doble sensibilización a ciprés+olivo presenta valores más altos.

70,1% de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo presentan valores positivos (≥0,10 DO) a extracto de polen de *Olea*, frente al 26% de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo y 4,8% de los monosensibilizados a polen de ciprés ($p<0,001$). De igual modo, 74% de los pacientes con doble sensibilización ciprés+olivo presentan valores ≥0,10 DO a Ole e 1, frente al 33,3% de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo y 0% de los monosensibilizados a polen de ciprés ($p<0,001$). Se observan diferencias con respecto al NtD-Ole e 9, de forma que el porcentaje de casos positivos es mayor en el grupo de monosensibilizados a polen de olivo con un 20%. Los otros grupos presentan menor porcentaje, 3,9% en pacientes con doble sensibilización ciprés+olivo y 0% en monosensibilizados a polen de ciprés (p 0,045).

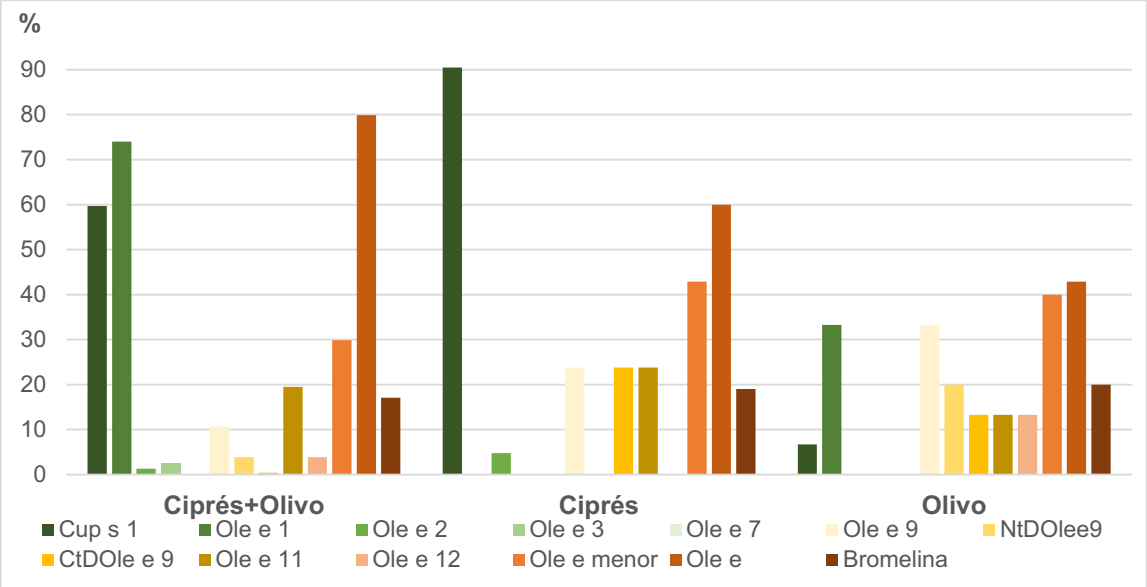

Figura 21. Frecuencia (%) de sensibilización (valores ≥0,10 DO) a alérgenos en pacientes de los tres grupos.

"Ole e": cualquier alérgeno de polen de olivo; "Ole e menor": cualquier alérgeno minoritario de Ole e; "Ole e 9": CtD-Ole e 9 y/o NtD-Ole e 9.

En la Fig. 21 se observan las frecuencias de sensibilización a los diferentes alérgenos testados en los tres grupos de pacientes. Se han combinado los alérgenos NtD-Ole e 9 y CtD-Ole e 9 en la variable “Ole e 9”. Las sensibilizaciones más prevalentes a alérgenos en los pacientes del grupo de doble sensibilización ciprés+olivo fueron: Ole e 1 (74%), Cup s 1 (59,7%), Ole e 11 (19,5%), “Ole e 9” (11,7%), CtD-Ole e 9 (10,4%), siendo inferiores para el resto de alérgenos testados NtD-Ole e 9 (3,9%), Ole e 12 (3,9%), Ole e 3 (2,6%), y Ole e 2 (2,3%). En los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés, la sensibilización más frecuente fue a Cup s 1 (90,5%), aunque también se objetivó sensibilización a alérgenos de olivo, “Ole e 9” (23,8%), CtD-Ole e 9 (23,8%), Ole e 11 (23,8%), y Ole e 2 (4,8%). En los pacientes monosensibilizados a pólenes de olivo las sensibilizaciones más relevantes fueron Ole e 1 (33,3%), junto con “Ole e 9” (33,3%), seguida de NtD-Ole e 9 (20%), CtD-Ole e 9 (13,3%), Ole e 11 (13,3%), Ole e 12 (13,3%), y Cup s 1 (6,7%).

Llama la atención que los pacientes monosensibilizados a ciprés tengan IgE específica frente a alérgenos de polen de olivo CtD-Ole e 9 y Ole e 11 hasta en un 23,8% de los casos para cada uno, lo cual no está descrito previamente.

Al combinar los alérgenos NtD-Ole e 9 y/o CtD-Ole e 9, en la variable “Ole e 9”, se comprueba que aumenta la prevalencia en el grupo de pacientes monosensibilizados a polen de olivo, sobre todo comparando con el grupo con doble sensibilización a ciprés+olivo, con un valor de *p* 0,06, pero sin alcanzar significación estadística.

Es más frecuente la sensibilización a cualquier alérgeno de polen de olivo testado (variable “Ole e”) en los pacientes con doble sensibilización a ciprés+olivo que en los grupos de pacientes monosensibilizados, lo cual es debido a la sensibilización a Ole e 1. Si tenemos en cuenta la variable “Ole e menor” (cualquier Ole e minoritario), es llamativo una prevalencia de sensibilización del 42,9% en los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés (por positividades a CtD-Ole e 9, Ole e 11 y Ole e 2). Porcentajes inferiores de sensibilización a “Ole e menor”

encontramos en monosensibilizados a polen de olivo (40%) y en los pacientes con doble sensibilización a ciprés+olivo (29,9%).

4.2.7 Análisis de correspondencia

La Figura 22 representa los resultados del análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre la sensibilización a alérgenos y el grupo de pacientes. Se tiene que con una sola dimensión (dimensión 1) se explica un 45,2% de la variabilidad total. Con las 2 dimensiones se explica el 60% de la variabilidad total. La dimensión 1 (elipse color azul) discrimina principalmente los pacientes del grupo monosensibilizados a polen de olivo y monosensibilizados a polen de ciprés. Viene determinada principalmente por la asociación de pacientes monosensibilizados a polen de olivo con sensibilización a alérgenos Ole e 12, NtD-Ole e 9 y Ole e 11, y por la asociación entre los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés con la sensibilización a Cup s1 y CtD-Ole e 9. La segunda dimensión, que explica el 14,8% de variabilidad (elipse color rojo), discrimina los grupos de monosensibilizados del grupo de doble sensibilización ciprés+olivo. Se observa una asociación entre la sensibilización a Cup s 1 y Ole e 1 con la doble sensibilización ciprés+olivo.

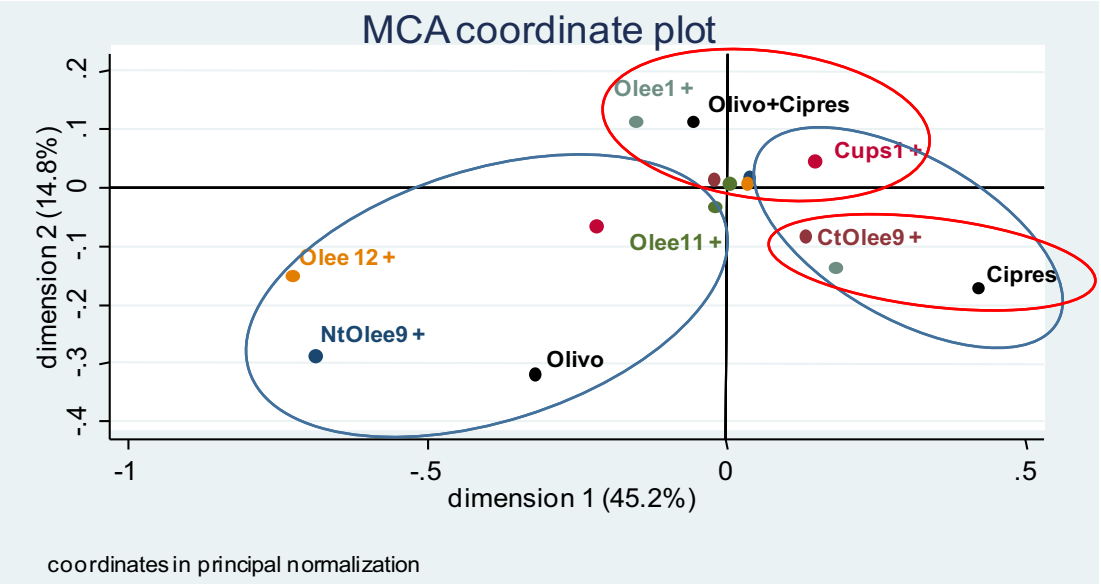

Figura 22. Análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre alérgenos y grupo de pacientes.

Ciprés: monosensibilización a polen de ciprés; Olivo: monosensibilización a polen de olivo; Olivo+Ciprés: sensibilización a pólenes de ciprés y olivo.

4.2.8 Análisis de la sensibilización a los alérgenos mayores específicos de especie Cup s 1 y Ole e 1 en los 3 grupos de pacientes

Hemos dividido a los 113 pacientes (ciprés+olivo=77, ciprés=21, olivo=15) en 4 grupos (G1, G2, G3 y G4) según positividad o no de los alérgenos mayores de polen de ciprés y olivo (Cup s 1 y Ole e 1, respectivamente). Se observa la frecuencia de sensibilización siguiente en los pacientes con doble sensibilización a ciprés+olivo: 44,2% (Cup s 1+/ Ole e 1+), 29.9% (Cup s 1-/ Ole e 1+), 15,6% (Cup s 1+/ Ole e 1), 10,4% (Cup s 1-/Ole e 1-). Ninguno de los pacientes de los grupos de monosensibilizados a ciprés u olivo está sensibilizado al par Cup s 1+/Ole e 1+. El 90,5% de los pacientes monosensibilizados a ciprés están sensibilizados a Cup s 1+/Ole e 1-. Sólo el 33,3% de los pacientes con monosensibilización a olivo

están sensibilizados a Ole e 1 (Cup s 1-/Ole e 1+), mientras el 66,7% lo está a otros alérgenos diferentes del Ole e 1 (grupos G2 y G4).

Tabla 12. Sensibilización a los alérgenos mayores específicos de especie, Cup s 1 y Ole e 1, en los pacientes de los 3 grupos (doble sensibilización y monosensibilizados a ciprés y a olivo).

		Ciprés+Olivo	Ciprés	Olivo	*p*
		n=77	n=21	n=15	
G1	Cups1+ Olee1+	34 (44,2%)			< 0,001
G2	Cups1+ Olee1-	12 (15,6%)	19 (90,5%)	1 (6,7%)	
G3	Cups1- Olee1+	23 (29,9%)		5 (33,3%)	
G4	Cups1- Olee1-	8 (10,4%)	2 (9,5%)	9 (60%)	

G: grupo.

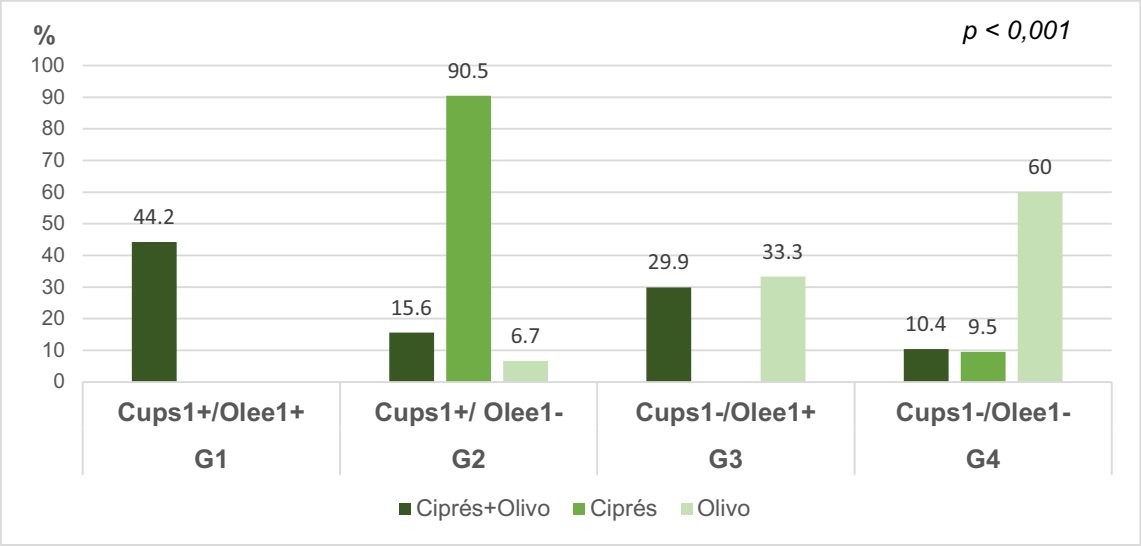

Figura 23. Porcentaje de sensibilización a grupos de pares de alérgenos. G: grupo.

4.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON DOBLE SENSIBILIZACIÓN A PÓLENES CIPRÉS Y OLIVO

A continuación, se describen las características clínicas e inmunológicas de los 77 pacientes con doble sensibilización a polen de ciprés y olivo.

4.3.1 Edad y sexo. Síntomas respiratorios, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas

En la Tabla 13 se analizan las diferencias entre los 4 grupos, según edad, sexo, síntomas, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas.

Tabla 13. Diferencias según edad, sexo, síntomas, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas.

		G1	G2	G3	G4	*p*
		Cups1+, Olee1+	Cups1+, Olee1-	Cups1-, Olee1+	Cups1-, Olee1-	
		n=34	n=12	n=23	n=8	
Edad	Media ± Desviación	38,12 ± 13,62	32,92 ± 6,11	32,35 ± 13,13	28,38 ± 12,86	0,141
	Mediana (RIQ)	38 (29,5 - 49)	32 (27,75 - 37,75)	35 (20 - 41)	27,5 (17,75 - 37,25)	
	Rango	13 - 66	24 - 43	7 - 58	12 - 52	
Sexo	Hombre	10 (29,4%)	6 (50%)	13 (56,5%)	3 (37,5%)	0,191
	Mujer	24 (70,6%)	6 (50%)	10 (43,5%)	5 (62,5%)	
Síntomas	RC	21 (61,8%)	8 (66,7%)	15 (65,2%)	5 (62,5%)	0,671
	Asma			2 (8,7%)		
	RC/Asma	13 (38,2%)	4 (33,3%)	6 (26,1%)	3 (37,5%)	
Rinoconjuntivitis	No			2 (8,7%)		0,214
	Sí	34 (100%)	12 (100%)	21 (91,3%)	8 (100%)	
Asma	No	21 (61,8%)	8 (66,7%)	15 (65,2%)	5 (62,5%)	1
	Sí	13 (38,2%)	4 (33,3%)	8 (34,8%)	3 (37,5%)	
Estación	Estacional	26 (76,5%)	9 (75%)	17 (73,9%)	7 (87,5%)	0,955
	Perenne	4 (11,8%)	1 (8,3%)	4 (17,4%)	1 (12,5%)	
	Estacional/Perenne	4 (11,8%)	2 (16,7%)	2 (8,7%)		
Estacional	Estacional	30 (88,2%)	11 (91,7%)	19 (82,6%)	7 (87,5%)	0,917
	Perenne	4 (11,8%)	1 (8,3%)	4 (17,4%)	1 (12,5%)	
Mes	Febrero	3 (10%)	6 (54,5%)	2 (10,5%)		< 0,001
	Mayo	3 (10%)	1 (9,1%)	4 (21,1%)	3 (42,9%)	
	Febrero/Mayo	24 (80%)	4 (36,4%)	13 (68,4%)	4 (57,1%)	

Asma: asma aislada; Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; DE: Desviación estándar; G: grupo; RC: rinoconjutivitis aislada; RC/Asma: ambos rinonjunjuntivitis y asma; Rinoconjuntivitis No: asma aislada; Rinoconjuntivitis Si: rinoconjuntivitis con/sin asma; RIQ: rango intercuartílico.

No hay diferencias significativas en la distribución por sexo ni en la edad en los 4 grupos G1 a G4 de los pacientes con doble sensibilización ciprés+olivo. A pesar de ello, sí parece que los pacientes del grupo G1 (Cup s 1+/ Ole e 1+), son de mayor edad, sobre todo respecto a los del grupo G4 (Cup s 1-/Ole e 1-).

Así mismo, son más frecuentes las mujeres en los grupos G1 y G4, aunque sin diferencias significativas.

No hay diferencias en cuanto a los síntomas respiratorios y estacionalidad, pero sí se observan diferencias significativas (p<0,001) en cuanto al mes de presentación de los síntomas, ya que los meses de presentación febrero+mayo son más frecuentes en los pacientes sensibilizados a Ole e 1 (grupos G1 y G3). Y los

pacientes con sensibilización a Cup s 1 tienen síntomas más frecuentes en febrero, sobre todo si no están sensibilizados al alérgeno mayor del olivo Ole e 1.

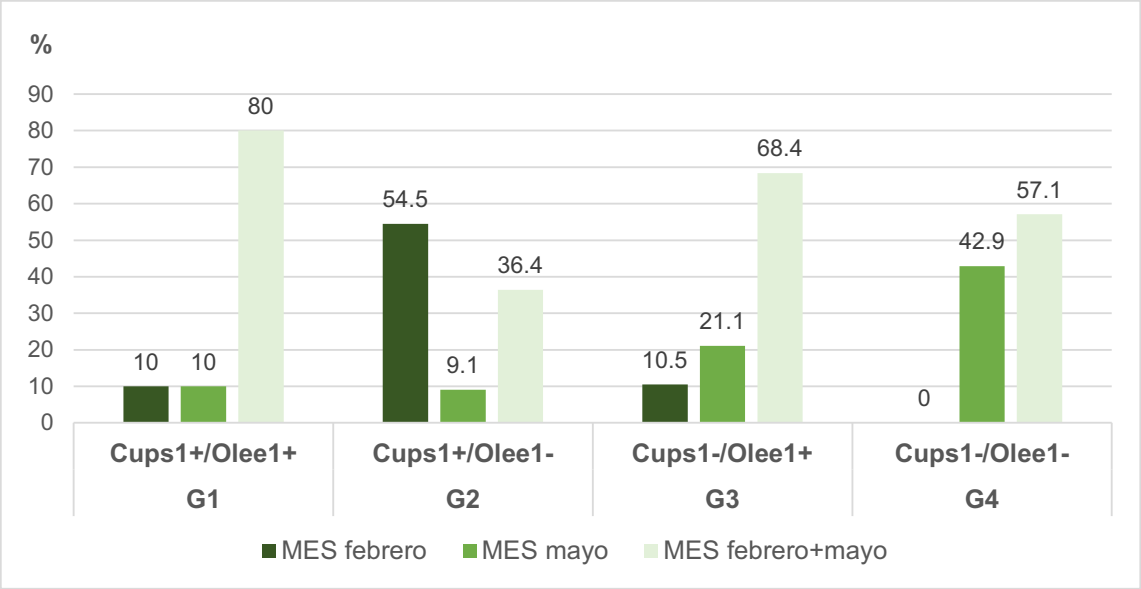

Figura 24. Porcentaje (%) de sensibilización a cada par de alérgenos según el mes de presentación de los síntomas.

4.3.2 Pruebas cutáneas, Determinación de IgE específica mediante InmunoCAP

Tabla 14. Diferencias respecto a las pruebas cutáneas y determinación de IgE específica mediante *Immuno*CAP.

		G1	G2	G3	G4	*p*
		Cups1+, Olee1+	Cups1+, Olee1-	Cups1-, Olee1+	Cups1-, Olee1-	
		n=34	n=12	n=23	n=8	
***PC Ca* (mm)**	Media ± DE	5,68 ± 1,92	6,83 ± 2,29	5,52 ± 1,83	4,5 ± 1,2	0,081
	Mediana (RIQ)	5,5 (4 - 7)	6,5 (5 - 8,75)	5 (4 - 7)	4 (4 - 5)	
	Rango	3 - 10	4 - 11	3 - 9	3 - 7	
***PC Cs* (mm)**	Media ± DE	4,06 ± 2,32	4,25 ± 2,56	3,59 ± 2,61	2,43 ± 2,37	0,459
	Mediana (RIQ)	4 (3 - 5,5)	4,5 (2,25 - 5,75)	3,5 (1,5 - 5,25)	3 (0 - 5)	
	Rango	0 - 9	0 - 10	0 - 9	0 - 5	
***PC Olea* (mm)**	Media ± DE	8,32 ± 2,94	6,92 ± 3,6	8,26 ± 2,86	6,38 ± 2,97	0,059
	Mediana (RIQ)	8 (6 - 10)	6 (4,25 - 8)	8 (6 - 10)	5,5 (4,25 - 7,5)	
	Rango	4 - 16	4 - 17	5 - 16	4 - 13	
***CAP Ca* (kU/L)**	Media ± DE	6,22 ± 5,8	2,71 ± 2,11	0,37 ± 0,57	0,11 ± 0,16	0,003
	Mediana (RIQ)	3,79 (1,54 - 11,45)	1,86 (1,01 - 4,84)	0 (0 - 0,92)	0,11 (0 - 0,22)	
	Rango	1,04 - 18,9	0,72 - 5,86	0 - 1,3	0 - 0,22	
	Positivo (>0,35)	13 (100%)	5 (100%)	2 (40%)		0,001
***CAP Cs* (kU/L)**	Media ± DE	3,21 ± 2,88	2,09 ± 1,75	0,48 ± 0,6	0,89 ± 1,26	0,001
	Mediana (RIQ)	2,21 (0,62 - 5,56)	1,04 (0,67 - 3,72)	0,19 (0 - 0,91)	0,47 (0 - 2)	
	Rango	0 - 8,85	0,45 - 4,66	0 - 2	0 - 3,24	
	Positivo (>0,35)	19 (90,5%)	7 (100%)	10 (47,6%)	4 (50%)	0,002
***CAP Cupressus* (kU/L)**	Positivo (>0,35)	32 (94,1%)	12 (100%)	12 (52,2%)	4 (50%)	0,017
***CAP Olea* (kU/L)**	Media ± DE	28,42 ± 29,41	0,61 ± 0,63	15,9 ± 23,14	0,63 ± 0,66	< 0,001
	Mediana (RIQ)	16,25 (7,14 - 43,38)	0,6 (0 - 1,11)	9,51 (3,18 - 17,6)	0,4 (0,1 - 0,97)	
	Rango	1,13 - 100	0 - 1,78	1,14 - 100	0 - 1,99	
	Positivo (>0,35)	34 (100%)	7 (58,3%)	23 (100%)	6 (75%)	< 0,001
***IgE total* (UI/ml)**	Media ± DE	276,09 ± 420,6	184,15 ± 284,65	159,59 ± 206,07	118,9 ± 140,07	0,209
	Mediana (RIQ)	125 (71,3 - 263)	80,95 (51,08 - 199)	61,1 (29,2 - 174)	73,6 (10,49 - 238)	
	Rango	23 - 2080	23,4 - 1060	19 - 858	6,2 - 385	

CAP: inmunoCAP; CAP Ca: CAP extracto *C. arizonica*; CAP Cs: CAP extracto *C. sempervirens*; CAP Olea: CAP extracto *Olea europaea*; DE: desviación estándar; PC Ca: PC extracto *C. arizonica*; PC Cs: PC extracto *C. sempervirens*; PC Olea: PC extracto *Olea europaea*; RIQ: rango intercuartílico.

Se observa mayores valores de PC con polen de *Olea* en los pacientes sensibilizados a Ole e 1 (grupos G1 y G3) (*p* 0,059). Del mismo modo en los pacientes con sensibilización a Cup s 1 (grupos G1 y G2) las PC tienden a ser mayores con extracto de polen de *Ca* (*p* 0,08). El que no se alcance un nivel de significación estadística posiblemente viene dado por el tamaño muestral.

El resultado del CAP a *Ca* y *Cs* es mayor en los pacientes que están sensibilizados a Cup s 1 (Grupo G1 y G2), con valores mayores en los sujetos sensibilizados a Ole e 1 (grupo G1). Del mismo modo, el valor del CAP a *Olea* es mayor en los pacientes que están sensibilizados a Ole e 1 (grupos G1 y G3), con valores mayores en los pacientes sensibilizados a Cup s 1(grupo G1). Resultados similares se encuentran al analizar las frecuencias de sensibilización a cada extracto.

4.3.3 Determinación de IgE específica a alérgenos mediante ELISA

Los resultados se reflejan en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15. Diferencias en la sensibilización a alérgenos mediante ELISA.

