

Beatriz Rojas Hijazo

Alergoides frente a extractos
convencionales en inmunoterapia
con polen de Salsola kali: estudio
comparativo de eficacia y
seguridad

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Colás Sanz, Carlos
Sebastián Ariño, Antonio

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



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ALERGOIDES FRENTE A
EXTRACTOS CONVENCIONALES EN
INMUNOTERAPIA CON POLEN DE
SALSOLA KALI: ESTUDIO
COMPARATIVO DE EFICACIA Y
SEGURIDAD**

Autor

Beatriz Rojas Hijazo

Director/es

Colás Sanz, Carlos

Sebastián Ariño, Antonio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2008



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

***Alergoides frente a extractos convencionales
en inmunoterapia con polen de Salsola kali:
estudio comparativo de eficacia y seguridad***

Beatriz Rojas Hijazo

TESIS DE DOCTORADO

Directores: Dr. Carlos Colás Sanz

Dr. Antonio Sebastián Ariño

Zaragoza, 2008

A mis padres y abuelos
A mi hermano Kike
A Félix

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Carlos Colás Sanz y Antonio Sebastián Ariño, directores de esta Tesis

A la Universidad de Zaragoza y al Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”

Al Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”

Al departamento médico de C.B.F. LETI S.A., especialmente a Miguel Casanovas y Ruth Martín

A los pacientes que participaron en el estudio

A mi gente, por su paciencia, apoyo y comprensión

ABREVIATURAS

E.A.A.C.I.....	Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica
ELISA.....	Enzimoimmunoensayo
FEM.....	Flujo espiratorio máximo (En inglés: PEF)
FEV1.....	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC.....	Capacidad vital forzada
HEP.....	Histamine equivalent prick obtenida mediante técnicas <i>in vivo</i> . (Unidad de potencia biológica 1 HEP= 1000 BU)
HLA.....	Antígeno Mayor de Histocompatibilidad
IEF.....	Inmunolectroforesis
IL.....	Interleuquinas
IT.....	Inmunoterapia
kDa.....	kilodalton
PBS.....	Tampón fosfato salino (del inglés saline buffer phosphate)
PI.....	Punto isoeléctrico
RAST.....	Radioallergosorbent test (prueba de detección de anticuerpos IgE)
RQLQ.....	Cuestionario de calidad de vida en rinoconjuntivitis (del inglés Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire)
SCIT.....	Inmunoterapia subcutánea
SDS-PAGE.....	Electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
SEAIC.....	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

INDICE GENERAL

I.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
1.	