		G1	G2	G3	G4	*p*
		Cups1+, Olee1+	Cups1+, Olee1-	Cups1-, Olee1+	Cups1-, Olee1-	
		n=34	n=12	n=23	n=8	
Ext Olea	Media ± DE	0,71 ± 0,61	0,04 ± 0,03	0,47 ± 0,45	0,07 ± 0,07	< 0,001
	Mediana (RIQ)	0,59 (0,3 - 0,86)	0,04 (0 - 0,06)	0,35 (0,15 - 0,6)	0,06 (0,02 - 0,11)	
	Rango	0,02 - 2,91	0 - 0,1	0,03 - 1,9	0,01 - 0,21	
Ext Cupresssus	Media ± DE	0,12 ± 0,09	0,11 ± 0,08	0,06 ± 0,07	0,03 ± 0,04	0,007
	Mediana (RIQ)	0,13 (0,04 - 0,18)	0,09 (0,05 - 0,18)	0,05 (0 - 0,1)	0 (0 - 0,07)	
	Rango	0 - 0,3	0 - 0,25	0 - 0,3	0 - 0,11	
Ole e 1	Media ± DE	1,21 ± 0,87	0,05 ± 0,03	0,78 ± 0,63	0,05 ± 0,03	< 0,001
	Mediana (RIQ)	1,18 (0,43 - 1,63)	0,06 (0,02 - 0,08)	0,54 (0,35 - 1,21)	0,05 (0,01 - 0,07)	
	Rango	0,11 - 3,09	0 - 0,1	0,13 - 2,65	0 - 0,1	
Ole e 2	Media ± DE	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0 ± 0,01	0,040
	Mediana (RIQ)	0,01 (0 - 0,03)	0,01 (0 - 0,01)	0 (0 - 0,01)	0 (0 - 0)	
	Rango	0 - 0,11	0 - 0,03	0 - 0,05	0 - 0,03	
Ole e 3	Media ± DE	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,12	0,01 ± 0,02	0,102
	Mediana (RIQ)	0,01 (0 - 0,03)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,01)	
	Rango	0 - 0,19	0 - 0,02	0 - 0,58	0 - 0,07	
NtDOle e 9	Media ± DE	0,02 ± 0,09	0,03 ± 0,03	0,12 ± 0,53	0,01 ± 0,03	0,002
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0)	0,02 (0 - 0,04)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0,03)	
	Rango	0 - 0,55	0 - 0,08	0 - 2,55	0 - 0,07	
CtDOle e 9	Media ± DE	0,16 ± 0,35	0,03 ± 0,03	0,12 ± 0,5	0,01 ± 0,02	0,001
	Mediana (RIQ)	0,04 (0,02 - 0,09)	0,03 (0 - 0,05)	0 (0 - 0,04)	0 (0 - 0,03)	
	Rango	0 - 1,6	0 - 0,1	0 - 2,4	0 - 0,06	
Ole e 11	Media ± DE	0,07 ± 0,1	0,08 ± 0,1	0,03 ± 0,05	0,03 ± 0,07	0,022
	Mediana (RIQ)	0,04 (0,01 - 0,1)	0,05 (0 - 0,1)	0 (0 - 0,05)	0 (0 - 0,05)	
	Rango	0 - 0,48	0 - 0,31	0 - 0,15	0 - 0,18	
Ole e 12	Media ± DE	0,04 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,016
	Mediana (RIQ)	0,03 (0,01 - 0,05)	0,03 (0,02 - 0,04)	0 (0 - 0,04)	0 (0 - 0,02)	
	Rango	0 - 0,29	0 - 0,06	0 - 0,11	0 - 0,03	
Cup s 1	Media ± DE	0,56 ± 0,53	0,4 ± 0,39	0,04 ± 0,04	0,05 ± 0,02	< 0,001
	Mediana (RIQ)	0,35 (0,21 - 0,78)	0,25 (0,15 - 0,56)	0,04 (0 - 0,08)	0,05 (0,04 - 0,06)	
	Rango	0,1 - 1,97	0,12 - 1,48	0 - 0,1	0 - 0,08	

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥ 0,1. Ext: extracto; DE: desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico.

Se observa que los valores del ELISA con el extracto de polen de *Olea* y Ole e 1 son mayores en los pacientes del grupo G1 (Cup s 1+/Cup s1+) respecto a los del grupo G3. Los valores de ELISA con extracto *de Cupressus* y Cup s 1 son mayores positivos en los pacientes del grupo G1 que los del grupo G2.

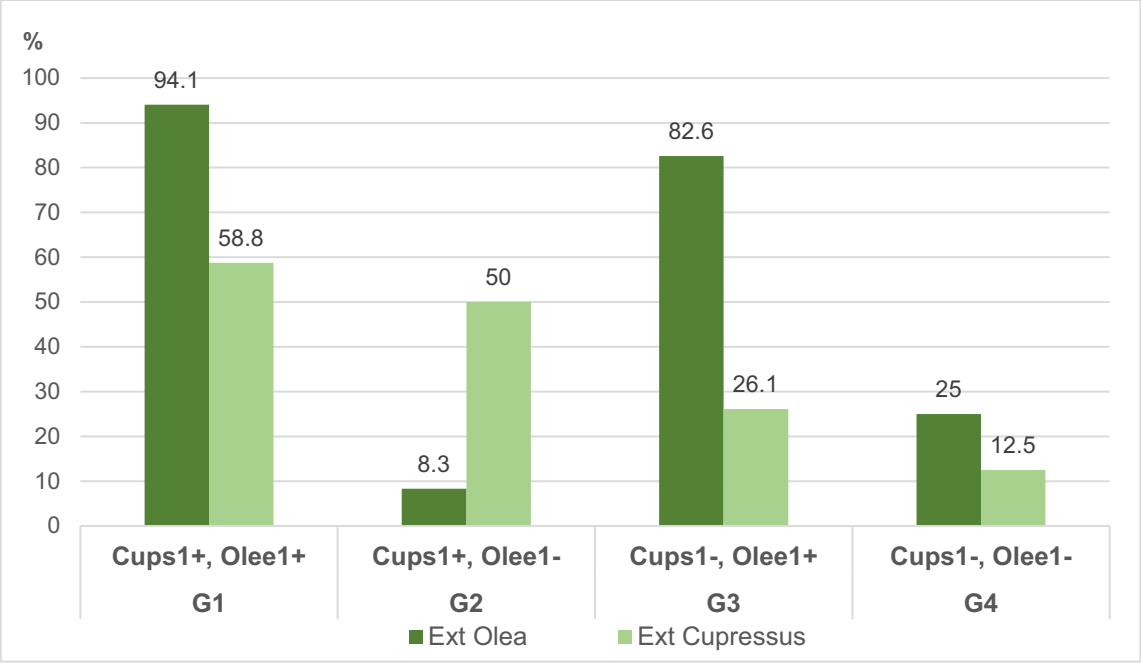

Figura 25. Frecuencia de IgE específica frente a alérgenos y extractos completos por ELISA, según grupos de alérgenos mayors.

Positivo si ≥0,10 DO. Ext Cupressus: extracto de polen de Cupressus; Ext Olea: extracto de polen de Olea.

En todos los grupos hemos encontrado sensibilización a los extractos de *Olea* y *Cupressus* mediante ELISA, incluso en los pacientes que no están sensibilizados a alérgenos mayores Cup s 1 y Ole e 1 (Fig. 25), aunque con menor frecuencia. Las diferencias han resultado estadísticamente significativas tanto para extracto de polen de *Olea* (p<0,001), como para extracto de polen de Cupressus (p 0,024).

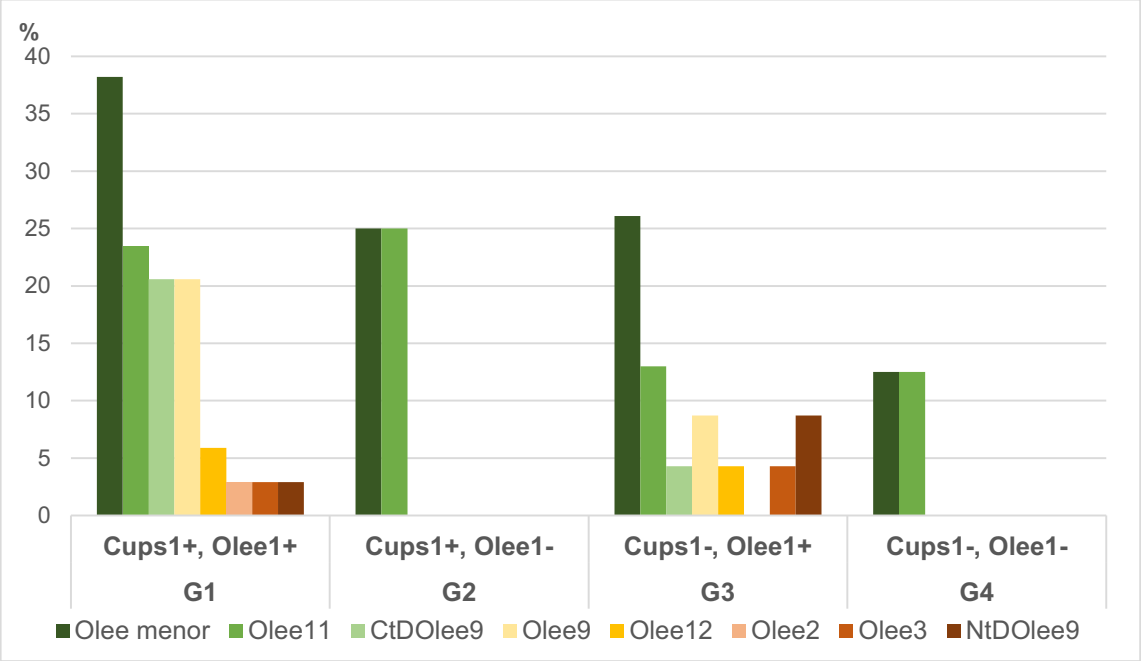

Figura 26. Frecuencia de IgE específica mediante ELISA a alérgenos menores según grupos de alérgenos mayores.

Ole e menor: cualquier Ole e minoritario de polen de olivo; Ole e 9: NtD-Ole e 9 y/o CtN-Ole e 9.

Encontramos que la sensibilización a alérgenos menores del polen de olivo ("Ole e menor") se observa en todos los grupos, sin diferencias significativas entre los grupos. Sólo en los grupos G2 y G4 es debida a la sensibilización a Ole e 11, ya que en estos grupos (G2 y G4) no se observa respuesta IgE frente al resto de alérgenos menores (Ole e 9, Ole e 12, Ole e 2 y Ole e 3).

4.3.4 Características clínicas e inmunológicas de los pacientes con doble sensibilizacion Ciprés+Olivo en funcion de los síntomas respiratorios, estacionalidad, mes de presentación de los síntomas

Edad y pruebas cutáneas

Los resultados se reflejan en la Tabla 16 a continuación.

Tabla 16. Edad y resultado de las pruebas cutáneas.

		ASMA			ESTACIONALIDAD			MES				Comparaciones multiples MES p ajustando por corrección		
		No	Sí	*p*	Estacional	Perenne	*p*	Febrero	Mayo	Febrero +	*p*	F vs M	F vs F/M	M vs F/M
		53	32		74	11		11	14	49				
Edad (a)	Media ± DE	34,64 ± 12,46	34,81 ± 13,37	0,713	33,93 ± 12,58	39,91 ± 13,17	0,146	32,73 ± 8,28	33,86 ± 12,65	34,22 ± 13,51	0,941	1	1	1
	Mediana (RIQ)	34 (26 - 43,5)	36,5 (25,5 - 44,25)		34,5 (25,75 - 42,25)	42 (27 - 51)		34 (26 - 39)	31,5 (24,5 - 40,5)	35 (24,5 - 44,5)				
	Rango	13 - 66	7 - 59		7 - 66	20 - 58		15 - 42	17 - 59	7 - 66				
PC *Ca* (mm)	Media ± DE	5,92 ± 2,15	5,28 ± 1,59	0,188	5,62 ± 2,07	6,09 ± 1,14	0,212	6 ± 2,1	5,64 ± 2,53	5,53 ± 1,95	0,749	1	1	1
	Mediana (RIQ)	6 (4 - 7)	5 (4 - 6)		5 (4 - 7)	6 (5 - 7)		5 (5 - 7)	4,5 (4 - 7,5)	5 (4 - 6,5)				
	Rango	3 - 11	3 - 9		3 - 11	5 - 8		3 - 10	3 - 11	3 - 10				
PC *Cs* (mm)	Media ± DE	4,04 ± 2,49	3,09 ± 2,31	0,094	3,59 ± 2,46	4,18 ± 2,4	0,310	4,6 ± 2,59	2,77 ± 2,83	3,6 ± 2,3	0,207	0,285	0,845	0,671
	Mediana (RIQ)	4 (2,75 - 6)	3 (0 - 5)		4 (2 - 5)	5 (3 - 6)		4,5 (3 - 6)	3 (0 - 4,5)	4 (2 - 5)				
	Rango	0 - 10	0 - 8		0 - 10	0 - 7		0 - 10	0 - 9	0 - 9				
PC *Olea* (mm)	Media ± DE	7,38 ± 2,6	8,66 ± 3,63	0,172	7,8 ± 2,92	8,27 ± 4,1	0,958	7,73 ± 3,72	8,14 ± 3,76	7,71 ± 2,5	0,817	1	1	1
	Mediana (RIQ)	7 (5 - 9)	8 (6 - 10)		7,5 (6 - 9)	7 (5 - 11)		6 (6 - 8)	8 (4,75 - 9,25)	8 (6 - 9)				
	Rango	4 - 16	4 - 17		4 - 17	4 - 16		4 - 17	4 - 16	4 - 14				
PC *hist* (mm)	Media ± DE	6,88 ± 1,7	6,09 ± 1,35	0,042	6,5 ± 1,63	7,09 ± 1,51	0,231	5,8 ± 1,48	6,71 ± 1,94	6,58 ± 1,56	0,353	0,774	0,492	1
	Mediana (RIQ)	7 (6 - 8)	6 (5 - 7)		6 (5 - 7)	7 (6 - 9)		5,5 (4,75 - 7,25)	7 (5,5 - 8)	6 (5 - 7)				
	Rango	4 - 10	4 - 9		4 - 10	5 - 9		4 - 8	4 - 10	4 - 10				

a: años; Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; Ca: *C. arizonica*; Cs: *C. sempervirens*; DE: desviación estándar; PC: pruebas cutáneas; RIQ: rango intercuartílico.

No se observan diferencias en edad en función de asma y mes de presentación, aunque parece que los pacientes con clínica perenne son mayores (*p* 0,146).

Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas respecto a las PC, pero parece observarse una tendencia a que las PC tienen valores mayores con extractos de polen de *Ca* y *Cs* en pacientes con rinoconjuntivitis aislada, y con síntomas durante los meses de febrero y ambos meses febrero+mayo.

Sin embargo, los valores de las PC con extracto de polen de *Olea* son mayores en pacientes con asma y cuando los síntomas son en mayo y en ambos meses febrero+mayo.

Determinación de IgE específica (ImmunoCAP)

Tabla 17. Determinación de IgE específica *in vitro (Immuno*CAP*).*

		ASMA			ESTACIONALIDAD			MES				Comparaciones multiples MES p ajustando por corrección		
		No	Sí	*p*	Estacional	Perenne	*p*	Febrero	Mayo	Febrero + Mayo	*p*	F vs M	F vs F/M	M vs F/M
		53	32		74	11		11	14	49				
CAP *Ca* (kU/L)	Media ± DE	3,22 ± 4,1	4,21 ± 6,15	0,650	3,76 ± 5,02	1,45 ± 0,58	0,853	4,68 ± 5,17	1,11 ± 1,46	4,57 ± 5,76	0,223	0,200	1	0,638
	Mediana (RIQ)	1,34 (0,11 - 5,21)	1,58 (0,88 - 5,74)		1,34 (0,31 - 5,21)	1,45 (1,04 - 1,86)		3,28 (1,3 - 8,76)	0,56 (0 - 2,25)	1,64 (0,17 - 7,69)				
	Rango	0 - 13,7	0 - 18,9		0 - 18,9	1,04 - 1,86		1,3 - 13,7	0 - 3,79	0 - 18,9				
CAP *Cs* (kU/L)	Media ± DE	1,75 ± 2,28	1,79 ± 2,19	0,790	1,74 ± 2,21	1,88 ± 2,42	0,877	3,38 ± 3,12	1,41 ± 2,38	1,56 ± 1,96	0,089	0,215	0,145	1
	Mediana (RIQ)	0,92 (0 - 2,21)	0,88 (0,43 - 3,26)		0,9 (0 - 2,55)	0,88 (0,19 - 3,06)		2,54 (0,95 - 5,71)	0 (0 - 2,29)	0,76 (0 - 2,36)				
	Rango	0 - 8,85	0 - 8,26		0 - 8,85	0 - 7,36		0,67 - 8,85	0 - 7,19	0 - 8,26				
CAP *olea* (kU/L)	Media ± DE	13,65 ± 18,75	20,78 ± 32,17	0,785	16,92 ± 25,29	12,45 ± 21,13	0,573	5,65 ± 8,25	10,89 ± 18,9	21,17 ± 28,35	0,020	1	0,046	0,196
	Mediana (RIQ)	7,15 (1,15 - 17,8)	5,04 (1,47 - 27,95)		7,1 (1,48 - 18,58)	3,14 (1,13 - 14,7)		1,78 (0 - 10,7)	3,35 (0,79 - 12,06)	10,6 (3,02 - 24,25)				
	Rango	0 - 78,8	0,38 - 100		0 - 100	0,4 - 72,8		0 - 26,8	0 - 68,8	0 - 100				
IgE total (KU/L)	Media ± DE	158,07 ± 236,64	248,17 ± 398,95	0,376	194,43 ± 313,8	175,63 ± 286,13	0,556	150,17 ± 121,91	167,63 ± 224	211,46 ± 362,08	0,779	1	1	1
	Mediana (RIQ)	80 (40,7 - 139)	117 (36 - 308)		88,85 (40,33 - 173,5)	63,35 (37,43 - 164,75)		116,3 (69,7 - 211,5)	77,65 (35,73 - 268)	91,75 (37,28 - 140)				
	Rango	6,2 - 1060	19 - 2080		6,2 - 2080	19 - 955		23,4 - 439	7,59 - 858	6,2 - 2080				

a: años; Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; Ca: *C. arizonica*; CAP: InmunoCAP; Cs: *C. sempervirens;* DE: desviación estándar; PC: pruebas cutáneas; RIQ: rango intercuartílico.

No hay diferencias significativas en cuanto a la determinación de IgE específica mediante *Immuno*CAP, en función del asma y la estacionalidad, aunque los pacientes con rinoconjuntivitis exclusivamente tienen valores más elevados de CAP a extracto de *Olea*, mediana (RIQ) de 7,15 (1,15-17,8), frente a 5,04 (1,47-27,95) en los pacientes con asma. También los valores de CAP a extracto de *Olea* son más elevados en los pacientes con síntomas estacionales, mediana (RIQ) de 7,1 (1,48-18,58), frente a 3,14 (1,13-14,7) que presentan síntomas perennes. Sí encontramos diferencias significativas del valor del CAP a extracto de *Olea* cuando analizamos el mes de presentación de los síntomas, ya que es superior en los pacientes con síntomas durante los meses de febrero+mayo (*p* 0,02). Los valores del CAP a extractos de *Ca* y *Cs* son mayores en los pacientes con síntomas sólo en febrero, aunque sin significación estadística.

Tabla 18. Frecuencia de IgE específica *in vitro (InmunoCAP),* según clínica, estacionalidad y mes de presentación de los síntomas.

	ASMA			**ESTACIONALIDAD**			**MES**				**Comparaciones multiples MES** *p* ajustando por corrección Bonferroni		
	No	**Sí**	***p***	**Estacional**	**Perenne**	***p***	**Febrero**	**Mayo**	**Febrero +**	***p***	**F vs M**	**F vs F/M**	**M vs F/M**
	53	32		74	11		11	14	49				
CAP *Ca* >0,35kU/L	12 (70,6%)	9 (90%)	0,363	19 (76%)	2 (100%)	1	5 (100%)	4 (66,7%)	10 (71,4%)	0,553	1	1	1
CAP *Cs* >0,35kU/L	26 (63,4%)	18 (78,3%)	0,270	37 (67,3%)	7 (77,8%)	0,708	6 (100%)	4 (40%)	27 (69,2%)	0,049	0,102	0,513	0,423
CAP *Cupressus* >0,35kU/L	38 (71,7%)	27 (84,4%)	0,182	56 (75,7%)	9 (81,8%)	1	11 (100%)	8 (57,1%)	37 (75,5%)	0,039	0,060	0,297	0,591
CAP *Olea* >0,35kU/L	46 (86,8%)	32 (100%)	0,042	67 (90,5%)	11 (100%)	0,587	8 (72,7%)	12 (85,7%)	47 (95,9%)	0,030	1	0,117	0,633

Valor positivo si CAP >0,35 kU/L. Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; Ca: *C. arizonica*; CAP *Cupressus*: CAP Ca y/o Cs; Cs: *C. sempervirens*.

Se observa que todos los pacientes con asma de nuestra serie están sensibilizados a extracto de polen de olivo mediante *Inmuno*CAP (*p* 0,042). Todos los pacientes con síntomas perennes tienen resultados de CAP a extractos de *Ca* y *Olea* positivos, pero sin significación estadística.

Respecto al mes de presentación de los síntomas, encontramos diferencias estadísticamente significativas con el CAP a *Cupressus* (*p* 0,039), de tal forma que tienen resultado positivo todos los pacientes que tiene síntomas en febrero, frente al 57% de los pacientes que tienen síntomas en mayo, lo que se ha demostrado utilizando la corrección de Bonferroni para analizar las comparaciones múltiples o asociaciones 2 a 2.

La frecuencia de resultado de IgE específica mediante *Immuno*CAP a extracto de *Olea* es superior en los pacientes con síntomas en ambos meses febrero+mayo (95,9%) frente a los sujetos con síntomas en febrero (72,7%).

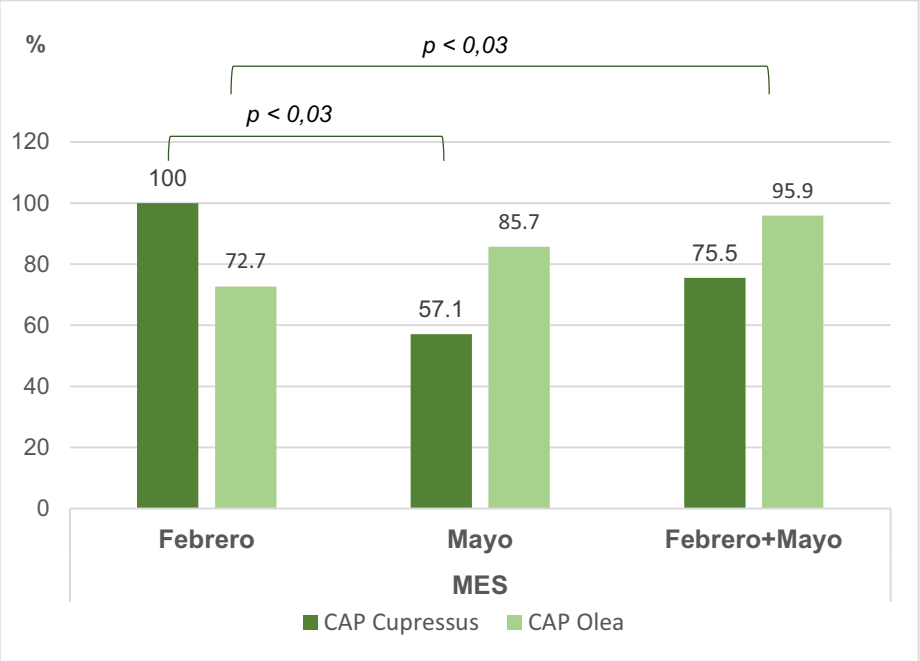

Figura 27. Porcentaje (%) de positividad a CAP (>0,35kU/L) en los pacientes con doble sensibilización en función del mes de presentación de los síntomas.

Determinación de IgE específica mediante ELISA

Tabla 19. Determinación de IgE específica *in vitro (ELISA)* con extracto de pólenes y alérgenos de olivo y ciprés, según asma y estacionalidad.

		ASMA			ESTACIONALIDAD		
		No	Sí	*p*	Estacional	Perenne	*p*
		49	28		67	10	
Ext *Olea*	Media ± DE	0,42 ± 0,4	0,55 ± 0,72	0,932	0,49 ± 0,55	0,33 ± 0,44	0,340
	Mediana (RIQ)	0,35 (0,06 - 0,64)	0,31 (0,06 - 0,72)		0,35 (0,07 - 0,64)	0,13 (0,05 - 0,47)	
	Rango	0 - 1,54	0 - 2,91		0 - 2,91	0,02 - 1,4	
Ext *Cupressus*	Media ± DE	0,08 ± 0,08	0,11 ± 0,09	0,226	0,08 ± 0,08	0,16 ± 0,09	0,010
	Mediana (RIQ)	0,05 (0,01 - 0,13)	0,11 (0,04 - 0,17)		0,05 (0 - 0,13)	0,13 (0,08 - 0,24)	
	Rango	0 - 0,3	0 - 0,3		0 - 0,29	0,05 - 0,3	
Ole e 1	Media ± DE	0,72 ± 0,7	0,88 ± 0,99	0,747	0,79 ± 0,81	0,68 ± 0,93	0,716
	Mediana (RIQ)	0,45 (0,09 - 1,31)	0,46 (0,11 - 1,19)		0,48 (0,09 - 1,3)	0,18 (0,11 - 1)	
	Rango	0 - 2,89	0,04 - 3,09		0 - 3,09	0,06 - 2,89	
Ole e 2	Media ± DE	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03	0,694	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,005
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,01)	0 (0 - 0,02)		0 (0 - 0,01)	0,02 (0 - 0,03)	
	Rango	0 - 0,08	0 - 0,11		0 - 0,11	0 - 0,07	
Ole e 3	Media ± DE	0,02 ± 0,08	0,02 ± 0,04	0,683	0,02 ± 0,08	0,02 ± 0,03	0,270
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,02)		0 (0 - 0,02)	0,02 (0 - 0,04)	
	Rango	0 - 0,58	0 - 0,19		0 - 0,58	0 - 0,08	
NtDOle e 9	Media ± DE	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,49	0,036	0,06 ± 0,32	0,02 ± 0,02	0,230
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0,04)		0 (0 - 0)	0 (0 - 0,04)	
	Rango	0 - 0,05	0 - 2,55		0 - 2,55	0 - 0,06	
CtDOle e 9	Media ± DE	0,05 ± 0,17	0,22 ± 0,54	0,137	0,12 ± 0,38	0,05 ± 0,03	0,066
	Mediana (RIQ)	0,02 (0 - 0,05)	0,03 (0 - 0,09)		0,01 (0 - 0,05)	0,04 (0,03 - 0,08)	
	Rango	0 - 1,17	0 - 2,4		0 - 2,4	0 - 0,1	
Ole e 11	Media ± DE	0,05 ± 0,06	0,07 ± 0,11	0,422	0,05 ± 0,08	0,11 ± 0,09	0,007
	Mediana (RIQ)	0,03 (0 - 0,08)	0,04 (0 - 0,1)		0,02 (0 - 0,07)	0,09 (0,04 - 0,17)	
	Rango	0 - 0,24	0 - 0,48		0 - 0,48	0 - 0,31	
Ole e 12	Media ± DE	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,06	0,351	0,02 ± 0,03	0,07 ± 0,08	0,017
	Mediana (RIQ)	0,02 (0 - 0,04)	0,03 (0 - 0,04)		0,02 (0 - 0,04)	0,04 (0,03 - 0,08)	
	Rango	0 - 0,19	0 - 0,29		0 - 0,19	0 - 0,29	
Cup s 1	Media ± DE	0,31 ± 0,43	0,35 ± 0,5	0,715	0,33 ± 0,45	0,32 ± 0,47	0,677
	Mediana (RIQ)	0,19 (0,04 - 0,39)	0,15 (0,07 - 0,38)		0,17 (0,05 - 0,4)	0,13 (0,03 - 0,45)	
	Rango	0 - 1,97	0 - 1,74		0 - 1,97	0 - 1,49	

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥0,10. Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; DE: desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico.

Tabla 20. Determinación de IgE específica *in vitro (ELISA)* con extracto de pólenes y alérgenos de olivo y ciprés, según mes de presentación de los síntomas.

		MES				Comparaciones multiples MES *p* ajustando por corrección		
		Febrero	Mayo	Febrero + Mayo	*p*	F vs M	F vs F/M	M vs F/M
		11	11	45				
Ext *Olea*	Media ± DE	0,28 ± 0,46	0,33 ± 0,42	0,57 ± 0,59	0,056	1	0,106	0,373
	Mediana (RIQ)	0,07 (0,04 - 0,44)	0,19 (0,05 - 0,38)	0,46 (0,13 - 0,71)				
	Rango	0 - 1,54	0 - 1,41	0 - 2,91				
Ext *Cupressus*	Media ± DE	0,09 ± 0,08	0,06 ± 0,09	0,09 ± 0,08	0,369	1	1	0,461
	Mediana (RIQ)	0,06 (0 - 0,16)	0 (0 - 0,11)	0,06 (0,03 - 0,15)				
	Rango	0 - 0,25	0 - 0,28	0 - 0,29				
Ole e 1	Media ± DE	0,3 ± 0,41	0,53 ± 0,62	0,98 ± 0,86	0,008	0,365	0,217	1
	Mediana (RIQ)	0,09 (0,05 - 0,53)	0,37 (0,02 - 1,2)	0,64 (0,31 - 1,46)				
	Rango	0 - 1,32	0 - 1,71	0,02 - 3,09				
Ole e 2	Media ± DE	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,800	0,504	1	0,691
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,02)	0 (0 - 0,01)				
	Rango	0 - 0,03	0 - 0,08	0 - 0,11				
Ole e 3	Media ± DE	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,18	0,02 ± 0,03	0,470	0,120	0,348	0,779
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,01)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0,03)				
	Rango	0 - 0,02	0 - 0,58	0 - 0,19				
NtDOle e 9	Media ± DE	0,02 ± 0,03	0 ± 0,01	0,08 ± 0,39	0,149	0,601	1	0,642
	Mediana (RIQ)	0 (0 - 0,04)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)				
	Rango	0 - 0,08	0 - 0,03	0 - 2,55				
CtDOle e 9	Media ± DE	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,17 ± 0,46	0,401	1	0,014	0,209
	Mediana	0,02	0	0,02				
	Rango	0 - 0,08	0 - 0,1	0 - 2,4				
Ole e 11	Media ± DE	0,07 ± 0,07	0,02 ± 0,03	0,05 ± 0,09	0,100	1	1	1
	Mediana (RIQ)	0,05 (0 - 0,11)	0 (0 - 0,03)	0,03 (0 - 0,07)				
	Rango	0 - 0,23	0 - 0,07	0 - 0,48				
Ole e 12	Media ± DE	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,385	1	1	0,817
	Mediana (RIQ)	0,02 (0 - 0,03)	0 (0 - 0,03)	0,02 (0 - 0,04)				
	Rango	0 - 0,06	0 - 0,04	0 - 0,19				
Cup s 1	Media ± DE	0,31 ± 0,21	0,13 ± 0,16	0,38 ± 0,53	0,128	0,099	1	0,403
	Mediana (RIQ)	0,25 (0,19 - 0,4)	0,05 (0,04 - 0,23)	0,14 (0,08 - 0,43)				
	Rango	0,02 - 0,71	0 - 0,5	0 - 1,97				

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥ 0,10. F: febrero; F/M: febrero+mayo; DE: desviación estándar; M: mayo; RIQ: rango intercuartílico.

Tabla 21. Frecuencia de positividades de IgE específica *in vitro (ELISA) frente a* extracto de polen de *Olea, Cupressus* y alérgenos de olivo y ciprés, según asma y estacionalidad.

	ASMA			ESTACIONALIDAD		
	No	Sí	*p*	Estacional	Perenne	*p*
	49	28		67	10	
Ext *Olea*	35 (71,4%)	19 (67,9%)	0,742	48 (71,6%)	6 (60%)	0,474
Ext *Cupressus*	18 (36,7%)	15 (53,6%)	0,151	26 (38,8%)	7 (70%)	0,089
Ole e 1	36 (73,5%)	21 (75%)	0,883	49 (73,1%)	8 (80%)	1
Ole e 2		1 (3,6%)	0,364	1 (1,5%)		1
Ole e 3	1 (2%)	1 (3,6%)	1	2 (3%)		1
NtDOle e 9		3 (10,7%)	0,045	3 (4,5%)		1
CtDOle e 9	3 (6,1%)	5 (17,9%)	0,131	7 (10,4%)	1 (10%)	1
Ole e 9	3 (6,1%)	6 (21,4%)	0,065	8 (11,9%)	1 (10%)	1
Ole e 11	9 (18,4%)	6 (21,4%)	0,744	10 (14,9%)	5 (50%)	0,020
Olee 12	1 (2%)	2 (7,1%)	0,550	1 (1,5%)	2 (20%)	0,043
Ole e	39 (79,6%)	22 (78,6%)	0,915	51 (76,1%)	10 (100%)	0,110
Ole e menor	11 (22,4%)	12 (42,9%)	0,060	17 (25,4%)	6 (60%)	0,057
Cup s 1	29 (59,2%)	17 (60,7%)	1	41 (61,2%)	5 (50%)	0,512

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥ 0,10 DO. Asma No: rinoconjuntivitis aislada; Asma Si: asma con/sin rinoconjuntivitis; Ext: extracto; Ole e: cualquier alérgeno de polen de olivo; Ole e menor: cualquier alérgeno minoritario.

Tabla 22. Frecuencia de positividades de IgE específica *in vitro (ELISA) frente a* extracto de polen de *Olea, Cupressus* y alérgenos de olivo y ciprés, según mes de presentación de los síntomas.

	MES				Comparaciones multiples MES *p* ajustando por corrección de		
	Febrero	Mayo	Febrero+Mayo	*p*	F vs M	F vs F/M	M vs F/M
	11	11	45				
Ext *Olea*	4 (36,4%)	7 (63,6%)	37 (82,2%)	0,008	0,603	0,015	0,672
Ext *Cupressus*	4 (36,4%)	4 (36,4%)	18 (40%)	1	1	1	1
Ole e 1	5 (45,5%)	7 (63,6%)	37 (82,2%)	0,027	1	0,060	0,672
Ole e 2			1 (2,2%)	1		1	1
Ole e 3		1 (9,1%)	1 (2,2%)	0,552	1	1	1
NtDOle e 9			3 (6,7%)	1		1	1
CtDOle e 9			7 (15,6%)	0,262	1	0,972	0,972
Ole e 9			8 (17,8%)	0,180		0,999	0,999
Ole e 11	4 (36,4%)		6 (13,3%)	0,044	0,270	0,27	1
Olee 12			1 (2,2%)	1		1	1
Ole e	7 (63,6%)	7 (63,6%)	37 (82,2%)	0,255	1	0,672	0,672
Ole e menor	4 (36,4%)	1 (9,1%)	12 (26,7%)	0,407	0,933	1	1
Cup s 1	9 (81,8%)	4 (36,4%)	28 (62,2%)	0,107	0,240	0,687	0,528

Los valores de ELISA vienen dados en Unidades de Densidad óptica (DO). Positivo si ≥0,10 DO. Ext: extracto; F: febrero; F/M: febrero+mayo; M: mayo; Ole e: cualquier alérgeno de polen de olivo; Ole e menor: cualquier alérgeno minoritario.

No hay diferencias estadísticamente significativas en los valores de IgE específica mediante ELISA cuando comparamos los síntomas de los pacientes, excepto con NtD-Ole e 9, que toma valores más altos en los casos con asma (*p* 0,036) (Tabla 19). Ningún paciente con rinoconjuntivitis aislada está sensibilizado a NtD-Ole e 9, frente a un 10,7% de positividades en los pacientes con asma (con/sin rinoconjuntivitis) (*p* 0,045) (Tabla 21).

No hay diferencias en los valores encontrados de IgE específica mediante ELISA en cuanto a la estacionalidad, excepto cuando analizamos el extracto de *Cupressus* que obtenemos valores más en pacientes con síntomas perennes (*p* 0,01), (Tabla 19). Si analizamos las frecuencias, en cuanto a la estacionalidad no encontramos diferencias estadísticamente significativas salvo con Ole e 11 (*p* 0,02) y Ole e 12 (*p* 0,043). El 50% y el 20% de los pacientes que tienen clínica perenne están sensibilizados a Ole e 11 y Ole e 12, respectivamente, frente al 14,9% y el 1,5% de los pacientes con síntomas estacionales (Tabla 21).

En la Tabla 22, se observa que 82,2% de los pacientes que tienen síntomas en ambos meses febrero+mayo están sensibilizados a Ole e 1 (*p* 0,027), 62,2% están sensibilizados a Cup s 1, 17,8 % a Ole e 9 y 13,3% a Ole e 11. La sensibilización a Ole e 9 sólo se da en los pacientes con síntomas en febrero y mayo, y parece estar relacionada con el CtD-Ole e 9. El 81,8% de los pacientes que tienen síntomas en febrero están sensibilizados a Cup s 1, el 45,5% a Ole e1 y el 36,4% a Ole e 11. Estos datos se resumen en la Fig. 28.

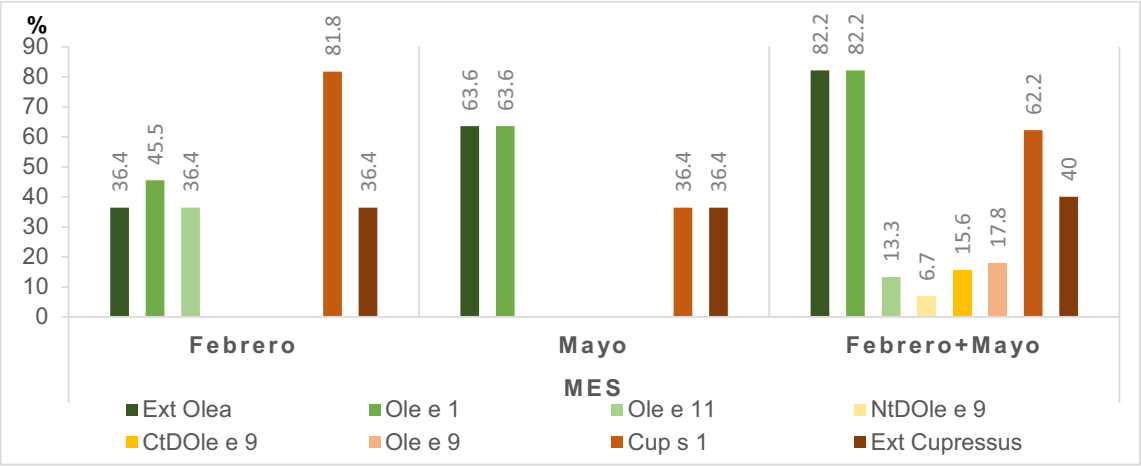

Figura 28. Porcentaje de sensibilización a extractos y alérgenos según el mes de presentación. Ext: extracto.

Combinaciones de sensibilizaciones de alérgenos purificados en pacientes con doble sensibilización

Tabla 23. Combinaciones de sensibilizaciones a alérgenos purificados.

Cups_1	Olee_1	Olee_2	Olee_3	NtOlee9	CtOlee9	Olee_11	Olee_12	N	%
+	+	-	-	-	-	-	-	21	27,3%
-	+	-	-	-	-	-	-	17	22,1%
+	-	-	-	-	-	-	-	9	11,7%
-	-	-	-	-	-	-	-	7	9,1%
+	+	-	-	-	+	-	-	4	5,2%
+	-	-	-	-	-	+	-	3	3,9%
+	+	-	-	-	-	+	-	3	3,9%
-	+	-	-	-	-	+	-	2	2,6%
+	+	-	-	-	+	+	-	2	2,6%
-	+	-	+	-	-	-	-	1	1,3%
+	+	-	-	-	-	-	+	1	1,3%
-	-	-	-	-	-	+	-	1	1,3%
+	+	+	-	-	-	+	-	1	1,3%
-	+	-	-	-	-	+	+	1	1,3%
+	+	-	-	-	-	+	+	1	1,3%
-	+	-	-	+	+	-	-	1	1,3%
-	+	-	-	+	-	-	-	1	1,3%
+	+	-	+	+	+	+	-	1	1,3%
							Total	**77**	**100%**

En la tabla 23 se reflejan los 77 pacientes con doble sensibilización estudiados en los que se ha realizado determinaciones de IgE específica a los alérgenos y observamos las 18 diferentes combinaciones de alérgenos recombinantes a los que los pacientes están sensibilizados; hay que comentar que la sensibilización más frecuente es para la combinación de alérgenos mayores Cup s 1 y Ole e 1 (27,3%), seguida de la sensibilización única a Ole e 1 (22,1%) y a Cup s 1 (11,7%). Hasta un 9,1% de los pacientes no están sensibilizados a ninguno de los alérgenos recombinantes testados. Hay un único paciente que está sensibilizado a Ole e 11 exclusivamente.

4.4 ESTUDIOS DE INMUNODETECCIÓN

4.4.1 Población estudiada

Para poder comparar el perfil alergénico de todos los pacientes incluidos en el estudio se llevaron a cabo inmunodetecciones con todos los pacientes. Se han restringido experimentos posteriores a aquellos sueros más representativos de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, atendiendo a la clasificación en los grupos G1, G2, G3 y G4 (según positividad o no de los alérgenos principales de polen de ciprés, Cup s 1 y polen de olivo, Ole e 1).

Pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo

Se presentan las inmunodetecciones de los 77 sueros de pacientes alérgicos a pólenes de ciprés y olivo en extracto de polen de *Olea europaea* (Figura 29).

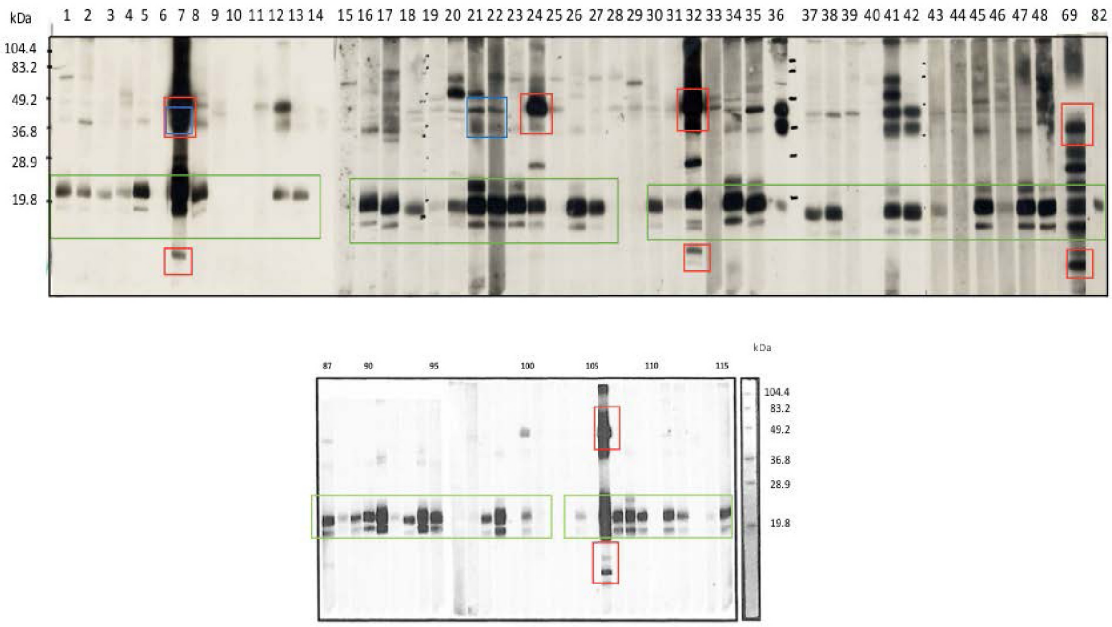

Figura 29. Inmunodetección de sueros de pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo en extracto de polen de *Olea europaea.* Rectángulo verde: Ole e1; Rectángulo rojo: Ole e 9, Rectángulo azul: Ole e 11.

En las inmunodetecciones en extracto de polen de *Olea*, se reconocen gran número de bandas, pero la mayoría de los sueros de pacientes con doble sensibilización reconocen una doble banda con masa molecular (Mm) de 20 kDa que corresponde al alérgeno principal Ole e 1, y también bandas de masas moleculares más elevadas (37-50 kDa) que pudieran corresponder a Ole e 9 y Ole e 11 o alérgenos no identificados todavía. Se observan bandas de Mm que pudieran corresponder a Ole e 10 (11 kDa).

A continuación, se presentan las inmunodetecciones de los 77 sueros de pacientes alérgicos a pólenes de ciprés y olivo en extracto de polen de *Cupressus arizonica* (Figura 30).

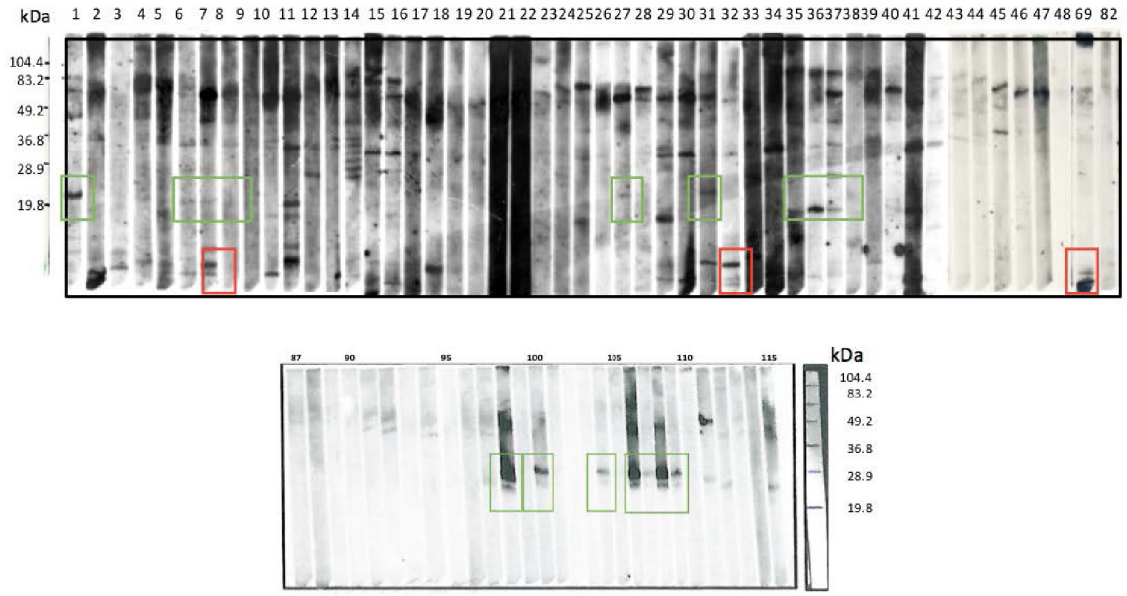

Figura 30. Inmunodetección de sueros de cipres+olivo en extracto de polen de *Cupressus* arizonica (1ª imagen: sueros 1:10; 2ª imagen: sueros 1:5). Rectángulo verde: Ole e1; Rectángulo rojo: Ole e 9.

En las inmunodetecciones en extracto de polen de *Cupressus arizonica* se reconocen en la mayor parte de los sueros bandas de alta masa molecular (36-60 kDa) entre las que se encuentran el alérgeno principal Cup s 1, si bien también existen bandas alrededor de 20 kDa, como en los sueros (nº 1, 6, 7, 8, 27, 31, 35,

36, 37) y bandas de baja masa molecular de aproximadamente 10 kDa (como el suero 7, 32, 69). Las bandas se reconocen con mayor dificultad que con el extracto de polen de *Olea europaea* y ésto es debido a la dificultad de conseguir buenos extractos de *Cupressus*, por su escaso contenido proteico y gran contenido en azúcares. En algunos sueros donde las señales eran bajas para diluciones 1:10, se utilizaron diluciones 1:5 (2ª imagen de figura 30). En esta 2ª imagen en el extracto de *C. arizonica* se observan mejor las bandas de 20 kDa en algunos sueros (nº 98, 100, 104, 106, 107, 108, 109), que pudieran corresponder a la existencia de un alérgeno homólogo de Ole e 1 en el polen de *Cupressus*, que hasta la fecha no se ha identificado. También se observan bandas de masas moleculares altas.

Inmunodetecciones en pacientes monosensibilizados a polen de olivo y monosensibilzados a polen de ciprés

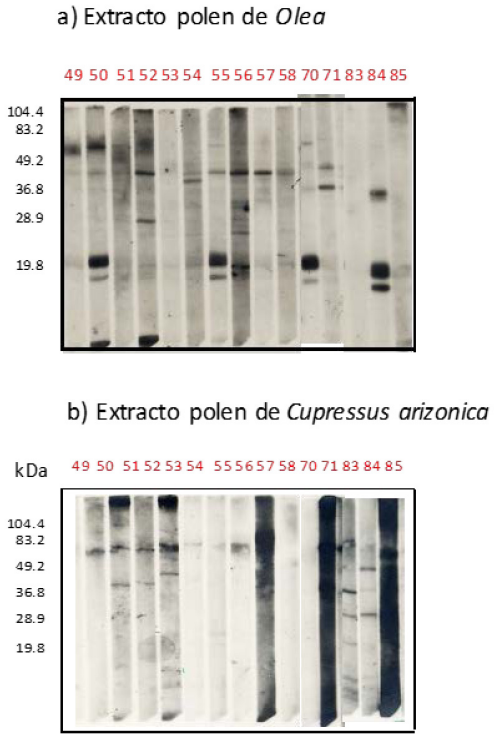

Figura 31. Inmunodetección con sueros monosensibilizados a polen de olivo en a) extracto de polen de *Olea europaea* y b) extracto de polen de *Cupressus arizonica.*

Se observan (Figura 31) en el las inmunodetecciones de los pacientes monosensibilizados al polen de olivo en extracto de *Olea* (a) el alergograma de los diferentes alérgenos del olivo, en especial el Ole e 1 y otras bandas de Mm más elevadas (39-46 kDa). En el extracto de *C. arizonica* (b), observamos en los sueros de pacientes monosensibilizados a polen de olivo, bandas de Mm elevadas, que pudieran corresponder a existencia de homólogos de alérgenos de olivo en el polen de ciprés.

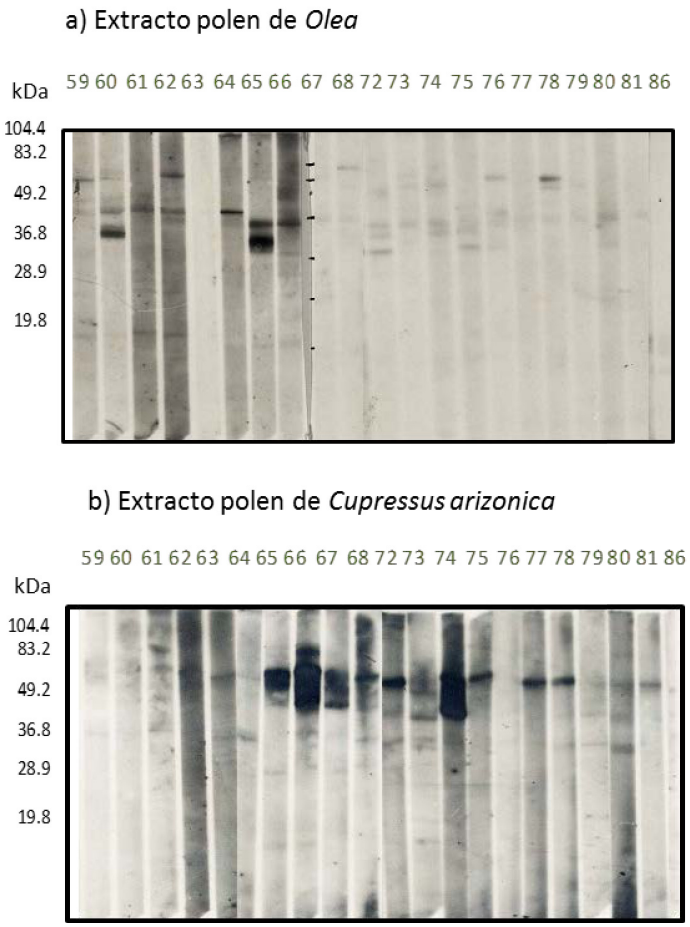

Figura 32. Inmunodetección con sueros monosensibilizados a polen de ciprés en a) extracto de polen de *Olea europaea* y b) extracto de polen de *Cupressus arizonica*.

En las inmunodetecciones realizadas en sueros de pacientes monosensibilizados a polen de ciprés, se observan bandas de Mm elevadas en varios sueros, con extracto de *Olea europaea* (los pacientes alérgicos al polen de ciprés reconocen alérgenos de Mm como Ole e 9 y Ole e 11, como se demuestra en ELISA). Y cuando analizamos el extracto de Cupressus Arizona, en estos pacientes observamos bandas que pudieran corresponder a Cup s 1 y a otros alérgenos no identificados.

4.4.2 Inmunodetección de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo

Se clasifican en los subgrupos G1, G2, G3 y G4. según positividad o no de los alérgenos mayores Cup s1/Ole e 1: Se observa una gran heterogeneidad de patrones.

- Grupo 1: Cup s 1+/ Ole e 1+ (con reconocimiento de ambos alérgenos principales: n= 34 (44,2%)
    - Grupo 1a: pacientes sólo Cup s 1+/Ole e 1+ reconocidos por ELISA: 4, 5, 8, 16, 19, 22, 23, 27, 31, 35, 37, 42, 45, 46, 87, 88, 104, 108, 109, 111, 115.
    - Grupo 1b: pacientes con Cup s 1 +/Ole e 1+, más otros alérgenos reconocidos por ELISA:
        - 24, 30, 32, 69 (CtD-Ole e 9)
        - 17,41, 48 (Ole e 11)
        - 12, 21 (CtD-Ole e 9, Ole e 11)
        - 47 (Ole e 11, Ole e 12)
        - 34 (Ole e 2, Ole e 11)
        - 2 (Ole e 12)
        - 7 (Ole e 3, CtD-Ole e 9, NtD-Ole e 9, Ole e 11)

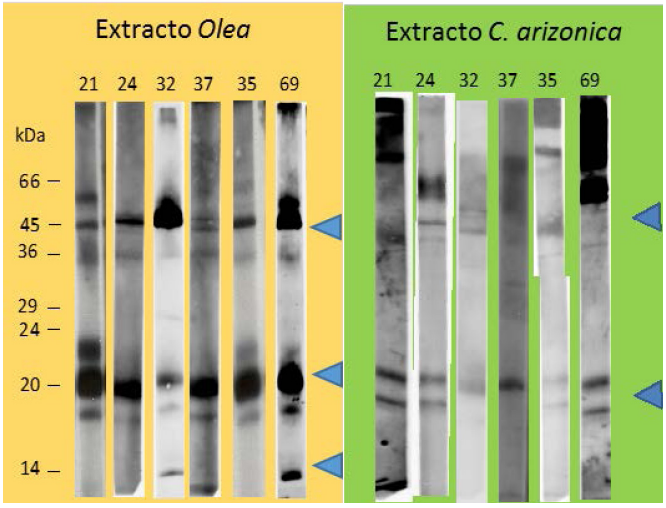

Figura 33. Inmunodetección de algunos sueros de grupo G1 (dilución 1:5) en extracto de *Olea* y en extracto de *C. arizonica.*

En la inmunodetección en extracto de *Olea* de los sueros seleccionados del grupo 1 (en ambos subgrupos), se observan bandas a la altura de 20 kDa (correspondiente a Ole e 1) y una banda de 45 kDa (correspondiente a Ole e 9). En los sueros 32 y 69 se observa una banda por debajo de 14 kDa que pudiera corresponder al homólogo de CtD Ole e 9. Y en la inmunodetección en extracto de *Cupressus arizonica* de los mismos sueros se observan dos bandas a la misma altura de 20 kDa, que podrían corresponder a un patrón similar al que se ve con Ole e 1 en el polen de *Olea*. También se observan en los mismos sueros, bandas de masas moleculares altas, alguna de ellas a la altura de 45 kDa.

- Grupo 2: Cup s 1+/ Ole e 1-: n=12 (15,6%) (pacientes con reconocimiento de Cup s 1)
    - Pacientes con sólo sensibilización a Cup s 1 (11, 14, 15, 39, 40, 43, 44, 105, 110) o a algún alérgeno no identificado
    - Pacientes con sensibilización además a Ole e 11 (25, 29, 33).

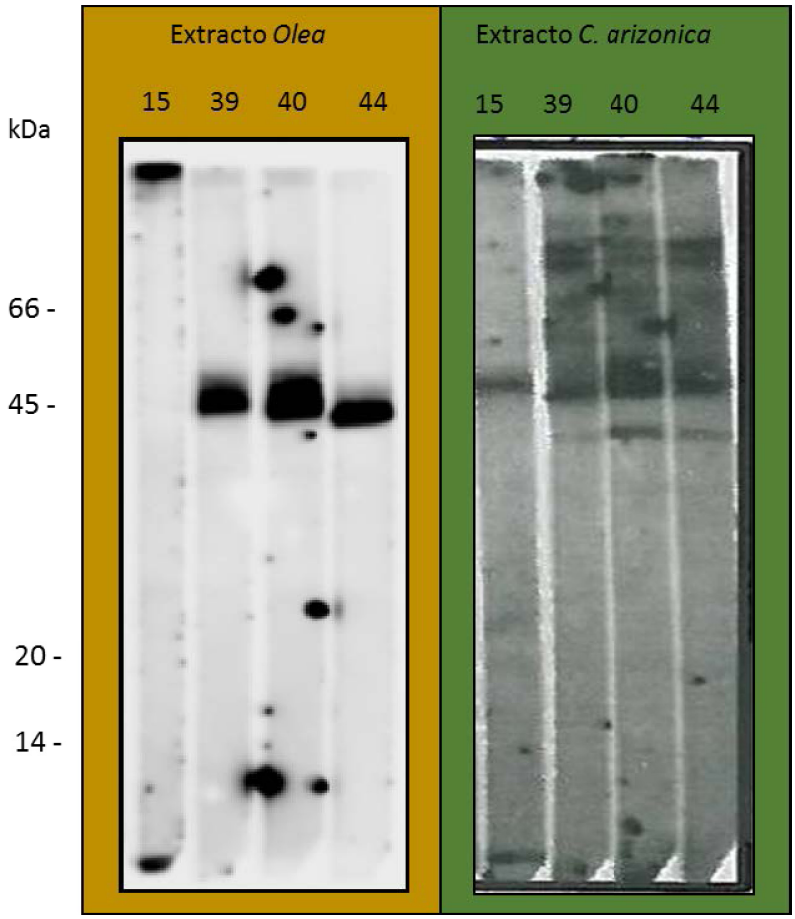

Figura 34. Inmunodetección de algunos sueros de grupo G2 (dilución 1:5) en extractos de *Olea* y *Cupressus arizonica.*

Los sueros seleccionados (15, 39, 40, y 44), sólo reconocen Cup s 1 por ELISA. En la inmunodetección no se observa bandas correspondientes a Ole e 1 en ninguno de los 2 extractos. Sin embargo, se observan bandas de aproximadamente 43-45 kDa, que pudieran corresponder a Cup s 1 u otro alérgeno no identificado.

Este grupo de pacientes no se ha sensibilizado a polen de olivo a través de Ole e 1, por lo que se podría pensar que lo han hecho a través de reactividad cruzada frente a alérgenos del polen de ciprés.

- **<u>Grupo 3</u>: Cup s 1-/ Ole e 1+: n=23 (29,9%) (pacientes con reconocimiento de Ole e 1, con o sin otros alérgenos de polen de olivo):**
    - 1, 3, 6, 20, 38, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 100, 107, 112 (exclusivamente Ole e 1)
    - 9, 82 (Ole e 11)
    - 13 (Ole e 11, Ole e 12)
    - 18 (NtD-Ole e 9)
    - 26 (Ole e 3)
    - 106 (CtD-Ole e 9, NtD-Ole e 9)

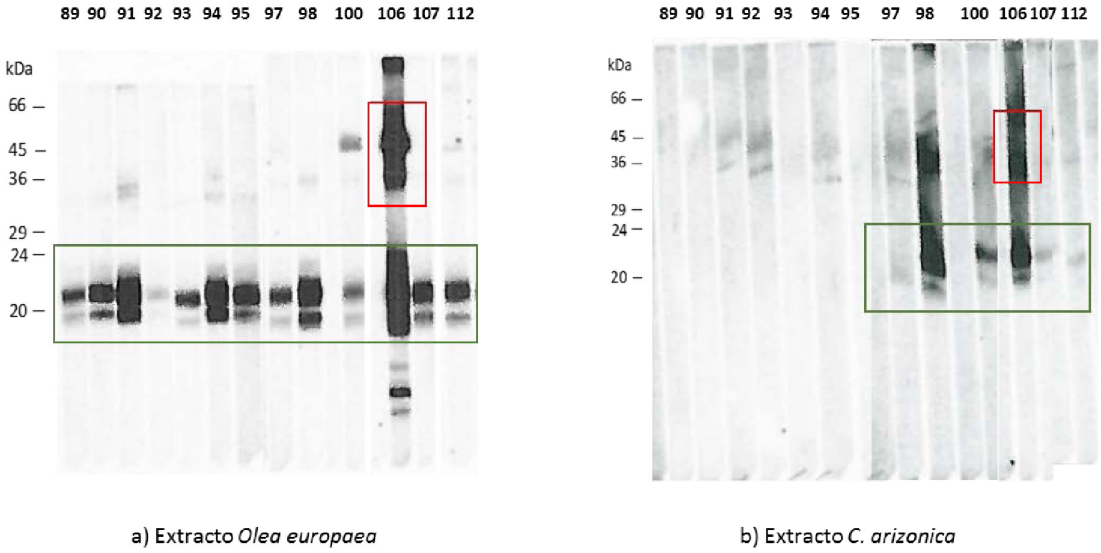

Figura 35. Inmunodetección de algunos sueros de grupo G3 (dilución 1:5) en extractos de *Olea europaea* y *Cupressus arizonica*. Rectángulo verde: Ole e1; Rectángulo rojo: Ole e 9.

Se observan en las inmunodetecciones de extracto de *Olea* las bandas correspondientes a Ole e 1 (20 kDa) y en las inmunodetecciones de extracto de *C. arizonica*, dos bandas que podrían corresponder a un patrón similar al que se ve con Ole e 1.

En este grupo de pacientes que son positivos a Ole e 1 y negativos a Cup s 1, cabe pensar que los pacientes se han sensibilizado a polen de ciprés a través de

algún alérgeno homólogo en olivo que podría ser Ole e 1, aunque no se puede descartar que no sea a través de algún otro alérgeno, posiblemente Ole e 9 u Ole e 11.

- Grupo 4: Cup s-/ Ole e 1-: n=8 (10,4%) (no reconocen ninguno de los alérgenos principales)
    - 10 (Ole e 11)
    - 28, 96, 99, 101, 102, 103, 114 (ningún alérgeno de olivo, identificado hasta la fecha).

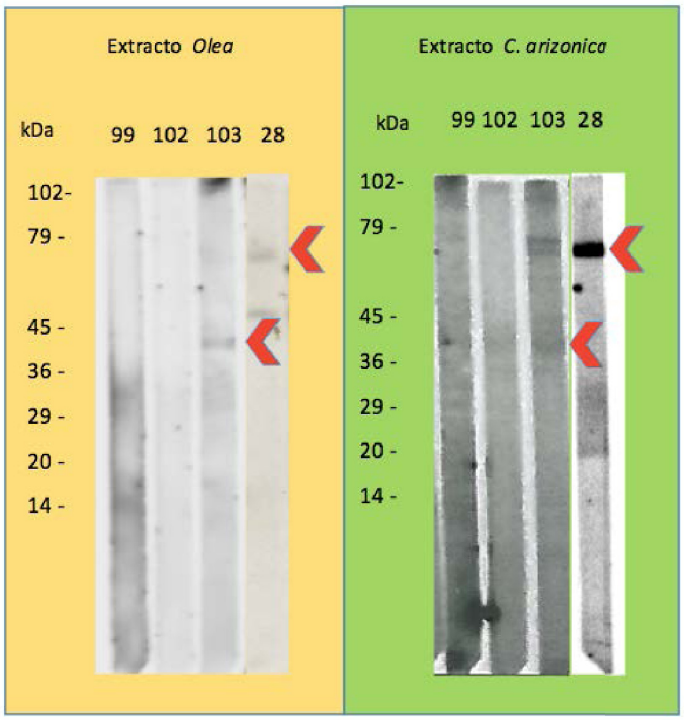

Figura 36. Inmunodetección de algunos sueros de grupo G4 en extracto de Olea y en extracto de *C. arizonica.*

En los sueros de este grupo hay muy poca señal, tanto en la inmunodetección en extracto de *Olea* como de *C arizonica*. La sensibilización podría deberse a través de algún alérgeno no identificado como principal. No puede ser ningún alérgeno

de otra especie porque los pacientes de nuestro estudio no tienen otra sensibilización.

Se observan en los sueros 103 y 28, bandas de altas Mm, por lo se supone que son alérgenos no identificados responsables de la reactividad cruzada, aunque no presentan reconocimiento por ELISA de ningún alérgeno de olivo ni ciprés.

4.4.3 Identificación de alérgenos en extracto de *Cupressus arizonica* con diferentes policlonales frente a alérgenos de polen de olivo

Se ha llevado a cabo la inmunodetección con los anticuerpos policlonales específicos de alérgenos de polen de olivo sobre extracto de polen de *Cupressus arizonica* con el fin de poder comprobar si existen alérgenos homólogos a los identificados en polen de olivo en el polen de ciprés. Los anticuerpos policlonales utilizados han sido pAb anti-Ole e 1, pAb anti-Ole e 7, pAb anti-rNtD-Ole e 9, pAb anti-rCtD-Ole e 9, pAb anti-Ole e 10 y pAb anti-Ole e 11.

Los anticuerpos policlonales específicos han reconocido bandas proteicas correspondientes al tamaño observado para Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11, por lo que podríamos hablar de la existencia de homólogos de Ole e 1, CtD-Ole e 9, Ole e 10 y Ole e 11 en el extracto de polen de *Cupressus arizonica*. Con el pAb anti-rNtD-Ole e 9, anti-Ole e 7 no hubo reconocimiento en el extracto de polen de *C. arizonica* en las condiciones empleadas.

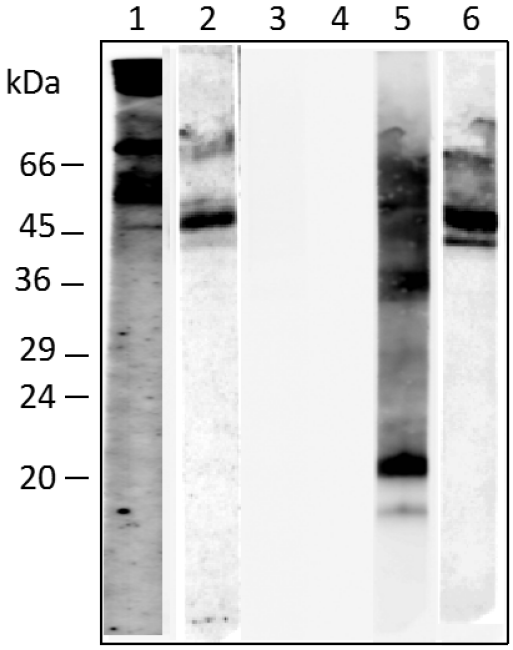

Figura 37. Inmunodetección de alérgenos homólogos a Ole e 1, Ole e 9, Ole e 10, y Ole e 11 en polen de *Cupressus arizonica*. **1**: tinción con pAb anti-rNtD-Ole e 11 (1:1000); **2**: tinción con pAb anti-rCtD-Ole e 9 (1:5000); **3**: tinción con pAb anti-rNtD-Ole e 9 (1:10000); **4**: tinción con pAb anti-Ole e 7 (1:10000); **5**: tinción con pAb anti-nOle e 1 (1:10000); **6**: tinción con pAb anti-Ole e 10 (1:5000).

Se analizó el efecto inducido por agentes reductores en la movilidad electroforética en PAGE-SDS de alérgenos purificados Ole e 1 y Ole e 9.

El tratamiento con βME produjo una disminución de la movilidad electroforética. Se observa que reconoce mejor el dímero que el monómero de Ole e 1 e incluso mejor la forma glicosilada que la no glicosilada (1-2) y se observa una disminución en la unión de IgEs en los rCtDs (3-4). La pérdida de reconocimiento por IgE estaría indicando un cambio en la estructura terciaria -y por tanto de epítopos conformacionales- debido a la acción del agente reductor que actuaría sobre los puentes disulfuro. En los sueros casi no hay cambios de señal (5-6, 7-8).

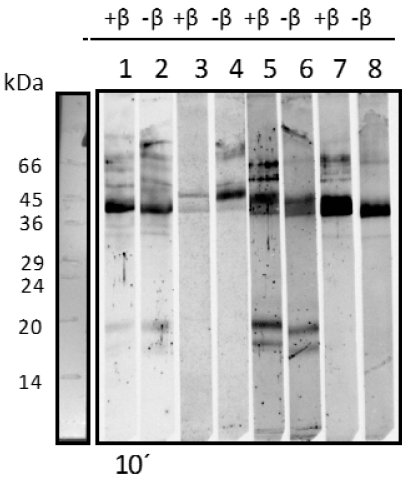

Figura 38. Análisis en PAGE-SDS en presencia o ausencia de β-ME. **1–2**: p-α Ole e 1 (1:10000); **3–4**: p-α r–CtD-Ole e9 (1:5000); **5–6**: suero 24 (1:5); **7–8**: suero 7 (1:5); Muestras en presencia (+) o ausencia (-) de β-ME.

4.4.4 Estudios de inhibición de la inmunodetección de extractos de *Olea europaea* y *Cupressus arizonica* en pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo

Extracto de polen de Olea inhibido por extracto de polen de C. arizonica

Para estudiar la potencial reactividad cruzada entre el polen de ciprés y olivo, se han llevado a cabo estudios de inhibición de la inmunodetección de extracto de polen de olivo con extracto de polen *C. arizonica*, en los diferentes grupos.

- Grupo 1a (Sólo sensibilizados a Cup s 1 y Ole e 1)

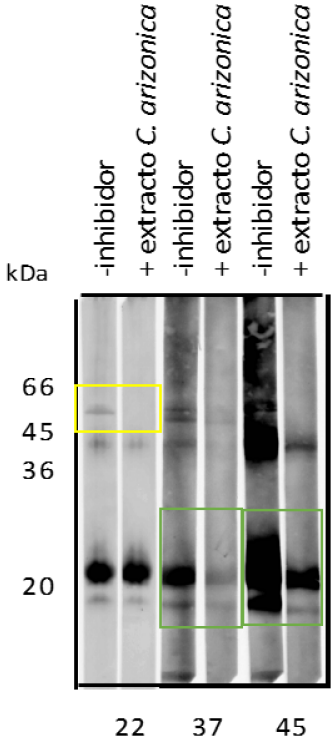

Figura 39. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 1a (22, 37, 45) en polen de Olea (80 µg/ tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (500 µg). Rectángulo verde: Ole e 1; Rectángulo amarillo: alérgeno desconocido.

Se observa como hay una pérdida de señal a nivel de 20 kDa, en los sueros 37 y 45, que significa que en el polen de *C. arizonica* puede haber un Ole e 1 like, aparte de Cup s 1. También observamos la desaparición de bandas de 45 kDa en pacientes 37, 45. La banda de 45 kDa puede corresponder al dímero de Ole e 1.

En el suero 22, no hay pérdida de señal a nivel de 20 kDa. Se observa pérdida de señal a nivel de 55 kDa, por lo que sería un alérgeno no identificado.

- Grupo 1b (Sensibilizados a Cup s 1 y Ole e 1 y, otros alérgenos, en especial CtD-Ole e 9, Ole e 11)

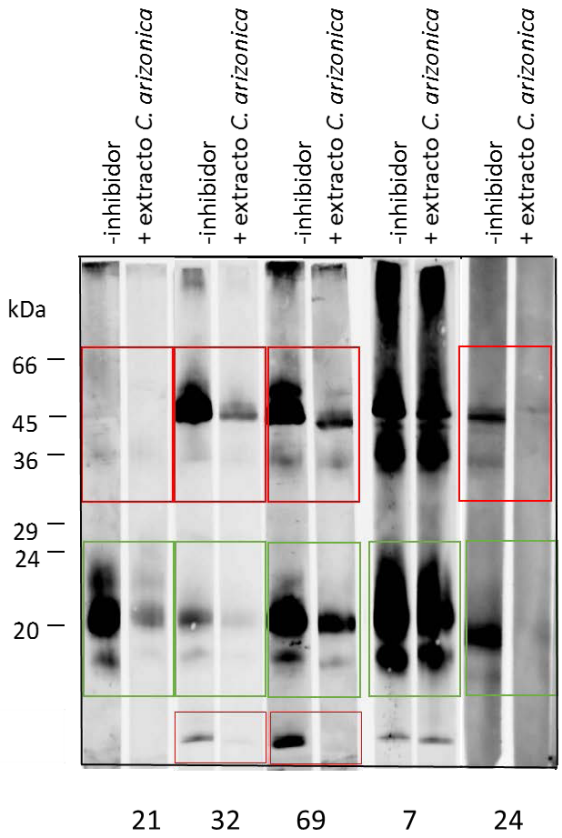

Figura 40. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 1b (21, 32, 69, 7, 24) en polen de Olea (20 µg/ tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (500 µg/tira). Rectángulo verde: Ole e 1; Rectángulo rojo: Ole e 9.

Se observan que las bandas de 20 kDa desaparecen en los pacientes testados del grupo 1b (sueros 21, 32, 69, 7, 24). Así mismo, las bandas de 45 kDa también desaparecen en los pacientes del grupo 1b (sueros 32, 69, 24) aunque menos evidente en paciente 21. Se observa también atenuación en los sueros 32 y 69 de bandas a niveles de Mm bajas que corresponderían al homólogo de Ct-DOle e 9, Ole e 10.

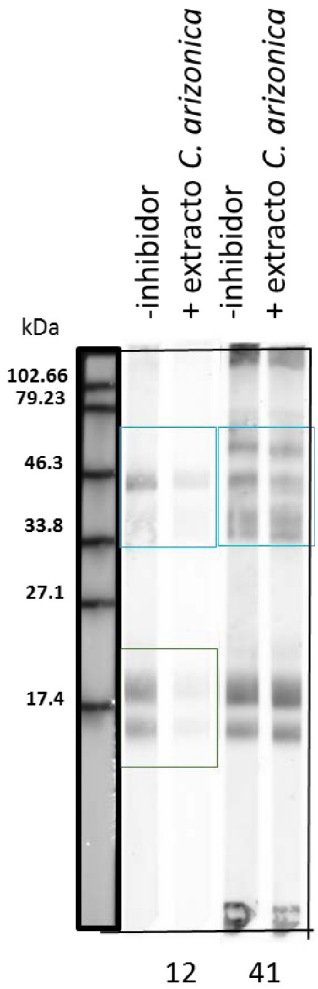

Figura 41. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 1b (12, 41) en polen de Olea (40 µgr/tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (250 µgr/tira). Rectángulo verde: Ole e 1; Rectángulo azul: Ole e 11.

En los sueros que reconocen Ole e 11 por ELISA (12, 41) se observa atenuación de las bandas a la altura que pudiera corresponder con Ole e 11.

En el suero 12 (suero que reconoce Ole e 1, se observa también una pérdida de las bandas a la altura de Ole e 1.

- Grupo 2 (Sensibilizados a Cup s 1 (Ole e 1-) con/ sin otros alérgenos, en especial CtDOle e 9, Ole e 11)
    - Pacientes con sólo sensibilización a Cup s 1 (11, 14, 15, 39, 40, 43, 44, 105, 110) o algún alérgeno no identificado
    - Pacientes con sensibilización además a Ole e 11 (25, 29, 33)

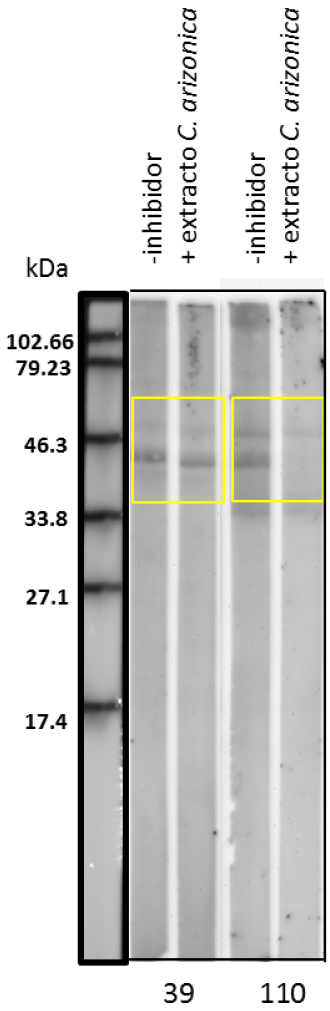

Figura 42. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 2 (sólo Cup s 1) (39,110) en polen de Olea (40µgr/tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (250µgr/tira). Rectángulo amarillo: alérgeno desconocido.

En el suero 39 y 110 se observa desaparición de bandas que corresponden a Mm alta (se desconoce el alérgeno).

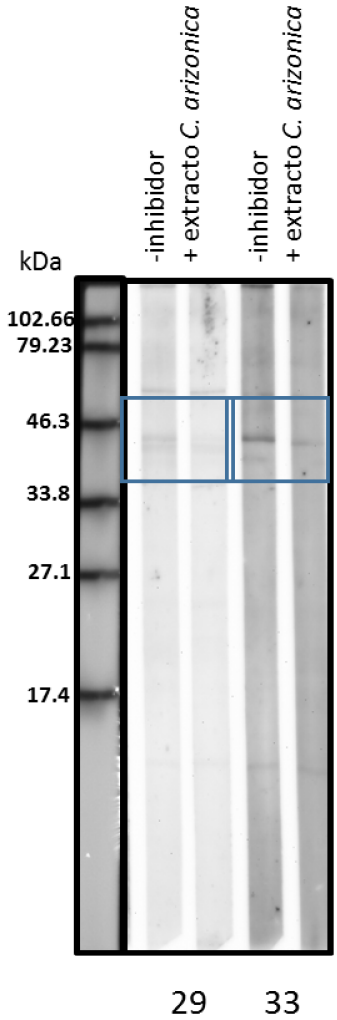

Figura 43. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 2 (sólo Cup s 1 y Ole e 11) (29, 33) en polen de Olea (40µgr/tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (250µgr/tira). Rectángulo azul: Ole e 11.

En los sueros 29 y 33, reconocen además de Cup s 1, Ole e 11, se observa desaparición de bandas que corresponden a Mm alta de aproximadamente 37 kDa (pudiera ser Ole e 11).

- Grupo 3 (Sensibilizados a Ole e 1 (Cup s 1-) con/sin otros alérgenos, en especial Ole e 11, CtD-Ole e 9, NtD-Ole e 9)

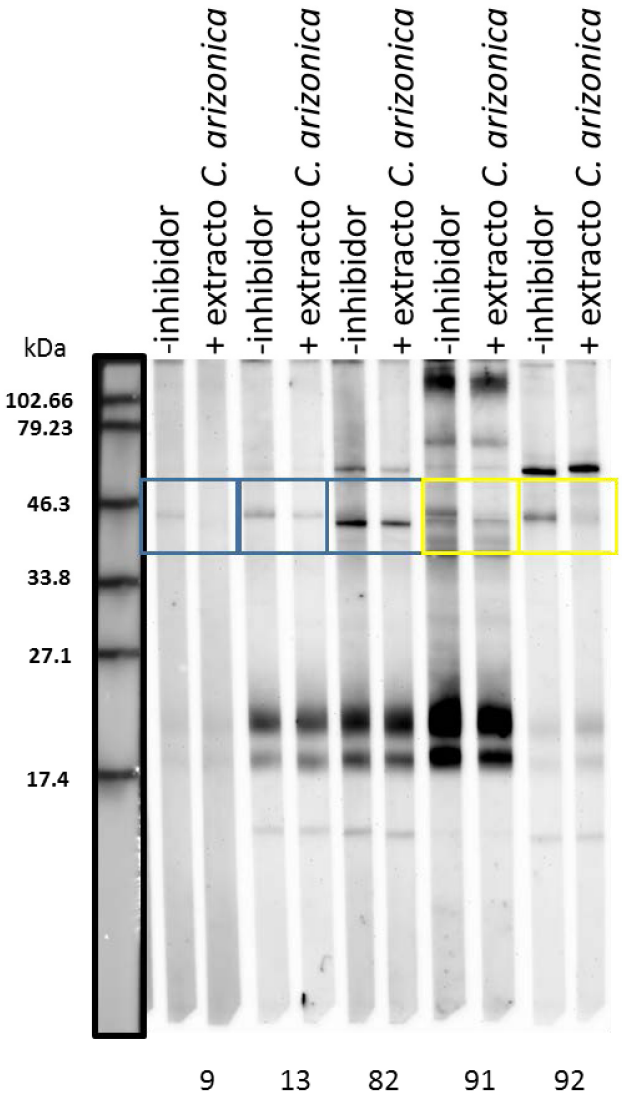

Figura 44. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 3 (Ole e 1+) (9,13, 82, 91, 92) en polen de Olea (40µgr/tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (250µgr/tira). Rectángulo azul: Ole e 11; Rectángulo amarillo: alérgeno desconocido.

Se observa en los sueros 9, 13 y 82 (que están sensibilizados además Ole e 11), una pérdida de intensidad en bandas de Mm que pudiera corresponder a Ole e 11.

En los sueros 91 y 92, que sólo están sensibilizados a Ole e 1, correspondería la perdida de la intensidad de la banda a un alérgeno desconocido.

- Grupo 4 (Sin sensibilización a Cup s 1 ni Ole e 1). Sensibilizados a alérgenos no conocidos. En el caso de suero 10 estaría sensibilizado a Ole e 11.

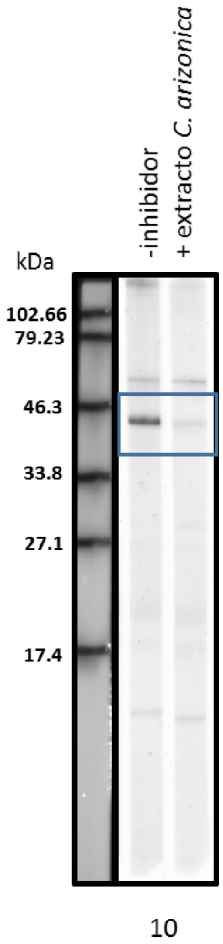

Figura 45. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) grupo 4 (Cup s 1-/Ole e 1-) (10) en extracto polen de *Olea* (40µgr/tira) con extracto de polen de *C. arizonica* (250µgr/tira). Rectángulo azul: Ole e 11.

Se observa en el suero 10 como hay una pérdida de la intensidad de la banda a la altura de la masa molecular que pudiera corresponder con Ole e 11.

Extracto de polen de C. arizonica inhibido por extracto de polen de Olea.

Se han llevado a cabo estudios de inhibición de la inmunodetección de extracto de polen de *C. arizonica* con extracto de polen de *Olea*. Se observa como desaparece la banda de 20 kDa y 45 kDa en pacientes selecionados:

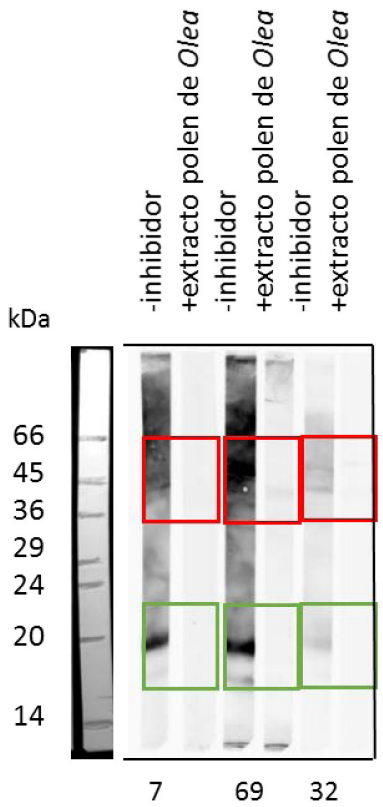

Figura 46. Inhibición de la inmunodetección de algunos sueros (1:5) en extracto de polen de *C. arizonica* (40µgr/tira) con extracto de polen de *Olea* (40µgr/tira). Rectángulo verde: Ole e1; Rectángulo rojo: Ole e 9.

En esta imagen (Fig. 46), observamos pérdida de la banda correspondiente a la altura de las bandas de Ole e 1 (20 kDa), y Ole e 9 (45 kDa) en estos sueros del grupo 1b.

4.4.5 Inhibiciones de la inmunodetección de *C. arizonica* con Ole e 1 y rOle e 9 y rOle e 11

Se llevó a cabo la inhibición de la inmunodetección de sueros de algunos pacientes en extracto de *C. arizonica*, utilizando como inhibidores 500 µg de extracto de polen de *Olea*, así como **(a)** 10 µg de nOle e 1, o **(b)** 10 µg de rCtD-Ole e 9 (proteína recombinante de CtD-Ole e 9).

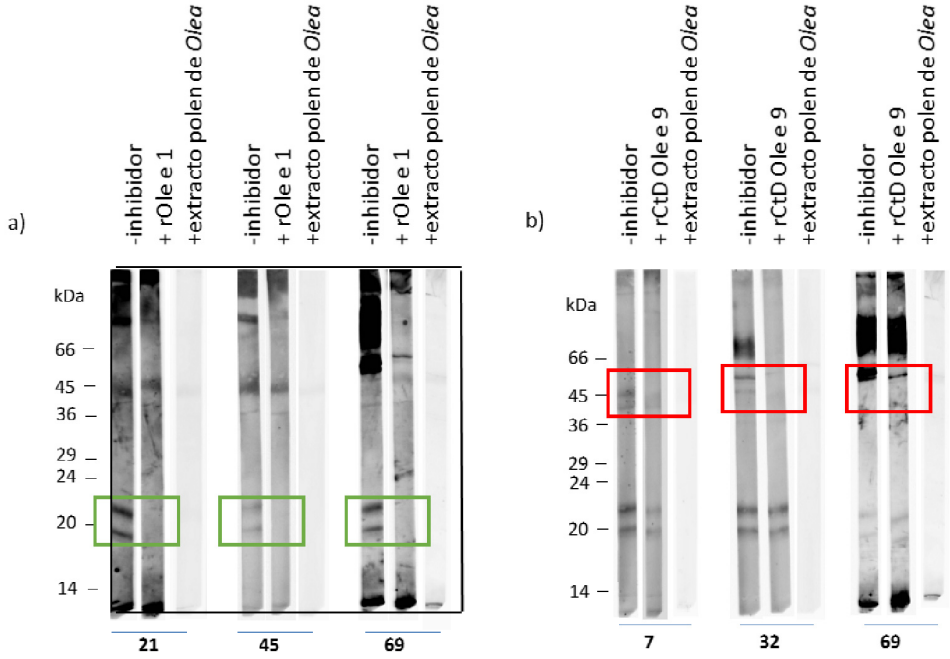

Figura 47. Inhibición de la inmunodetección de sueros de algunos pacientes sobre extracto de polen de *C. arizonica* (80 µg/tira), utilizando como inhibidores: 500 µg de extracto de polen de *Olea*, así como (a) 10 µg de nOle e 1, o (b) 10 µg de rCtD Ole e 9. Rectángulo verde: Ole e1; Rectángulo rojo: Ole e 9.

Se ha identificado homólogos de Ole e 1, Ole e 9 en el polen de extracto de *C. arizonica*, ya que se demuestra que son capaces de inhibir la unión de IgE a Ole e 1 y a CtD-Ole e 9. Estos resultados indican la semejanza entre epítopos IgE de la forma natural y recombinante. En la figura 47 **(a)** se identifican homólogos de Ole

e 1 en polen de *C. arizonica* en algunos pacientes del grupo 1b (sueros 21, 69) y del grupo 1a (suero 45). En la figura 47 **(b)** se identifican homólogos de Ole e 9 en polen de *C. arizonica* en estos pacientes del grupo 1b (sueros 7, 32 y 69), que reconocen CtD-Ole e 9, por ELISA.

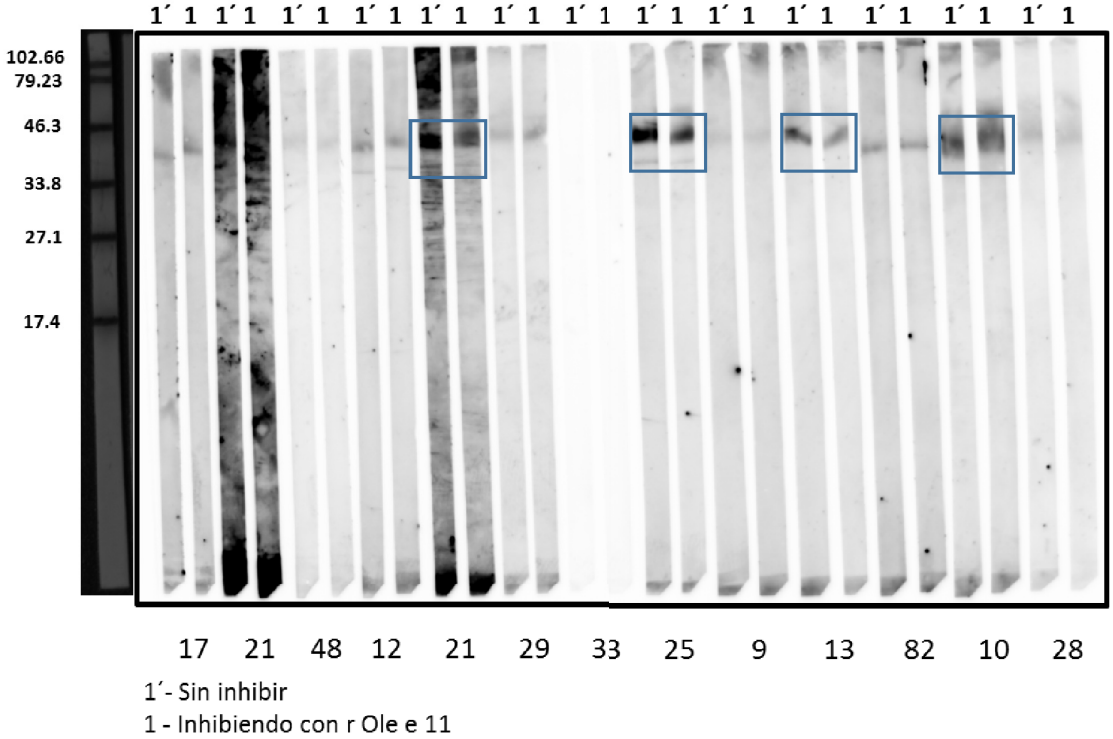

Figura 48. Inhibición de la inmunodetección de sueros (1:5) de algunos pacientes sobre extracto de polen de ciprés (50 µg/tira), utilizando como inhibidor: rOle e 11 (10 µg/ tira); Rectángulo azul: Ole e 11.

Se observa que la proteína recombinante Ole e 11 es capaz de inhibir la unión de IgE a Ole e 11 presente en el polen de *C. arizonica* en los sueros 21 (grupo 1b), 25 (grupo 2), 13 (grupo 3) y 10 (grupo 4). Todos tienen reconocimiento Ole e 11 por ELISA.

5 DISCUSIÓN

La rinoconjuntivitis seguida del asma son las enfermedades alérgicas más prevalentes en las consultas de Alergología en España según el último estudio epidemiológico realizado en nuestro país (Alergológica 2005). Los pólenes son la primera causa de rinitis alérgica, la segunda de asma alérgico en nuestro país y la primera causa de ambas en la Comunidad de Madrid. Los pólenes alergénicos varían según la zona geográfica, la vegetación y el clima. En el área de Madrid los tipos polínicos más frecuentes encontrados en la atmósfera durante los años 1994-2004 fueron los de tipo arbóreo y por orden de frecuencia *Platanus* y *Cupressaceae*, ocupando *Olea* el séptimo lugar desde el punto de vista cuantitativo entre todos los tipos polínicos (Gutiérrez y col., 2006). Los tipos herbáceo con las gramíneas ocupan el quinto lugar. Sin embargo, según el estudio de Alergológica 2005, el polen de gramíneas fue la especie más sensibilizante, seguido del polen de olivo, en la Comunidad de Madrid.

La polisensibilización es un hallazgo frecuente en los pacientes con alergia al polen (60-80%) (Demoly y col., 2017) y, en nuestra área los pólenes más prevalentes son los de gramíneas, olivo, cupresáceas y plátano de sombra (Cuesta y col., 2010).

La coincidencia de sensibilización aislada a polen de ciprés y olivo, no es infrecuente, pero no hay datos epidemiológicos de su frecuencia documentados en la literatura. A raíz de la observación clínica de la coincidencia de sensibilización aislada a pólenes de ciprés y olivo en pacientes con clínica respiratoria, nos planteamos si era una co-sensibilización o era debida a una reactividad cruzada. Como primera aproximación, analizamos los valores de PC e IgE específica (*Immuno*CAP) en pacientes con doble sensibilización a ciprés y olivo y obtuvimos correlaciones positivas (r=0,3-0,5, *p* 0.01) (Alonso y col., comunicación abstract 2003), lo que sugería la existencia de reactividad cruzada entre los pólenes de ciprés y olivo.

Esta coincidencia en la sensibilización únicamente a pólenes de ciprés y olivo, ha sido mencionada por algunos autores (Quiralte y col., 2002; Sposato y col., 2013), pero nunca se ha estudiado con profundidad.

Por esta razón decidimos estudiar una población mayor y se incluyeron en nuestro estudio a 85 pacientes alérgicos a pólenes de ciprés y olivo, sensibilizados exclusivamente a dichos pólenes seleccionados mediante PC positivas, con el objetivo de esclarecer su fenotipo y perfil de sensibilización alergénica. Además, se incluyeron como controles pacientes con alergia respiratoria, pero monosensibilizados mediante PC a polen de ciprés (n=21) o a polen de olivo (n=15), para compararlos tanto por el fenotipo clínico como por el perfil del reconocimiento alergénico.

5.1 Características clínicas de los pacientes con doble sensibilización a pólenes ciprés y olivo

Hemos analizado los datos demográficos y clínicos de nuestro grupo de 85 pacientes, intentando identificar un fenotipo clínico característico de esta doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo. Buscando encontrar diferencias o similitudes con los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés (n=21) y monosensibilizados a polen de olivo (n=15), hemos comparado los tres grupos.

Respecto a la edad hemos observado que los pacientes con doble sensibilización a ciprés y olivo son adultos jóvenes (media 34,71 años ± DE 12,73), al igual que los pacientes monosensilizados a polen de olivo (media 33,87 años ± DE 11,14); sin embargo, los pacientes con monosensibilización a polen de ciprés tienen mayor edad que el resto de los 2 grupos (media 45 años ± DE 13,17) (*p* 0,012). Este hecho está ya descrito por otros autores (Bousquet y col., 1993; Charpin y col., 2005; Charpin y col., 2013). Estos autores indican que los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés necesitan estar muchos años expuestos a elevadas concentraciones de polen de ciprés antes de presentar clínica, comportándose más como alérgicos que como atópicos. Además, clásicamente

los síntomas invernales debidos a esta polinización han sido frecuentemente confundidos con catarros invernales

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo, entre los tres grupos, aunque hay un predominio de mujeres en todos, hallazgo frecuente cuando se exploran poblaciones de pacientes alérgicos al polen en general (Jensen-Jarolim y col., 2008).

Hay que señalar que no hay trabajos en la literatura científica donde se hayan estudiado estos pacientes con doble sensibilización exclusivamente y hay muy pocos donde se analice la monosensibilización a polen de ciprés o a olivo. Además, los estudios existentes utilizan diferentes criterios de inclusión y metodologías, y están realizados en distintas áreas geográficas, lo que dificulta su comparación

La clínica predominante en nuestro grupo de 85 pacientes con doble sensiblización es la rinoconjuntivitis (96,5%), lo cual también se ha observado en los pacientes de los grupos monosensibilizados de nuestro estudio, aunque es más destacable en los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés (100%), siendo menor entre los monosensibilizados a polen de olivo (73,3%).

En los trabajos consultados de la literatura científica se observa alta prevalencia de rinoconjuntivitis (92-100%) en los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés, de las series de Granada (Díaz de la Guardia y col., 2006), (Montpellier (Francia) (Bousquet y col., 1993) y de Italia (tres zonas, norte, centro y sur) (Sposato y col., 2014).

El 37,6% de los pacientes de nuestro grupo de doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo tienen asma (con o sin rinoconjuntivitis). Aunque en el grupo de monosensibilizados de nuestro estudio hay asmáticos, lo que marca la diferencia entre los tres grupos (*p* 0,014) es el porcentaje elevado de asma entre los pacientes monosensibilizados al polen de olivo (53,3%). Otros autores también encuentran una frecuencia de asma del 60% en pacientes monosensibilizados a este polen (López Serrano y col., 1994; Feo Brito y col., 2011). En nuestros pacientes monosensibilizados a polen de ciprés hemos observado un 9,5% de

asmáticos. Otros autores han publicado la existencia de frecuencias discretamente superiores en monosensibilizados a polen de ciprés (Bousquet y col., 1993; Díaz de la Guardia y col., 2006; Sposato y col., 2014).

Un 87,1% de los pacientes con doble sensibilización tienen síntomas estacionales. Similar porcentaje (90%) se observa en los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés, pero es inferior en los monosensibilizados al polen de olivo (60%). Pero de nuevo lo que los diferencia es la mayor proporción de pacientes monosensibilizados a polen de olivo que presentan síntomas perennes (40%, *p* 0,032). La clínica fuera de la estación polínica en pacientes con alergia al polen de olivo ha sido observada por otros autores (López Serrano y col., 1994; Kirmaz y col., 2005). 12,9% de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo y, 9,5% de los monosensibilizados a polen de ciprés presentan síntomas perennes.

Cuando analizamos el mes de presentación de los síntomas que refieren los pacientes, hemos encontrado resultados concordantes entre la sensibilización a cada polen y la estación en la que dicho polen está presente en la atmósfera. Los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, presentan clínica en febrero y mayo (57,6%), aunque también sólo mayo (16,4%) y sólo febrero (11%). Sin embargo, los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés refieren clínica en febrero (85,7%) y los pacientes monosensibilizados a polen de olivo, en mayo (60%). Curiosamente, algunos pacientes monosensibilizados a polen de ciprés tienen síntomas también en mayo (4,7%). Los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés publicados por (Sposato y col., 2014), residentes en diferentes zonas de Italia, refieren además de la época invernal, síntomas en primavera el 16-100% de los sujetos.

Mediante el análisis de correspondencia realizado hemos comprobado los datos anteriormente descritos, que se reflejaron en la Fig. 18 del capítulo de resultados, que resumen que con las 2 dimensiones se explica el 86% de la variabilidad total. En el 73% (elipse color negro) existe una asociación entre la sensibilización a polen de olivo y los síntomas perennes y asma, una asociación entre la

sensibilización a polen de ciprés y los síntomas estacionales y rinoconjuntivitis y también, aunque más débil entre la doble sensibilización pólenes de ciprés+olivo con estacionalidad. En el 12,7% (elipse color rojo), existe una asociación entre la monosensibilización a polen de ciprés y los síntomas de rinoconjuntivitis, ya explicada en la otra dimensión y, entre la doble sensibilización a ciprés+olivo y el presentar síntomas de rinoconjuntivitis y asma.

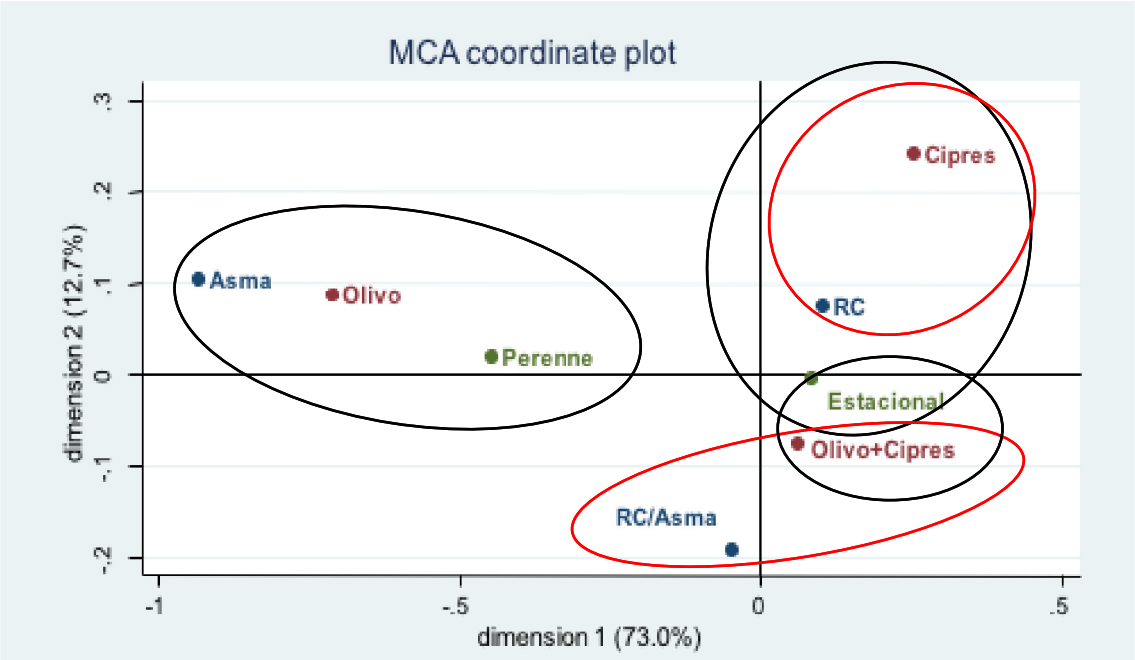

Figura 18. Análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre síntomas, estacionalidad y grupo de pacientes

Ciprés: monosensibilización a polen de ciprés; Olivo: monosensibilización a polen de olivo; Olivo+Ciprés: sensibilización a pólenes de ciprés y olivo; RC: rinoconjuntivitis.

5.2 Perfil de sensibilización a alérgenos

Cuando realizamos el diagnóstico con extractos completos de la fuente alergénica, ya sea mediante PC o con *Immuno*CAP, utilizamos mezclas de alérgenos (específicos y de reactividad cruzada). Gracias a los avances en la biología molecular hemos llegado a un diagnóstico por componentes que permite una aproximación más precisa a la sensibilización del paciente identificando los alérgenos a los cuales está sensibilizado tanto genuinos como de reactividad cruzada, lo cual es muy importante en pacientes polisensibilizados (Sastre y col., 2013; Barber y col., 2014). En el caso de nuestro estudio era interesante conocer el perfil de sensibilización a alérgenos de nuestros pacientes alérgicos con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, algo que no se ha estudiado hasta ahora. Por ello, hemos llevado a cabo estudios de determinación de IgE específica mediante ELISA a diferentes alérgenos purificados del polen del olivo (nOle e 1, rOle e 2, rOle e 3, nOle e 7, y rOle e 9 y rOle e 11) y del polen de ciprés (rCup s 1), y los hemos comparado con los resultados de nuestros pacientes monosensibilizados a polen de ciprés y monosensibilizados a polen de olivo, y con otras series de pacientes revisadas en la literatura.

Tabla 24. Porcentaje (%) de sensibilización a alérgenos en la serie objeto de estudio y en otras series publicadas.

	Tesis Alonso			Quiralte	Barber EXPO	Cuesta Vegetalia		Scala
Sensibilización	**Ciprés+ Olivo**	**Ciprés**	**Olivo**	**Olivo con/sin otros pólenes**	**Cualquier polen**	**PAG**	**PAG**	**Ole e con/sin otros**
N	77	21	15	119	891	664	50	839
Población	Alcorcón	Alcorcón	Alcorcón	Jaén	Multicéntrico*	Multicéntrico**	Alcorcón	Roma
Cup s 1	59,7%	90,5%	6,7%		14,9%	34,4%	50%	
Ole e 1	74%	0%	33,3%	80%	75,3%	46,2%	56%	84,4%
Ole e 2	1,3%	4,8%	0%	61,3%	15%			
Ole e 3	2,6%	0%	0%	31,9%				
Ole e 7	0%	0%	0%	41,1%%	14,4% (≧35%)***			21,5%
Ole e 9	11,7%	23,8%	33,3%		10,7% (≧35%)***	5%	0%	10,1%
NtDOle e 9	3,9%	0%	20%					
CtDOle e 9	10,4%	23,8%	13,3%					
Ole e 11	19,5%	23,8%	13,3%					
Ole e 12	3,9%	0%	13,3%					
Ole e menor	29,9%	42,9%	40%					

(≧35%)***, frecuencia de sensibilización en áreas de máxima exposición a polen de olivo; Multicéntrico*, provincias participantes en estudio EXPO I (centro (excepto Madrid), sur, levante; Multicéntrico**: participación de 8 Centros en diferentes provincias (Madrid [4 centros], Jaén, Las Palmas, Barcelona, y Pamplona); “Ole e” con/sin otros, pacientes con sensibilización a alérgenos de olivo por CAP-ISAC112, con o sin otros alérgenos (excluidos profilina, polcalcina); PAG: grupo alergia al polen. (Quiralte y col., 2002; Barber y col., 2008; Cuesta y col., 2010; Scala y col., 2016)

Cuando analizamos los resultados del ELISA, hemos encontrado una respuesta mediada por IgE frente a Ole e 1 en el 74% de los pacientes alérgicos con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo, comportándose como un alérgeno mayoritario o principal y siendo significativamente superior (p< 0,001) a la frecuencia de sensibilización a Ole e 1 en monosensibilizados a olivo y a ciprés. Ole e 1 es un marcador de sensibilización primaria a polen de olivo en pacientes sensibilizados a dicho polen (Palomares y col., 2006), por lo que parece que en nuestra serie de pacientes con doble sensibilización jugaría un papel predominante.

Cup s 1 es el segundo alérgeno en frecuencia, reconocido en el 59,7% de estos pacientes, lo que hace que sea también un alérgeno principal en nuestra serie junto al Ole e 1.

Si comparamos la frecuencia de sensibilización a Ole e 1 y Cup s 1 con las series de pacientes con alergia a múltiples pólenes publicadas (Tabla 24), se observan porcentajes más elevados en nuestra serie que los encontrados en polínicos (PAG) de nuestra misma Área de Alcorcón (estudio Vegetalia) (Cuesta y col., 2010) con frecuencias de 56% para Ole e 1 y 50% para Cup s 1. Los resultados para Ole e 1 se asemejan más a los de Quiralte y col. en Jaén, a los de Scala y col. en Roma y a los de Barber y col. en zonas de alta exposición a polen de olivo (75 a 84% de los positivos a Ole e 1) (Quiralte y col., 2002; Barber y col., 2008; Scala y col., 2016).

El resto de alérgenos de polen de olivo se comportan como alérgenos minoritarios en nuestros pacientes con doble sensibilización, tal y como demuestran las frecuencias de sensibilización encontradas: Ole e 11 (19,5%), “Ole e 9” (NtDOle e 9 y/o CtDOle e 9) (11,7%), CtD-Ole e 9 (10,4%), NtD-Ole e 9 (3,9%), Ole e 12 (3,9%), Ole e 3 (2,6%), y Ole e 2 (1,3%). Hay datos de sensibilización del 55,9% a Ole e 11 en pacientes de Madrid alérgicos al polen de olivo (Salamanca y col., 2010). Es llamativo el porcentaje de pacientes que detectan IgE frente a Ole e 9 en nuestros pacientes con doble sensibilización (11,7%), similares a los reconocidos por los pacientes publicados por Barber (10,7%) (Barber y col., 2008)

y Scala (10,1%) (Scala y col., 2016), pero superiores a los publicados en el estudio Vegetalia (Cuesta y col., 2010) en diferentes zonas de España, incluso Madrid, y sobre todo en los 50 pacientes de estudio Vegetalia reclutados en Alcorcón, ya que la prevalencia de sensibilización fue de 0% para Ole e 9. La cohorte de polínicos de Alcorcón es la más adecuada como control de los pacientes con doble sensibilización a polen de ciprés y olivo. Porcentajes de sensibilización a Ole e 9 similares a los de nuestro estudio se observan en los pacientes del estudio EXPO, en zonas de la mitad sur de la península Ibérica de moderada exposición a polen de olivo (Barber y col., 2008), y también en pacientes de Roma (Scala y col., 2016).

El 90,5% de los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés, reconocen Cup s 1, con diferencias estadísticamente significativas (p<0,001) respecto a los otros dos grupos, lo que corrobora que Cup s 1 es un marcador de sensibilización genuina en pacientes alérgicos al polen de ciprés. También hemos observado en nuestro estudio que el dominio Nt de Ole e 9 se identifica en el 20% de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo, con porcentajes más bajos o inexistentes en los otros 2 grupos (p<0,001).

Resulta llamativo que, hasta el 42,9% de los pacientes monosensibilizados al polen de ciprés tengan IgE específica a cualquier alérgeno minoritario de olivo ("Ole e menor"), en especial el dominio Ct de Ole e 9 y Ole e 11 con porcentajes de 23,8% cada uno, lo cual no está descrito previamente y nos hizo pensar en la posibilidad de alérgenos homólogos en el polen de ciprés. Por este motivo, se llevaron a cabo los ensayos de inmunodetección e inhibición.

También hemos observado en nuestro estudio que el dominio Nt de Ole e 9 se identifica en el 20% de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo, con porcentajes más bajos o inexistentes en los otros 2 grupos (p<0,001).

Al combinar los alérgenos con dominio Nt de Ole e 9 y/o con dominio Ct de Ole e 9, en la variable "Ole e 9", se comprueba que aumenta la prevalencia de sensibilización en el grupo de pacientes de olivo (33,3%), sobre todo comparando con el grupo de doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo (11,7%), con un

valor de *p* 0,06, cercano a la significación estadística, aunque sin alcanzarla por probable falta de tamaño muestral. Por lo tanto, en los pacientes monosensibilizados a polen de olivo las sensibilizaciones más frecuentes son Ole e 1 (33,3%) junto con “Ole e 9” (33%) y NtD-Ole e 9 (20%). Llama la atención que la frecuencia de sensibilización a “Ole e 9” en esta población es similar a la encontrada por Barber y col., en zonas de elevada exposición a polen de olivo (Barber y col., 2008).

La frecuencia de sensibilización a panalérgenos encontrada en la serie de pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo es muy baja o inexistente (1,3%, Ole e 2, profilina; 2,6%, Ole e 3, polcalcina; y 0%, Ole e 7, nsLTP), por lo que la asociación exclusiva de sensibilización a polen de ciprés y olivo en nuestro estudio no sería debida a reactividad cruzada por panalérgenos. Esto apoyaría la idea de que nuestros pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo estuviesen co-sensibilizados o que la reactividad cruzada fuese debida a alérgenos no descritos hasta la fecha, sugiriendo los resultados del ELISA una posible implicación de homólogos Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11.

Los datos descritos previamente se ratifican mediante análisis de correspondencias (Fig. 22), donde se observa una asociación (elipse azul) en un 45,2% entre pacientes monosensibilizados a polen de olivo y sensibilización a alérgenos Ole e 12, dominio Nt de Ole e 9 y Ole e 11 y, una asociación entre los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés con la sensibilización a Cup s 1 y CtDOle e 9. Por otro lado, en el 14,8%, se observa una asociación entre la sensibilización a Cup s 1 y Ole e 1 y la doble sensibilización a pólenes de ciprés+olivo, por lo que éstos alérgenos podrían ser responsables en una gran mayoría de los casos de una sensibilización genuina en estos pacientes, demostrado por la elevada prevalencia encontrada a Ole e 1y/o Cup s 1 por ELISA en estos pacientes.

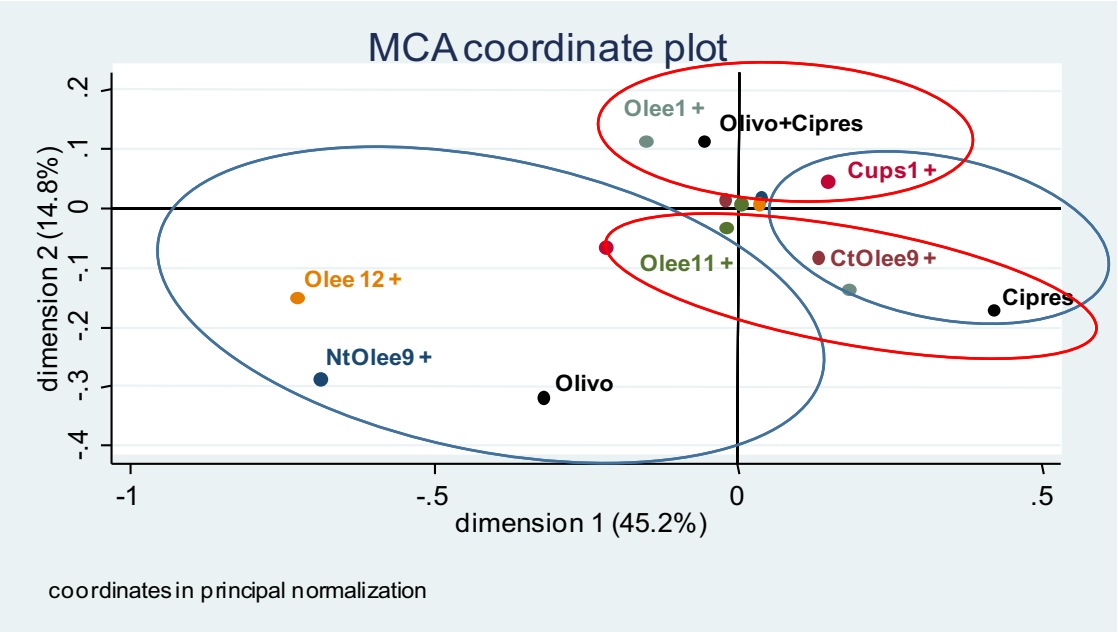

Figura 22. Análisis de correspondencias para estudiar la asociación entre alérgenos y grupo de pacientes.

Ciprés: monosensibilización a polen de ciprés; Olivo: monosensibilización a polen de olivo; Olivo+Ciprés: sensibilización a pólenes de ciprés y olivo.

Hemos analizado el perfil molecular en los 77 pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo y la presentación clínica – presencia o no de asma, estacionalidad o clínica perenne, mes de aparición de los síntomas – y hemos encontrado algunas diferencias estadísticamente significativas. La sensibilización a NtD-Ole e 9 sólo se detecta en asmáticos, no estando sensibilizado ningún paciente con rinoconjuntivitis aislada (*p* 0,045). En esta misma línea, Barber y col. publicaron que en los pacientes sensibilizados a Ole e 9 la frecuencia de asma era tres veces superior (Barber y col., 2008).

Cuando analizamos el mes de presentación de los síntomas, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes sensibilizados a Ole e 1 (*p* 0,027) ya que el 82,2% de los pacientes que tienen síntomas en febrero y mayo (febrero+mayo) están sensibilizados a Ole e 1. Encontramos que Cup s 1 es segundo en frecuencia en dichos meses (febrero+mayo), siendo más relevante su

reconocimiento en los pacientes que sólo presentan sintomas en febrero (81,8%) aunque sin significación estadística. Se podría decir que los pacientes con doble sensibilización a ciprés+olivo, que tienen síntomas en febrero+mayo, el Ole e 1 sería el marcador de sensibilización primaria y el Cup s 1 ocuparía un segundo lugar y que, en los pacientes que tienen síntomas en febrero el Cup s 1 estaría implicado como alérgeno primario.

La sensibilización a “Ole e 9” sólo se observa en los pacientes con síntomas en febrero+mayo, y parece estar relacionada más con el dominio Ct de Ole e 9, por lo que este alérgeno pudiera estar implicado en la doble sensibilización, posiblemente como responsable de reactividad cruzada.

En los pacientes con clínica perenne se ha encontrado una frecuencia de sensibilización a Ole e 11 (50% frente a 14,9% de los que presentan síntomas estacionales, p 0,02). Sin embargo, Ole e 11 también es más frecuente en los pacientes que presentan clínica estacional en febrero (36,5%, *p* 0,04). En definitiva, no podemos asociar el patrón perenne con un perfil exclusivo de sensibilización a alérgenos.

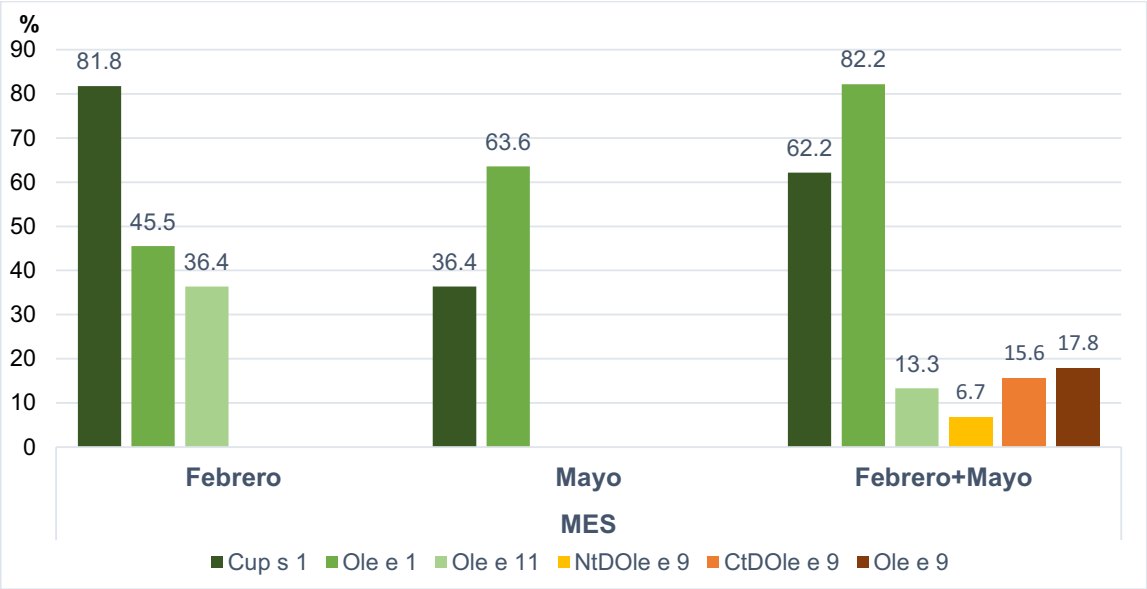

Figura 49. Porcentaje (%) de sensibilización a alérgenos según mes de presentación de los síntomas.

5.3 Análisis de los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo. Clasificación según reconocimiento a los alérgenos Cup s 1 y Ole e 1

Para analizar las características clínicas e inmunológicas del grupo de pacientes de doble sensibilización hemos utilizado la división en subgrupos (G1, G2, G3 y G4), según presentaran o no sensibilización a los alérgenos principales Ole e 1 y Cup s 1. Recordamos que el grupo G1 lo forman aquellos pacientes Cup s1+/Ole e 1+, que ha resultado como podría esperarse el más amplio con una frecuencia del 44,2%; grupo G2 (Cup s 1+/Ole e 1-) con una frecuencia del 15,6%; grupo 3 (Cup s 1-/Ole e 1+) con una frecuencia del 29,9%, y grupo 4 (Cup s 1-/Ole e 1-) con una frecuencia del 10,4%. No hemos encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pares de alérgenos mayores (G1, G2, G3 y G4) cuando valoramos la edad o sexo de los pacientes. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos respecto a los síntomas respiratorios y estacionalidad. Sin embargo, cuando evaluamos el mes de presentación de los síntomas, se observa que los pacientes sensibilizados al par de alérgenos con Ole e 1 positivo (grupos G1 y G3) presentan los síntomas en los meses de febrero+mayo y los pacientes con sensibilización a Cup s 1 tienen síntomas más frecuentes en febrero, sobre todo si no están sensibilizados al alérgeno mayor del olivo Ole e 1.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos al analizar el resultado de las PC, aunque encontramos mayor tamaño de la mismas en los pacientes del grupo G1 y G3 (Ole e 1+) con el extracto de *Olea* y en los pacientes del grupo G1 y G2 (Cup s 1+) con el extracto de *Ca y Cs,* lo que parece lógico ya que son los alérgenos principales, más abundantes y mejor cuantificados en los extractos completos de ambos pólenes.

Sí se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos al analizar el resultado de la IgE específica mediante *Immuno*CAP, ya que

se han encontrado valores más elevados y frecuencias más altas en los pacientes del grupo G1 y G2 (Cup s 1+) con el extracto de *Ca y Cs,* y en los pacientes del grupo G1 y G3 (Ole e 1+) con el extracto de *Olea*, de nuevo congruente con la presencia de los alérgenos principales.

Cuando hemos analizado la IgE específica mediante ELISA frente al extracto de *Olea* y *Cupressus* hemos observado también diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos porque se han encontrado frecuencias superiores de IgE frente ambos extractos en los grupos de pacientes en los que se detectaba sensibilización al alérgeno principal (Ole e 1 o Cup s 1), es decir, superiores en grupos G1 y G2 con extracto de *Cupressus* y en los grupos G1 y G3 con el extracto de *Olea*. No obstante, en cualquier grupo se ha detectado IgE específica frente a los extractos (ver Fig. 25 de resultados). Estos hallazgos se podrían justificar por la existencia en los extractos de *Olea* y *Cupressus* de alérgenos homólogos en ambos pólenes.

Sin embargo, no había diferencias entre los 4 grupos cuando hemos analizado la sensibilización a los alérgenos menores de polen de olivo, aunque puede destacarse que sólo se observa cuando hay sensibilización a Ole e 1+ (grupos G1 y G3), excepto la sensibilización a Ole e 11 que está presente en cualquier grupo (grupos G1, G2, G3 y G4), aunque con menor frecuencia en el grupo G4 (12,5%), (ver Fig. 26 de resultados).

5.4 Estudios de inmunodetección en los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante las técnicas de cuantificación de la IgE específica frente a los diferentes alérgenos de polen de olivo y ciprés, realizamos estudios de inmunodetección con el fin de conocer el perfil de reconocimiento alergénico de los pacientes de nuestro estudio en los extractos de polen de *Olea* y *Cupressus*. Ya hemos comentado previamente que Ole e 1 y Cup s 1 han resultado ser, mediante la determinación de IgE por ELISA, los alérgenos principales en los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo con una prevalencia del 74% y 59,7% en los pacientes, respectivamente. Ole e 11 y Ole e 9 se comportan como alérgenos minoritarios o secundarios, con una prevalencia de 19,5% y 11,7%, respectivamente. La frecuencia de los dos dominios de Ole e 9 (CtD-Ole e 9 y NtD-Ole e 9) ha sido del 10,4% y del 3,9%, respectivamente.

Mediante los estudios de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales (pAbs) específicos obtenidos frente al nOle e 1, rNtD y rCtD de Ole e 9, nOle e 7 y rOle e 10 y rOle e 11, se ha encontrado reconocimiento en polen de ciprés con el pAb anti-rCtD-Ole e 9, anti-nOle e 1 y anti-rOle e 11, por lo que se demuestra la presencia de homólogos de Ole e 1, Ole e 9 (dominio Ct) y Ole e 11. La reactividad cruzada por homólogos de Ole e 1 sería a través de su cadena polipeptídica o su azucar, ya que nOle e 1 está glicosilado. En el caso de Ole e 9, pueden aparecer bandas de Mm altas y bajas, éstas últimas correspondientes a Ole e 10, que es el homólogo de CtD-Ole e 9. Esta es la primera vez que se identifican alérgenos homólogos de Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11 en el polen de ciprés. Ya se conocía la existencia de una ß glucanasa en el polen de ciprés (Shahali y col. 2012), pero se desconocía su relevancia como alérgeno.

El alergograma de los pacientes con doble sensibilización es complejo, por la gran cantidad de bandas proteínas que reconocen. Se ha confirmado mediante

estudios de inhibición de la inmunodetección que existe reactividad cruzada entre los pólenes de ciprés y olivo, a través de alérgenos no descritos hasta la fecha, entre los que se encuentran homólogos de Ole e 1, homólogos de Ole e 9 y homólogos de Ole e 11 del polen de olivo, que está presentes en el polen de ciprés. Esta reactividad cruzada parece aclarar la causa de la doble sensibilización en los pacientes del grupo G3 (Cup s 1-/ Ole e 1+), porque estos pacientes se sensibilizarían al polen de ciprés a través de homólogos de alérgenos del polen de olivo, cuya presencia se demostrado en el polen de ciprés. En el grupo G2 (Cup s1+/Ole e 1-), la sensibilización a polen de olivo sería también, por reactividad cruzada a través de los alérgenos homólogos menores del polen de olivo en el polen de ciprés o de otros alérgenos desconocidos. En principio, la explicación de la doble sensibilización en los pacientes del grupo G1, con ambos alérgenos principales Cup s 1 y Ole e 1 positivos, parece responder a una verdadera co-sensibilización. Sin embargo, lo que resulta complejo explicar es que, en varios de estos pacientes, sobre todo los del grupo 1b (sueros 7, 21, 32, 69), con sensibilización añadida a alérgenos menores, pero también en el grupo 1a (sueros 37 y 45), con sensibilización exclusiva a Cup s1 y Ole e 1, se demuestra reactividad cruzada por alérgenos homólogos de Ole e 1 u otros no identificados hasta la fecha. Entonces, ¿podríamos hablar de “verdadera co-sensibilización” en estos pacientes?, o sería también por reactivad cruzada o una mezcla de ambos, es decir, primero sensibilización a alérgenos principales y después sensibilización a los homólogos. Y por último los pacientes de grupo G4, con negatividad a ambos alérgenos principales, la causa de la doble sensibilización podría explicarse por reactividad cruzada de alérgenos menores del polen de olivo (uno de los pacientes detectaba IgE específica mediante ELISA frente a Ole e 11) o a través de reconocimiento de otros alérgenos no identificados hasta la fecha.

6 APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA: PROPUESTA DE ALGORITMO DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICO

Los extractos completos de polen utilizados para la realización de PC y determinación de IgE específica están compuestos de mezcla de alérgenos principales, minoritarios, panalérgenos y otras moléculas no alergénicas (Raudauer y col., 2014). El diagnóstico basado únicamente en las PC es difícil de establecer sobre todo en los pacientes polisensibilizados (Vidal y col., 2014). Por lo tanto, para identificar los alérgenos que son responsables de la sensibilización, es necesario utilizar el diagnóstico molecular (Sastre y col., 2013), sobre todo en áreas de exposición a pólenes complejas (Barber y col., 2014). Gracias al diagnóstico por componentes podemos llegar a un diagnóstico más certero con el fin de diseñar una inmunoterapia más adecuada o correcta, con mayor beneficio terapéutico, con el consiguiente control de los síntomas, mejora de la calidad de vida, y ahorro de recursos sanitarios (Sastre y col., 2016). Además, se ha demostrado la importancia del diagnóstico molecular ya que su resultado ha llegado a variar las indicaciones de la inmunoterapia entre los alergólogos (Sastre y col., 2012, Moreno y col., 2012).

En nuestro estudio la identificación de los alérgenos implicados, principales ~~y~~ minoritarios, ha clasificado los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo diagnosticada mediante prueba cutánea en cuatro grupos (G1, G2, G3 y G4). Mediante los estudios de inmunodetección de alérgenos y estudios de inhibición, hemos identificado alérgenos homólogos de Ole e 1, Ole e 9 (Dominio Ct) y Ole e 11 en el polen de ciprés, no descritos hasta la fecha, que pudieran explicar el patrón de doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo diagnosticado por prueba cutánea y determinación de IgE específica sérica con extractos completos. En unos casos correspondería a co-sensibilización por alérgenos principales (Cup s 1, Ole e 1) y en otros a reactividad cruzada por alérgenos homólogos de Ole e 1, Ole e 9 (Dominio Ct) y Ole e 11 en el extracto de polen de ciprés. No se descarta la existencia de otros alérgenos presentes en ambos pólenes que no hayan podido identificarse y también explicasen la reactividad cruzada.

Los resultados obtenidos mediante el diagnóstico molecular podrían ayudarnos a la elección de una IT más adecuada para los pacientes con alergia respiratoria y

doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo. Siguiendo el esquema de nuestro estudio podríamos señalar:

En el grupo 1 (Cup s1+/Ole e 1+), tendríamos pacientes co-sensibilizados a ambos pólenes por sensibilización a alérgenos principales Cup s 1 y Ole e 1, o con doble sensibilización por reactividad cruzada a través de alérgenos homólogos Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11. En los pacientes con síntomas concordantes con los meses de polinización, la indicación sería IT con extracto de ciprés + olivo, y en el caso de Ole e 9 positivo, sería administrar un extracto comercial de polen de olivo donde se asegure la cuantificación de Ole e 9.

El en grupo 2 (Cup s 1+/Ole e 1-), la sensibilización primaria sería a polen de ciprés. Los pacientes no se han sensibilizado a polen de olivo a través de Ole e 1, por lo que se podría pensar que lo han hecho a través de reactividad cruzada frente a alérgenos del polen de ciprés.

En nuestro estudio y en este grupo sólo hemos identificado Ole e 11. Por ello en este grupo de pacientes, independiente del resultado de Ole e 9, la opción sería IT con polen de ciprés, porque no podemos determinar Ole e 11 mediante *Immuno*CAP y no está cuantificado en ningún extracto de polen de olivo para IT, hasta la fecha.

En el grupo 3 (Cup s 1-/Ole e 1+) cabe pensar que los pacientes se han sensibilizado a polen de ciprés a través de algún alérgeno homólogo en olivo que podría ser Ole e 1, aunque no se puede descartar que no sea a través de algún otro alérgeno, posiblemente Ole e 9 u Ole e 11. En estos pacientes la decisión sería IT con polen de olivo, que en el caso de Ole e 9 positivo, lo recomendable sería administrar un extracto donde estuviese cuantificado dicho alérgeno.

En el grupo 4 (Cup s 1-/Ole e 1-), la sensibilización podría deberse a través de algún alérgeno no identificado como principal. No puede ser ningún alérgeno de otra especie porque los pacientes de nuestro estudio no tienen otra sensibilización a ningún otro polen. Hemos encontrado sólo un paciente sensibilizado a Ole e 11. Hasta no realizarse más estudios sobre la implicación de alérgenos en este grupo,

creemos que la IT no estaría indicada, independientemente del resultado de Ole e 9.

A nivel práctico hemos diseñado una propuesta de algoritmo diagnóstico y terapéutico. Los alérgenos disponibles comercialmente y de aplicación en la práctica clínica son nCup a 1, rOle e 1, nOle e 7 y rOle e 9 (*Immuno*CAP, Thermofisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Sweden). Si bien a priori por los resultados de las PC indicaríamos a todos los pacientes con doble sensibilización y síntomas concordantes una doble IT con ciprés y olivo, el diagnóstico molecular haría decidir el extracto a indicar. El resultado de Ole e 9 no aporta cambios de decisión ya que el tipo de extracto de IT está basado en los resultados de los alérgenos principales. Sin embargo, Ole e 9, podría ayudarnos en el caso de que fuese positivo a elegir extractos de polen de olivo donde el Ole e 9 estuviese cuantificado, lo que lograría una mayor eficacia y mejor tolerancia del extracto en estos pacientes.

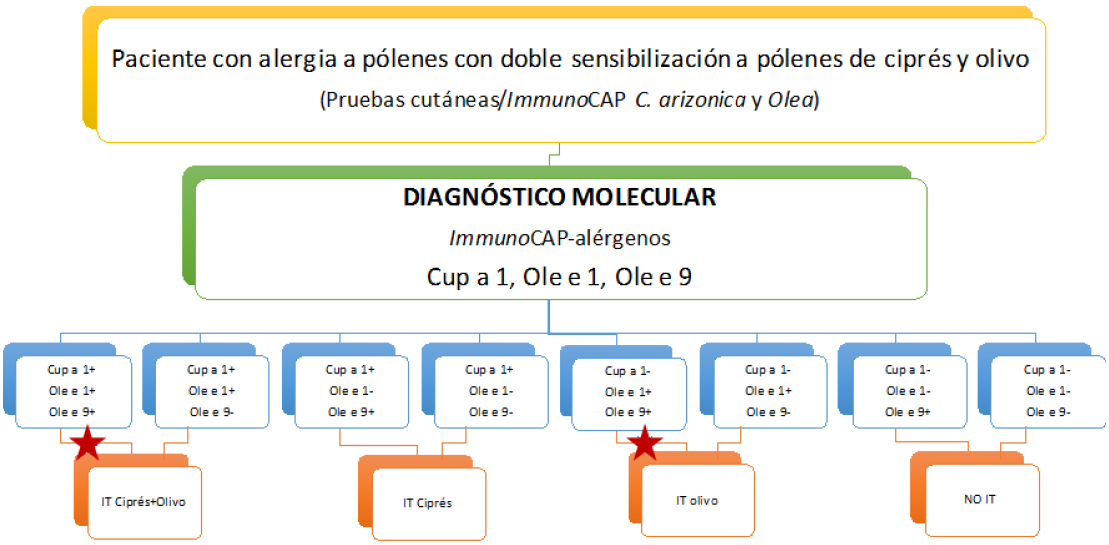

Figura 50. Algoritmo diagnóstico y terapéutico.

★ Inmunoterapia de extracto de polen de Olivo, en el que esté cuantificado Ole e 1 y Ole e 9.

7 CONCLUSIONES

1. El fenotipo clínico más frecuente en los pacientes con doble sensibilización a pólenes de ciprés y olivo ha sido la rinoconjuntivitis (97%), aunque asma en un 38%, de predominio estacional (87%), con clínica predominante durante los meses de febrero y mayo (58%).
2. Ole e 1 y Cup s 1 han sido los alérgenos principales en la mayoría de los pacientes con doble sensibilización.
3. Se han identificado alérgenos homólogos de Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11, no descritos previamente en el polen de ciprés como responsables de la reactividad cruzada en los pacientes con doble sensibilización.
4. El patrón de reconocimiento alergénico de los pacientes con doble sensibilización es heterogéneo y resulta de sensibilizaciones primarias a polen de ciprés (alérgeno marcador Cup s 1) y de olivo (alérgeno marcador Ole e 1), y de reconocimiento de alérgenos con reactividad cruzada (homólogos de Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11).
5. La presencia de IgE específica a Ole e 9 se asocia con el fenotipo clínico asma.
6. La presencia de IgE específica a Ole e 11 se asocia con clínica perenne y en febrero.
7. La presencia de IgE específica a Ole e 1 se asocia con clínica predominante en febrero y mayo.
8. En el diagnóstico molecular de los pacientes con doble sensibilización a ciprés y olivo es necesario realizar determinaciones de IgE específica a Ole e 1, Cup s 1, Ole e 9 y Ole e 11.
9. El fenotipo clínico de los pacientes monosensibilizados a polen de ciprés ha sido la rinoconjuntivitis (100%) estacional (95%) con síntomas en febrero (86%), siendo el asma poco frecuente (10%).
10. El fenotipo clínico de los pacientes monosensibilizados a polen de olivo es más grave que el de los monosensibilizados a ciprés con menor frecuencia de rinoconjuntivitis (73%), mayor frecuencia de asma (53%) estacional, y síntomas perennes en el 40%.

11. El perfil de reconocimiento de los pacientes monosensibilizados a ciprés ha sido predominantemente Cup s 1, Ole e 9 y Ole e 11.
12. El perfil de reconocimiento de los pacientes monosensibilizados a olivo ha sido predominantemente Ole e 1 y Ole e 9.

8 BIBLIOGRAFÍA

Alergológica 2005. Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades alérgicas en España en 2005. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. SEAIC. Schering-Plough. Luzán 5, SA editores.

Árboles de la Península Ibérica. https://www.arbolesibericos.es.

Aalberse, R.C. 2000, "Structural biology of allergens", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 106, no. 2, pp. 228-238.

Aalberse, R.C., Akkerdaas, J. & van Ree, R. 2001, "Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens", *Allergy,* vol. 56, no. 6, pp. 478-490.

Aceituno, E., Del Pozo, V., Minguez, A., Arrieta, I., Cortegano, I., Cardaba, B., Gallardo, S., Rojo, M., Palomino, P. & Lahoz, C. 2000, "Molecular cloning of major allergen from Cupressus arizonica pollen: Cup a 1", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 30, no. 12, pp. 1750-1758.

Afferni, C., Iacovacci, P., Barletta, B., Di Felice, G., Tinghino, R., Mari, A. & Pini, C. 1999, "Role of carbohydrate moieties in IgE binding to allergenic components of Cupressus arizonica pollen extract", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 29, no. 8, pp. 1087-1094.

Alisi, C., Afferni, C., Iacovacci, P., Barletta, B., Tinghino, R., Butteroni, C., Puggioni, E.M., Wilson, I.B., Federico, R., Schinina, M.E., Ariano, R., Di Felice, G. & Pini, C. 2001, "Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of Arizona cypress (Cupressus arizonica) pollen", *Allergy,* vol. 56, no. 10, pp. 978-984.

Alonso MD, Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Casas ML. 2003, "Estudio descriptivo de pacientes sensibilizados a ciprés y olivo", *Alergol Inmunol Clín,* vol. 18, pp. 146.

Andre, C., Dumur, J.P., Hrabina, M., Lefebvre, E. & Sicard, H. 2000, "Juniperus ashei: the gold standard of the Cuppressaceae", *Allergie et Immunologie,* vol. 32, no. 3, pp. 104-106.

Ariano, R., Canonica, G.W. & Passalacqua, G. 2010, "Possible role of climate changes in variations in pollen seasons and allergic sensitizations during 27 years", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 104, no. 3, pp. 215-222.

Ariano, R., Mistrello, G., Mincigrucci, G., Bricchi, E., Lannotti, O., Frenguelli, G., Passalacqua, G. & Panzani, R.C. 2006, "In vitro and in vivo biological activities of old and fresh Cupressus arizonica pollen", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 16, no. 3, pp. 177-182.

Ariano, R., Panzani, R.C., Chiapella, M. & Augeri, G. 1994, "Pollinosis in a Mediterranean area (Riviera Ligure, Italy): ten years of pollen counts, correlation with clinical sensitization and meteorological data", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 4, no. 2, pp. 81-86.

Ariano, R., Passalacqua, G., Panzani, R., Scordamaglia, A., Venturi, S., Zoccali, P. & Canonica, G.W. 1999, "Airborne pollens and prevalence of pollenosis in western Liguria: a 10-year study", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 9, no. 4, pp. 229-234.

Ariano, R., Spadolini, I. & Panzani, R.C. 2001, "Efficacy of sublingual specific immunotherapy in Cupressaceae allergy using an extract of Cupressus arizonica. A double blind study", *Allergologia et Immunopathologia,* vol. 29, no. 6, pp. 238-244.

Arilla, M.C., Ibarrola, I., Martinez, A. & Asturias, J.A. 2004, "Quantification assay for the major allergen of Cupressus sempervirens pollen, Cup s 1, by sandwich ELISA", *Allergologia et Immunopathologia,* vol. 32, no. 6, pp. 319-325.

Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L. & Wallner, M. 2015, "Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective", *Allergy,* vol. 70, no. 10, pp. 1201-1211.

Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gomez-Bayon, N., Martinez, J., Martinez, A. & Palacios, R. 1997, "Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 100, no. 3, pp. 365-372.

Barber, D., de la Torre, F., Feo, F., Florido, F., Guardia, P., Moreno, C., Quiralte, J., Lombardero, M., Villalba, M., Salcedo, G. & Rodriguez, R. 2008, "Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study", *Allergy,* vol. 63, no. 11, pp. 1550-1558.

Barber, D., de la Torre, F., Lombardero, M., Antepara, I., Colas, C., Davila, I., Tabar, A.I., Vidal, C., Villalba, M., Salcedo, G. & Rodriguez, R. 2009, "Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 39, no. 11, pp. 1764-1773.

Barber, D., Diaz-Perales, A., Villalba, M. & Chivato, T. 2015, "Challenges for allergy diagnosis in regions with complex pollen exposures", *Current allergy and asthma reports,* vol. 15, no. 2, pp. 7.

Barber, D., Moreno, C., Ledesma, A., Serrano, P., Galan, A., Villalba, M., Guerra, F., Lombardero, M. & Rodriguez, R. 2007, "Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 17 Suppl 1, pp. 11-16.

Barderas, R., Garcia-Selles, J., Salamanca, G., Colas, C., Barber, D., Rodriguez, R. & Villalba, M. 2007, "A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (Salsola kali) pollen", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 37, no. 7, pp. 1111-1119.

Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodriguez, R., Pauli, G. & Villalba, M. 2005, "Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 115, no. 2, pp. 351-357.

Barderas, R., Purohit, A., Rodriguez, R., Pauli, G. & Villalba, M. 2006, "Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (Fraxinus excelsior) pollen: comparison of the natural and recombinant forms", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 96, no. 4, pp. 557-563.

Barletta, B., Afferni, C., Tinghino, R., Mari, A., Di Felice, G. & Pini, C. 1996, "Cross-reactivity between Cupressus arizonica and Cupressus sempervirens pollen extracts", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 98, no. 4, pp. 797-804.

Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2004, "A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies (correction of interspecie) cross-reactivity", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950),* vol. 172, no. 6, pp. 3644-3651.

Barral, P., Suarez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alche Jde, D., Rodriguez-Garcia, M.I., Villalba, M., Rivas, G. & Rodriguez, R. 2005, "An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination", *The Biochemical journal,* vol. 390, no. Pt 1, pp. 77-84.

Batanero, E., Crespo, J.F., Monsalve, R.I., Martin-Esteban, M., Villalba, M. & Rodriguez, R. 1999, "IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 103, no. 1 Pt 1, pp. 147-153.

Batanero, E., Gonzalez De La Pena, M A, Villalba, M., Monsalve, R.I., Martin-Esteban, M. & Rodriguez, R. 1996a, "Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen", *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 26, no. 12, pp. 1401-1410.

Batanero, E., Ledesma, A., Villalba, M. & Rodriguez, R. 1997, "Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen", *FEBS letters,* vol. 410, no. 2-3, pp. 293-296.

Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R.I. & Rodriguez, R. 1996b, "Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 97, no. 6, pp. 1264-1271.

Batanero, E., Villalba, M. & Rodriguez, R. 1994, "Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety", *Molecular immunology,* vol. 31, no. 1, pp. 31-37.

Belmonte Soler, J. 2002, *Introducción. Polinosis.Polen y Alergia. Editores: Valero A, Cadahía A;* mra ediciones, S.L, laboratorios Menarini, S.L.

Bistoni, O., Emiliani, C., Agea, E., Russano, A.M., Mencarelli, S., Orlacchio, A. & Spinozzi, F. 2005, "Biochemical and immunological characterization of pollen-derived beta-galactosidase reveals a new cross-reactive class of allergens among Mediterranean trees", *International archives of allergy and immunology,* vol. 136, no. 2, pp. 123-133.

Bobolea, I., Barranco, P., Sastre, B., Fernandez-Nieto, M., del Pozo, V. & Quirce, S. 2011, "Seasonal eosinophilic bronchitis due to allergy to Cupressus arizonica pollen", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 106, no. 5, pp. 448-449.

Boluda, L., Alonso, C. & Fernandez-Caldas, E. 1998, "Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of Olea europaea", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 101, no. 2 Pt 1, pp. 210-216.

Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N.G., Bousquet, P.J., Burney, P.G., Canonica, G.W., Carlsen, K.H., Cox, L., Haahtela, T., Lodrup Carlsen, K.C., Price, D., Samolinski, B., Simons, F.E., Wickman, M., Annesi-Maesano, I., Baena-Cagnani, C.E., Bergmann, K.C., Bindslev-Jensen, C., Casale, T.B., Chiriac, A., Cruz, A.A., Dubakiene, R., Durham, S.R., Fokkens, W.J., Gerth-van-Wijk, R., Kalayci, O., Kowalski, M.L., Mari, A., Mullol, J., Nazamova-Baranova, L., O'Hehir, R.E., Ohta, K., Panzner, P., Passalacqua, G., Ring, J., Rogala, B., Romano, A., Ryan, D., Schmid-Grendelmeier, P., Todo-Bom, A., Valenta, R., Woehrl, S., Yusuf, O.M., Zuberbier, T., Demoly, P., Global Allergy and Asthma European Network & Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma 2012, "Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens", *Allergy,* vol. 67, no. 1, pp. 18-24.

Bousquet, J., Knani, J., Hejjaoui, A., Ferrando, R., Cour, P., Dhivert, H. & Michel, F.B. 1993, "Heterogeneity of atopy. I. Clinical and immunologic characteristics of patients allergic to cypress pollen", *Allergy,* vol. 48, no. 3, pp. 183-188.

Boutin-Forzano, S., Gouitaa, M., Hammou, Y., Ramadour, M. & Charpin, D. 2005, "Personal risk factors for cypress pollen allergy", *Allergy,* vol. 60, no. 4, pp. 533-535.

Brito, F.F., Gimeno, P.M., Carnes, J., Martin, R., Fernandez-Caldas, E., Lara, P., Lopez-Fidalgo, J. & Guerra, F. 2011a, "Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 106, no. 2, pp. 146-152.

Brito, F.F., Gimeno, P.M., Carnes, J., Martin, R., Fernandez-Caldas, E., Lara, P., Lopez-Fidalgo, J. & Guerra, F. 2011b, "Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 106, no. 2, pp. 146-152.

Caballero, T., Romualdo, L., Crespo, J.F., Pascual, C., Munoz-Pereira, M. & Martin-Esteban, M. 1996, "Cupressaceae pollinosis in the Madrid area", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 26, no. 2, pp. 197-201.

Caimmi, D., Raschetti, R., Pons, P., Dhivert-Donnadieu, H., Bousquet, J. & Demoly, P. 2012a, "Cross-reactivity between cypress pollen and latex assessed using skin tests", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 22, no. 7, pp. 525-526.

Caimmi, D., Raschetti, R., Pons, P., Dhivert-Donnadieu, H., Bousquet, P.J., Bousquet, J. & Demoly, P. 2012b, "Epidemiology of cypress pollen allergy in Montpellier", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 22, no. 4, pp. 280-285.

Cardaba, B., Llanes, E., Chacartegui, M., Sastre, B., Lopez, E., Molla, R., del Pozo, V., Florido, F., Quiralte, J., Palomino, P. & Lahoz, C. 2007, "Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 17 Suppl 1, pp. 31-35.

Carinanos, P., Alcazar, P., Galan, C. & Dominguez, E. 2002, "Privet pollen (Ligustrum sp.) as potential cause of pollinosis in the city of Cordoba, south-west Spain", *Allergy,* vol. 57, no. 2, pp. 92-97.

Carnes Sanchez, J., Iraola, V.M., Sastre, J., Florido, F., Boluda, L. & Fernandez-Caldas, E. 2002, "Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of Olea europaea", *Allergy,* vol. 57, no. 4, pp. 313-318.

Charpin, D., Calleja, M., Lahoz, C., Pichot, C. & Waisel, Y. 2005, "Allergy to cypress pollen", *Allergy,* vol. 60, no. 3, pp. 293-301.

Charpin, D., Calleja, M., Pichot, C., Penel, V., Hugues, B. & Poncet, P. 2013, "Cypress pollen allergy", *Revue des maladies respiratoires,* vol. 30, no. 10, pp. 868-878.

Conde Hernández, J. 2002, *Oleáceas. Polinosis. Polen y Alergia, Editores: Valero A, Cadahía A;* mra ediciones, S.L, laboratorios Menarini, S.L.

Conde Hernández, J., Conde Hernandez, P., Gonzalez Quevedo Tejerina, M T, Conde Alcaniz, M.A., Conde Alcaniz, E.M., Crespo Moreira, P. & Cabanillas Platero, M. 2002, "Antigenic and allergenic differences between 16 different cultivars of Olea europaea", *Allergy,* vol. 57 Suppl 71, pp. 60-65.

Connell, J.T. 1968, "Quantitative intranasal pollen challenge. II. Effect of daily pollen challenge, environmental pollen exposure, and placebo challenge on the nasal membrane", *The Journal of allergy,* vol. 41, no. 3, pp. 123-139.

Constantin, C., Quirce, S., Poorafshar, M., Touraev, A., Niggemann, B., Mari, A., Ebner, C., Akerstrom, H., Heberle-Bors, E., Nystrand, M. & Valenta, R. 2009, "Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis", *Allergy,* vol. 64, no. 7, pp. 1030-1037.

Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A., Lopez, E., Lombardero, M., del Pozo, V. & Lahoz, C. 2004, "Cloning and expression of a major allergen from Cupressus arizonica pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment", *Allergy,* vol. 59, no. 5, pp. 485-490.

Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cistero-Bahima, A., Crespo, J.F., Fernandez-Rivas, M., Fernandez-Sanchez, J., Florido, J.F., Ibanez, M.D., Rodriguez, R., Salcedo, G., Garcia, B.E., Lombardero, M., Quiralte, J., Rodriguez, J., Sanchez-Monge, R., Vereda, A., Villalba, M., Alonso Diaz de Durana, M D, Basagana, M., Carrillo, T., Fernandez-Nieto, M. & Tabar, A.I. 2010, "Differences among pollen-allergic patients with and without plant food

allergy", *International archives of allergy and immunology,* vol. 153, no. 2, pp. 182-192.

D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T. & van Cauwenberge, P. 2007, "Allergenic pollen and pollen allergy in Europe", *Allergy,* vol. 62, no. 9, pp. 976-990.

D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M. & Liccardi, G. 2010, "Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 20, no. 2, pp. 102; quiz following 102.

Delgado, J., Davila, I.D., Dominguez-Ortega, J., Quirce, S., Marti-Guadano, E. & Valero, A. 2013, "Quality of life in patients with respiratory allergy is influenced by the causative allergen", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 23, no. 5, pp. 309-314.

Demoly, P., Passalacqua, G., Pfaar, O., Sastre, J. & Wahn, U. 2016, "Management of the polyallergic patient with allergy immunotherapy: a practice-based approach", *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology,* vol. 12, pp. 6. eCollection 2016.

Di Felice, G., Barletta, B., Tinghino, R. & Pini, C. 2001, "Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens", *International archives of allergy and immunology,* vol. 125, no. 4, pp. 280-289.

Di Felice, G., Caiaffa, M.F., Bariletto, G., Afferni, C., Di Paola, R., Mari, A., Palumbo, S., Tinghino, R., Sallusto, F. & Tursi, A. 1994, "Allergens of Arizona cypress (Cupressus arizonica) pollen: characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 94, no. 3 Pt 1, pp. 547-555.

Diaz de la Guardia, C, Alba, F., de Linares, C., Nieto-Lugilde, D. & Lopez Caballero, J. 2006, "Aerobiological and allergenic analysis of cupressaceae

pollen in Granada (Southern Spain)", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 16, no. 1, pp. 24-33.

Dominguez-Ortega, J., Lopez-Matas, M.A., Alonso, M.D., Feliu, A., Ruiz-Hornillos, J., Gonzalez, E., Moya, R. & Carnés, J. 2016, "Prevalence of allergic sensitization to conifer pollen in a high cypress exposure area", *Allergy & Rhinology,* vol. 7, no. 4, pp. 200-206.

F Guerra, J C Daza, R Miguel, C Moreno, C Galán, E Domínguez & P Sánchez Guijo 1996, "Sensitivity to Cupressus: allergenic significance in Córdoba (Spain)", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 6, no. 2, pp. 117-120.

Feo Brito, F. 2003, "Aerobiología y polinosis por Oleáceas", *Alergol e Inmunol Clín,* vol. 18, no. 3, pp. 19-23.

Fernandez-Caldas, E., Carnes, J., Iraola, V. & Casanovas, M. 2007, "Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of Olea europaea pollen collected during 5 consecutive years", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 98, no. 5, pp. 464-470.

Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N. & Mari, A. 2004, "Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic", *Allergy,* vol. 59, no. 3, pp. 243-267.

Florido, J.F., Delgado, P.G., de San Pedro, B S, Quiralte, J., de Saavedra, J.M., Peralta, V. & Valenzuela, L.R. 1999, "High levels of Olea europaea pollen and relation with clinical findings", *International archives of allergy and immunology,* vol. 119, no. 2, pp. 133-137.

Ford, S.A., Baldo, B.A., Panzani, R. & Bass, D. 1991, "Cypress (Cupressus sempervirens) pollen allergens: identification by protein blotting and improved detection of specific IgE antibodies", *International archives of allergy and applied immunology,* vol. 95, no. 2-3, pp. 178-183.

Galan, C., Alcazar, P., Oteros, J., Garcia-Mozo, H., Aira, M.J., Belmonte, J., Diaz de la Guardia, C, Fernandez-Gonzalez, D., Gutierrez-Bustillo, M., Moreno-Grau, S., Perez-Badia, R., Rodriguez-Rajo, J., Ruiz-Valenzuela, L., Tormo, R., Trigo, M.M. & Dominguez-Vilches, E. 2016, "Airborne pollen trends in the Iberian Peninsula", *The Science of the total environment,* vol. 550, pp. 53-59.

Galan, C., Antunes, C., Brandao, R., Torres, C., Garcia-Mozo, H., Caeiro, E., Ferro, R., Prank, M., Sofiev, M., Albertini, R., Berger, U., Cecchi, L., Celenk, S., Grewling, L., Jackowiak, B., Jager, S., Kennedy, R., Rantio-Lehtimaki, A., Reese, G., Sauliene, I., Smith, M., Thibaudon, M., Weber, B., Weichenmeier, I., Pusch, G., Buters, J.T. & HIALINE working group 2013, "Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1", *Allergy,* vol. 68, no. 6, pp. 809-812.

Gonzalez, E.M., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2000, "Allergenic cross-reactivity of olive pollen", *Allergy,* vol. 55, no. 7, pp. 658-663.

Guerra, F., Galan Carmen, C., Daza, J.C., Miguel, R., Moreno, C., Gonzalez, J. & Dominguez, E. 1995, "Study of sensitivity to the pollen of Fraxinus spp. (Oleaceae) in Cordoba, Spain", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 5, no. 3, pp. 166-170.

Gutiérrez Bustillo, M., Sabariego, S. & Cervigón, P. 2006, vol 27, "Calendario polínico de Madrid (Ciudad Universitaria). Periodo 1994-2004. Lazaroa no. 27, pp 21-27.

Hausen, B.M. & Rothenborg, H.W. 1981, "Allergic contact dermatitis caused by olive wood jewelry", *Archives of Dermatology,* vol. 117, no. 11, pp. 732-734.

Hrabina, M., Dumur, J.P., Sicard, H., Viatte, A. & Andre, C. 2003, "Diagnosis of cypress pollen allergy: in vivo and in vitro standardization of a Juniperus ashei pollen extract", *Allergy,* vol. 58, no. 8, pp. 808-813.

Huecas, S., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2001, "Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid

sequence, and tissue specificity", *The Journal of biological chemistry,* vol. 276, no. 30, pp. 27959-27966.

Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G., Pini, C. & Mari, A. 1998, "Juniperus oxycedrus: a new allergenic pollen from the Cupressaceae family", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 101, no. 6 Pt 1, pp. 755-761.

Iacovacci, P., Afferni, C., Butteroni, C., Pironi, L., Puggioni, E.M., Orlandi, A., Barletta, B., Tinghino, R., Ariano, R., Panzani, R.C., Di Felice, G. & Pini, C. 2002, "Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 32, no. 11, pp. 1620-1627.

Jensen-Jarolim, E. & Untersmayr, E. 2008, "Gender-medicine aspects in allergology", *Allergy,* vol. 63, no. 5, pp. 610-615.

Jimenez-Lopez, J.C., Kotchoni, S.O., Hernandez-Soriano, M.C., Gachomo, E.W. & Alche, J.D. 2013, "Structural functionality, catalytic mechanism modeling and molecular allergenicity of phenylcoumaran benzylic ether reductase, an olive pollen (Ole e 12) allergen", *Journal of computer-aided molecular design,* vol. 27, no. 10, pp. 873-895.

King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A. & Thomas, W. 1994, "Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee", *International archives of allergy and immunology,* vol. 105, no. 3, pp. 224-233.

Kirmaz, C., Yuksel, H., Bayrak, P. & Yilmaz, O. 2005, "Symptoms of the olive pollen allergy: do they really occur only in the pollination season?", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 15, no. 2, pp. 140-145.

Laemmli, U.K. 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature,* vol. 227, no. 5259, pp. 680-685.

Ledesma, A., Barderas, R., Westritschnig, K., Quiralte, J., Pascual, C.Y., Valenta, R., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2006, "A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen", *Allergy,* vol. 61, no. 4, pp. 477-484.

Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E. & Rodriguez, R. 1998, "Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca2+-binding proteins (polcalcins) involved in allergy", *European journal of biochemistry / FEBS,* vol. 258, no. 2, pp. 454-459.

Ledesma, A., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2000, "Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca(2+)-binding protein from olive pollen with allergenic activity", *FEBS letters,* vol. 466, no. 1, pp. 192-196.

Liccardi, G., D'Amato, M. & D'Amato, G. 1996, "Oleaceae pollinosis: a review", *International archives of allergy and immunology,* vol. 111, no. 3, pp. 210-217.

Liccardi, G., Kordash, T.R., Russo, M., Noschese, P., Califano, C., D'Amato, M. & D'Amato, G. 1996, "Why are nasal and bronchial symptoms mostly perennial in patients with monosensitization to Olea europaea pollen allergens?", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 6, no. 6, pp. 371-377.

Liccardi, G., Russo, M., Piccolo, A., Lobefalo, G., Salzillo, A., D'Amato, M. & D'Amato, G. 1997, "The perennial pattern of clinical symptoms in children monosensitized to Olea europaea pollen allergens in comparison with subjects with Parietaria and Gramineae pollinosis", *Allergy and Asthma Proceedings : The Official Journal of Regional and State Allergy Societies,* vol. 18, no. 2, pp. 99-105.

Lombardero, M., Obispo, T., Calabozo, B., Lezaun, A., Polo, F. & Barber, D. 2002, "Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins", *Allergy,* vol. 57 Suppl 71, pp. 29-34.

López González, G.A. 2006a, *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Tomo I (2a. ed.),* Mundi-Prensa, Madrid.

López González, G.A. 2006b, *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Tomo II (2a. ed.),* Mundi-Prensa, Madrid.

López Serrano, C. 1994, "Sensibilización a *Olea europaea* ¿una polinosis peculiar?", *Rev Esp Alergol Inmunol Clin,* vol. 9 (2), pp. 18-22.

Luengo, O. 2002, *Cupresáceas. Polinosis. Polen y Alergia, Editores: Valero A, Cadahía A;* mra ediciones, S.L, laboratorios Menarini, S.L.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *The Journal of biological chemistry,* vol. 193, no. 1, pp. 265-275.

Malmkvist Padoan, S., Pettersson, A. & Svensson, A. 1990, "Olive oil as a cause of contact allergy in patients with venous eczema, and occupationally", *Contact dermatitis,* vol. 23, no. 2, pp. 73-76.

Mari, A., Di Felice, G., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R. & Pini, C. 1997, "Cypress allergy: an underestimated pollinosis", *Allergy,* vol. 52, no. 3, pp. 355-356.

Mari, A., Di Felice, G., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Sallusto, F. & Pini, C. 1996, "Assessment of skin prick test and serum specific IgE detection in the diagnosis of Cupressaceae pollinosis", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 98, no. 1, pp. 21-31.

Mari, A., Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G. & Pini, C. 1999, "Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 103, no. 6, pp. 1005-1011.

Martinez, A., Asturias, J.A., Monteseirin, J., Moreno, V., Garcia-Cubillana, A., Hernandez, M., de la Calle, A., Sanchez-Hernandez, C., Perez-Formoso, J.L.

& Conde, J. 2002, "The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from Olea europaea pollen", *Allergy,* vol. 57 Suppl 71, pp. 17-23.

Matricardi, P.M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H.J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Aalberse, R.C., Agache, I., Asero, R., Ballmer-Weber, B., Barber, D., Beyer, K., Biedermann, T., Bilo, M.B., Blank, S., Bohle, B., Bosshard, P.P., Breiteneder, H., Brough, H.A., Caraballo, L., Caubet, J.C., Crameri, R., Davies, J.M., Douladiris, N., Ebisawa, M., Elgenmann, P.A., Fernandez-Rivas, M., Ferreira, F., Gadermaier, G., Glatz, M., Hamilton, R.G., Hawranek, T., Hellings, P., Hoffmann-Sommergruber, K., Jakob, T., Jappe, U., Jutel, M., Kamath, S.D., Knol, E.F., Korosec, P., Kuehn, A., Lack, G., Lopata, A.L., Makela, M., Morisset, M., Niederberger, V., Nowak-Wegrzyn, A.H., Papadopoulos, N.G., Pastorello, E.A., Pauli, G., Platts-Mills, T., Posa, D., Poulsen, L.K., Raulf, M., Sastre, J., Scala, E., Schmid, J.M., Schmid-Grendelmeier, P., van Hage, M., van Ree, R., Vieths, S., Weber, R., Wickman, M., Muraro, A. & Ollert, M. 2016, "EAACI Molecular Allergology User's Guide", *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology,* vol. 27 Suppl 23, pp. 1-250.

Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R.M., Kurosky, A., Goetz, D.W. & Brooks, E.G. 1999, "Isolation and characterization of the mountain cedar (Juniperus ashei) pollen major allergen, Jun a 1", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 104, no. 3 Pt 1, pp. 608-612.

Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R.M., Kurosky, A., Wood, T.G. & Brooks, E.G. 2000, "Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (Juniperus ashei) pollen", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950),* vol. 164, no. 4, pp. 2188-2192.

Monsalve IR, Polo F, Barber D, Villalba M, Rodríguez R. 2003, "Pruebas de expresión del alergeno mayoritario de *Cupressus sempervirens,* Cup s 1", *Alergol Inmunol Clín,* vol. 18, no. 3, pp. 163.

Moral de Gregorio, A. 2003, "Aerobiología y polinosis por Cupresáceas en España", *Alergol Inmunol Clín,* vol. 18, no. 3, pp. 25-34.

Moral de Gregorio, A. 2016, "Familia *Oleaceae. Manual de Alergopalinología. Plantas, pólenes y proteínas.* Ed Moral de Gregorio, Senent Sánchez 1ª ed. Toledo.

Moreno, C., Justicia, J.L., Quiralte, J., Moreno-Ancillo, A., Iglesias-Cadarso, A., Torrecillas, M., Labarta, N., Garcia, M.A. & Davila, I. 2014, "Olive, grass or both? Molecular diagnosis for the allergen immunotherapy selection in polysensitized pollinic patients", *Allergy,* vol. 69, no. 10, pp. 1357-1363.

Navarro A, Colas C, Antón E y col 2009, "Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica-2005", *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology,* vol. 19 (2), pp. 7-13.

Obispo, T.M., Melero, J.A., Carpizo, J.A., Carreira, J. & Lombardero, M. 1993, "The main allergen of Olea europaea (Ole e I) is also present in other species of the Oleaceae family", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 23, no. 4, pp. 311-316.

Ohtsuki, T., Taniguchi, Y., Kohno, K., Fukuda, S., Usui, M. & Kurimoto, M. 1995, "Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity", *Allergy,* vol. 50, no. 6, pp. 483-488.

Pablos, I., Wildner, S., Asam, C., Wallner, M. & Gadermaier, G. 2016, "Pollen Allergens for Molecular Diagnosis", *Current allergy and asthma reports,* vol. 16, no. 4, pp. z.

Palacin, A., Gomez-Casado, C., Rivas, L.A., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., Blanco, C., Carrillo, T., Cuesta-Herranz, J., de Frutos, C., Alvarez-Eire, G.G., Fernandez, F.J., Gamboa, P., Munoz, R., Sanchez-Monge, R., Sirvent, S., Torres, M.J., Varela-Losada, S., Rodriguez, R., Parro, V., Blanca, M., Salcedo, G. & Diaz-Perales, A. 2012a, "Graph based study of allergen cross-reactivity of

plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study", *PloS one,* vol. 7, no. 12, pp. e50799.

Palacin, A., Rivas, L.A., Gomez-Casado, C., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., Blanco, C., Carrillo, T., Cuesta-Herranz, J., Bonny, J.A., Flores, E., Garcia-Alvarez-Eire, M.G., Garcia-Nunez, I., Fernandez, F.J., Gamboa, P., Munoz, R., Sanchez-Monge, R., Torres, M., Losada, S.V., Villalba, M., Vega, F., Parro, V., Blanca, M., Salcedo, G. & Diaz-Perales, A. 2012b, "The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray", *PloS one,* vol. 7, no. 9, pp. e44088.

Palomares, O., Alcantara, M., Quiralte, J., Villalba, M., Garzon, F. & Rodriguez, R. 2008a, "Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker", *The New England journal of medicine,* vol. 358, no. 12, pp. 1306-1308.

Palomares, O., Fernandez-Nieto, M., Villalba, M., Rodriguez, R. & Cuesta-Herranz, J. 2008b, "Occupational allergy in a researcher due to Ole e 9, an allergenic 1,3-beta-glucanase from olive pollen", *Allergy,* vol. 63, no. 6, pp. 784-785.

Palomares, O., Swoboda, I., Villalba, M., Balic, N., Spitzauer, S., Rodriguez, R. & Valenta, R. 2006, "The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae", *International archives of allergy and immunology,* vol. 141, no. 2, pp. 110-118.

Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F. & Rodriguez, R. 2005, "1,3-Beta-Glucanases as Candidates in Latex-Pollen-Vegetable Food Cross-Reactivity", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 35, no. 3, pp. 345-351.

Palomares, O., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2003, "The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (Olea europaea) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in Pichia pastoris and characterization", *The Biochemical journal,* vol. 369, no. Pt 3, pp. 593-601.

Pereira, C., Valero, A., Loureiro, C., Davila, I., Martinez-Cocera, C., Murio, C., Rico, P. & Palomino, R. 2006, "Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis", *European annals of allergy and clinical immunology,* vol. 38, no. 6, pp. 186-194.

Pham, N.H., Baldo, B.A. & Bass, D.J. 1994, "Cypress pollen allergy. Identification of allergens and crossreactivity between divergent species", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 24, no. 6, pp. 558-565.

Pichler, U., Hauser, M., Wolf, M., Bernardi, M.L., Gadermaier, G., Weiss, R., Ebner, C., Yokoi, H., Takai, T., Didierlaurent, A., Rafaiani, C., Briza, P., Mari, A., Behrendt, H., Wallner, M. & Ferreira, F. 2015, "Pectate lyase pollen allergens: sensitization profiles and cross-reactivity pattern", *PloS one,* vol. 10, no. 5, pp. e0120038.

Pico de Coana, Y., Parody, N., Fuertes, M.A., Carnes, J., Roncarolo, D., Ariano, R., Sastre, J., Mistrello, G. & Alonso, C. 2010, "Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from Cupressus arizonica", *Biochemical and biophysical research communications,* vol. 401, no. 3, pp. 451-457.

Pola J, Subiza FJ, García JM y col. 2015, *Pólenes de interés en Alergología en nuestro medio. Tratado de Alergología. Tomo I; Editores: Dávila I, Jaúregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM;* 2ª edn, Ergon.

Quiralte, J., Florido, F., Arias de Saavedra, J M, Gomez, A., Saenz de San Pedro, B, Gonzalez, E. & Rodriguez, R. 2002, "Olive allergen-specific IgE responses in patients with Olea europaea pollinosis", *Allergy,* vol. 57 Suppl 71, pp. 47-52.

Quiralte, J., Palacios, L., Rodriguez, R., Cardaba, B., Arias de Saavedra, J M, Villalba, M., Florido, J.F. & Lahoz, C. 2007, "Modelling diseases: the allergens of Olea europaea pollen", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 17 Suppl 1, pp. 24-30.

Quirce, S. 2009, "Asthma in Alergologica-2005", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 19 Suppl 2, pp. 14-20.

Radauer, C. & Breiteneder, H. 2006, "Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 117, no. 1, pp. 141-147.

Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R.E., Larsen, J.N., Lidholm, J., Pomes, A., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Thomas, W.R. & Breiteneder, H. 2014, "Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences", *Allergy,* vol. 69, no. 4, pp. 413-419.

Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Gonzalez, E.M., Monsalve, R.I., Huecas, S., Tejera, M.L. & Ledesma, A. 2002, "Allergenic diversity of the olive pollen", *Allergy,* vol. 57 Suppl 71, pp. 6-16.

Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Salamanca, G., Sirvent, S., Castro, L. & Prado, N. 2007, "Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 17 Suppl 1, pp. 4-10.

Salamanca, G., Rodriguez, R., Quiralte, J., Moreno, C., Pascual, C.Y., Barber, D. & Villalba, M. 2010, "Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree", *The FEBS journal,* vol. 277, no. 13, pp. 2729-2739.

Sanchez-Lopez, J., Asturias, J.A., Enrique, E., Suarez-Cervera, M. & Bartra, J. 2011, "Cupressus arizonica pollen: a new pollen involved in the lipid transfer protein syndrome?", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 21, no. 7, pp. 522-526.

Sanz Larruga ML, García Figueroa B, Labrador Horrillo M, Martínez Quesada J 2015, *Técnicas de diagnóstico in vitro. Tratado de Alergología. Tomo I; Editores: Dávila I, Jaúregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM;* 2ª edn, Ergon.

Sastre, J. 2013, "Molecular diagnosis and immunotherapy", *Current opinion in allergy and clinical immunology,* vol. 13, no. 6, pp. 646-650.

Sastre, J. 2010, "Molecular diagnosis in allergy", *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 40, no. 10, pp. 1442-1460.

Sastre, J., Landivar, M.E., Ruiz-Garcia, M., Andregnette-Rosigno, M.V. & Mahillo, I. 2012, "How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area", *Allergy,* vol. 67, no. 5, pp. 709-711.

Sastre, J. & Sastre-Ibanez, M. 2016, "Molecular diagnosis and immunotherapy", *Current opinion in allergy and clinical immunology,* vol. 16, no. 6, pp. 565-570.

Scala, E., Abeni, D., Pomponi, D., Paganelli, R., Locanto, M., Giani, M., Cecchi, L. & Asero, R. 2016, "Ole e 1, Ole e 7, and Ole e 9: Identifying distinct clinical subsets of olive tree-allergic patients", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 137, no. 2, pp. 631.e3.

Scala, E., Alessandri, C., Bernardi, M.L., Ferrara, R., Palazzo, P., Pomponi, D., Quaratino, D., Rasi, C., Zaffiro, A., Zennaro, D. & Mari, A. 2010, "Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system", *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 40, no. 6, pp. 911-921.

Schwietz, L.A., Goetz, D.W., Whisman, B.A. & Reid, M.J. 2000, "Cross-reactivity among conifer pollens", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 84, no. 1, pp. 87-93.

Shahali, Y., Brazdova, A., Calleja, M., Charpin, D., Senechal, H. & Poncet, P. 2013, "Indoor, long-term persistence of cypress pollen allergenic potency: a 10-month study", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 111, no. 5, pp. 428-430.

Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Mari, A. & Majd, A. 2009, "Immunoglobulin E reactivity to Arizona cypress pollen extracts: evidence for a 35-kDa allergen", *Allergy,* vol. 64, no. 11, pp. 1687-1688.

Shahali, Y., Sutra, J.P., Fasoli, E., D'Amato, A., Righetti, P.G., Futamura, N., Boschetti, E., Senechal, H. & Poncet, P. 2012a, "Allergomic study of cypress pollen via combinatorial peptide ligand libraries", *Journal of proteomics,* vol. 77, pp. 101-110.

Shahali, Y., Sutra, J.P., Haddad, I., Vinh, J., Guilloux, L., Peltre, G., Senechal, H. & Poncet, P. 2012b, "Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis", *Electrophoresis,* vol. 33, no. 3, pp. 462-469.

Shahali, Y., Sutra, J.P., Peltre, G., Charpin, D., Senechal, H. & Poncet, P. 2010, "IgE Reactivity to Common Cypress (C. sempervirens) Pollen Extracts: Evidence for Novel Allergens", *The World Allergy Organization journal,* vol. 3, no. 8, pp. 229-234.

Sirvent, S., Tordesillas, L., Villalba, M., Diaz-Perales, A., Cuesta-Herranz, J., Salcedo, G. & Rodriguez, R. 2011, "Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity", *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology,* vol. 106, no. 5, pp. 429-435.

Smith, M., Jager, S., Berger, U., Sikoparija, B., Hallsdottir, M., Sauliene, I., Bergmann, K.C., Pashley, C.H., de Weger, L., Majkowska-Wojciechowska, B., Rybnicek, O., Thibaudon, M., Gehrig, R., Bonini, M., Yankova, R., Damialis, A., Vokou, D., Gutierrez Bustillo, A.M., Hoffmann-Sommergruber, K. & van Ree, R. 2014, "Geographic and temporal variations in pollen exposure across Europe", *Allergy,* vol. 69, no. 7, pp. 913-923.

Solomon, W.R. 2002, "Airborne pollen: a brief life", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 109, no. 6, pp. 895-900.

Sposato, B. 2013, "Cypress-sensitized asymptomatic patients during the pollen season:sensitization or simply cross-reactivity?", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 23, no. 1, pp. 74-75.

Sposato, B., Liccardi, G., Russo, M., Folletti, I., Siracusa, A., Scichilone, N., Ventura, M.T., Rolla, G., Raie, A., Milanese, M., Pio, R., Pio, A., Scala, R., Pareo, C., Micucci, C., Micheletto, C., Billeri, L., Musarra, A., Cavaliere, C., Agolli, G., Masieri, S., Scalese, M. & Capitani, D. 2014, "Cypress pollen: an unexpected major sensitizing agent in different regions of Italy", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 24, no. 1, pp. 23-28.

Sposato, B. & Scalese, M. 2013, "Prevalence and real clinical impact of Cupressus sempervirens and Juniperus communis sensitisations in Tuscan "Maremma", Italy", *Allergologia et Immunopathologia,* vol. 41, no. 1, pp. 17-24.

Stemeseder, T., Freier, R., Wildner, S., Fuchs, J.E., Briza, P., Lang, R., Batanero, E., Lidholm, J., Liedl, K.R., Campo, P., Hawranek, T., Villalba, M., Brandstetter, H., Ferreira, F. & Gadermaier, G. 2016, "Crystal structure of Pla l 1 reveals both structural similarity and allergenic divergence within the Ole e 1-like protein family", *The Journal of allergy and clinical immunology,* .

Subiza J. 1998, "Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas", *Rev Esp Alergol Inmunol Clin,* vol. 2, pp. 45-58.

Subiza J, GAvilan J y col 1998, "¿Cuáles son los pólenes que producen polinosis epidémica en el medio urbano de Madrid?", *Rev esp Alergol Inmunol Clin,* vol. 13 (2), pp. 107-119.

Subiza, J., Jerez, M., Jimenez, J.A., Narganes, M.J., Cabrera, M., Varela, S. & Subiza, E. 1995, "Allergenic pollen pollinosis in Madrid", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 96, no. 1, pp. 15-23.

Swoboda, I., Twaroch, T., Valenta, R. & Grote, M. 2008, "Tree pollen allergens", *Clinical allergy and immunology,* vol. 21, pp. 87-105.

Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E. & Rodriguez, R. 1999, "Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 104, no. 4 Pt 1, pp. 797-802.

Tinghino, R., Barletta, B., Palumbo, S., Afferni, C., Iacovacci, P., Mari, A., Di Felice, G. & Pini, C. 1998, "Molecular characterization of a cross-reactive Juniperus oxycedrus pollen allergen, Jun o 2: a novel calcium-binding allergen", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 101, no. 6 Pt 1, pp. 772-777.

Tordesillas, L., Sirvent, S., Diaz-Perales, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J., Rodriguez, R. & Salcedo, G. 2011, "Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen", *International archives of allergy and immunology,* vol. 156, no. 3, pp. 291-296.

Torres, M., Alvarez-Garcia, E., Bartra, J., Alcantara, M., Palomares, O., Villalba, M. & Rodriguez, R. 2014, "The allergenic structure of the thaumatin-like protein Ole e 13 is degraded by processing of raw olive fruits", *Journal of investigational allergology & clinical immunology,* vol. 24, no. 3, pp. 162-168.

Torres, M., Palomares, O., Quiralte, J., Pauli, G., Rodriguez, R. & Villalba, M. 2015, "An Enzymatically Active beta-1,3-Glucanase from Ash Pollen with Allergenic Properties: A Particular Member in the Oleaceae Family", *PloS one,* vol. 10, no. 7, pp. e0133066.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol. 76, no. 9, pp. 4350-4354.

Trevino, M.A., Palomares, O., Castrillo, I., Villalba, M., Rodriguez, R., Rico, M., Santoro, J. & Bruix, M. 2008, "Solution structure of the C-terminal domain of

Ole e 9, a major allergen of olive pollen", *Protein science: a publication of the Protein Society,* vol. 17, no. 2, pp. 371-376.

Vara, A., Fernandez-Gonzalez, M., Aira, M.J. & Rodriguez-Rajo, F.J. 2016, "Oleaceae cross-reactions as potential pollinosis cause in urban areas", *The Science of the total environment,* vol. 542, no. Pt A, pp. 435-440.

Vidal, C., Enrique, E., Gonzalo, A., Moreno, C., Tabar, A.I. & Expert Clinical Participants 2014, "Diagnosis and allergen immunotherapy treatment of polysensitised patients with respiratory allergy in Spain: an Allergists' Consensus", *Clinical and translational allergy,* vol. 4, pp. 36. eCollection 2014.

Villalba Díaz M, Barber Hernández D, Pomés A 2015, *Alérgenos. Tratado de Alergología. Tomo I; Editores: Dávila I, Jaúregui I, Olaguibel JM, Zubeldia JM;* 2ª edn, Ergon.

Villalba, M., Batanero, E., Lopez-Otin, C., Sanchez, L.M., Monsalve, R.I., Gonzalez de la Pena, M A, Lahoz, C. & Rodriguez, R. 1993, "The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (Olea europaea) pollen", *European journal of biochemistry,* vol. 216, no. 3, pp. 863-869.

Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., Gonzalez de la Pena, M A, Lahoz, C. & Rodriguez, R. 1994, "Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity", *The Journal of biological chemistry,* vol. 269, no. 21, pp. 15217-15222.

Villalba, M., Rodriguez, R. & Batanero, E. 2014, "The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment", *Methods (San Diego, Calif.),* vol. 66, no. 1, pp. 44-54.

Wagner, S., Radauer, C., Hafner, C., Fuchs, H., Jensen-Jarolim, E., Wuthrich, B., Scheiner, O. & Breiteneder, H. 2004, "Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome", *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* vol. 34, no. 11, pp. 1739-1746.

Weber, K. & Osborn, M. 1969, "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis", *The Journal of biological chemistry,* vol. 244, no. 16, pp. 4406-4412.

Weber, R.W. 2003, "Patterns of pollen cross-allergenicity", *The Journal of allergy and clinical immunology,* vol. 112, no. 2, pp. 39; quiz 240.

Yokoyama, M., Miyahara, M., Shimizu, K., Kino, K. & Tsunoo, H. 2000, "Purification, identification, and cDNA cloning of Jun a 2, the second major allergen of mountain cedar pollen", *Biochemical and biophysical research communications,* vol. 275, no. 1, pp. 195-202.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Muestras biológicas historicas

Hospital Universitario Fundación Alcorcón
SaludMadrid

Comunidad de Madrid

DE: COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HUFA

A: Dra. María Dolores Alonso Díaz de Durana (Servicio de Alergia del HUFA)

Estimada Dra. Alonso,

Le informamos que en la reunión ordinaria del 30 de marzo de 2011 se evaluó y aprobó su consulta sobre "Procedimiento para la obtención del Consentimiento Informado para la utilización de muestras biológicas históricas"

Tras su consulta escrita, en dicha reunión se consideró adecuado el Procedimiento para la obtención del Consentimiento Informado.

Fdo: Dra. María Velasco Arribas
Secretaría del CEIC
Hospital Universitario Fundación Alcorcón

C/ Budapest nº 1
28922 Alcorcón (Madrid)
Tel.: 916 219 400
Fax: 916 219 901
www.fhalcorcon.es

Anexo 2 – Consentimiento Informado

Estimado paciente:

Con la presente carta, le invitamos a participar en proyecto titulado "ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO DE ALERGIA A POLEN DE CUPRESÁCEAS Y OLIVO", cuyo investigador principal es la Dra. Mª Dolores Alonso Díaz de Durana, de la Unidad de Alergia en el Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid (HUFA).

Usted/su hijo ha sido seleccionado por presentar síntomas respiratorios (rinoconjuntivitis y/o asma) estacionales o perennes, diagnosticados mediante prueba cutánea de alergia al polen de ciprés y olivo, además de un análisis de sangre, ya realizado.

Esta muestra de sangre va a ser utilizada en el laboratorio para analizar la posible reactividad cruzada inmunológica entre el polen de ciprés y el polen del olivo, dos especies filogenéticamente diferentes, con la finalidad de conocer mejor los alérgenos (proteínas causantes de los síntomas alérgicos) para ayuda al diagnóstico y tratamiento de su alergia al polen.

Durante la investigación serán aplicados los principios establecidos por la *LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.*

Las muestras de sangre se utilizarán únicamente para los fines de este estudio.

Las muestras estarán codificadas de forma que la identidad del paciente no será accesible para los investigadores.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los datos referentes a su participación en el estudio se almacenarán y analizarán, sin mención expresa de sus datos personales de acuerdo con la legislación vigente (Ley 15/1999 de Protección de datos de carácter personal y su reglamento de desarrollo).

Se garantizará la confidencialidad de los datos que se obtengan y el anonimato de los pacientes, con acceso único por los investigadores participantes en el estudio. No obstante, los datos podrán ser facilitados al paciente y a los médicos que lo traten si son requeridos para facilitar una mejor evaluación y tratamiento del caso.

En algunos casos será necesaria la recogida adicional de datos contenidos en su historia clínica para realizar los estudios pertinentes. En esta situación, se seguirá la misma política de confidencialidad.

Los datos resultantes de este estudio serán publicados o expuestos en congresos y reuniones científicas, garantizándose la confidencialidad de los datos personales.

El paciente tendrá derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud y la facultad de tomar una posición en relación con su comunicación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, deberá manifestarlo por escrito y remitir a la Unidad de Alergia. Su negativa a no participar en ningún modo afectará a la asistencia que se le presta. Usted rechazar el estudio en cualquier momento, lo que deberá comunicar por escrito a la Dra. Alonso a la dirección abajo indicada. A partir de ese momento no se utilizarán los datos obtenidos en la investigación.

PERSONAS Y DIRECCIONES DE CONTACTO

La Dra. Mª Dolores Alonso Díaz de Durana, de la Unidad de Alergia del Hospital Universitario Fundación Alcorcón, es la investigadora responsable de este estudio en el centro.

Los investigadores participantes en este estudio no reciben ninguna compensación económica por su participación en el mismo.

Envío de correspondencia: A la atención de Dra. Mª Dolores Alonso. Unidad de Alergia. Hospital Universitario Fundación Alcorcón. C/ Budapest 1. 28922 Alcorcón (Madrid).

Les saluda atentamente.

Dra. Mª Dolores Alonso Díaz de Durana

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

“ESTUDIO CLINICO E INMUNOLOGICO DE ALERGIA A POLEN DE CUPRESACEAS Y OLIVO”,

Nombre del paciente:

Documento Nacional de Identidad:

Fecha:

DECLARACION Y FIRMA

Declaro que:

- He recibido información clara y a mi plena satisfacción sobre el proyecto en el que decido libremente participar y sobre cómo se mantendrá la confidencialidad. Sé que el estudio se realiza con fines de investigación y que soy libre de retirar este consentimiento en cualquier momento sin repercusión alguna sobre mi tratamiento.
- En consecuencia:

a) Autorizo a la utilización de la muestra biológica para la investigación que se me propone

b) No autorizo a la utilización de la muestra biológica para la investigación que se me propone.

c) Solicito la destrucción de la muestra biológica

Firma del paciente

Anexo 3 – Certificado Ingestigador Principal

seaic
fundación

LA FUNDACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA (SEAIC) acredita que la **DRA. MARÍA DOLORES ALONSO DÍAZ DE DURANA** ha sido beneficiaria de las Ayudas para el Fomento de la Investigación, como investigadora principal del proyecto titulado:

ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO DE ALERGIA A POLEN DE CUPRESÁCEAS Y OLIVO, concedida en la convocatoria del año 2005 por un período de 2 años

En Madrid a 29 de marzo de 2017

Dr. José Manuel Zubeldia Ortuño
Secretario Fundación de la SEAIC

Dr. Joaquín Sastre Domínguez
Presidente SEAIC y Fundación de la SEAIC

Fundación de la sociedad española de alergología e inmunología clínica
Secretaría Técnica • C/ Comandante Zorita, 13 oficinas 101-102 • 28020 Madrid
Tel. +34 915 348 826 • Fax: +34 915 357 114 • seaic@seaic.org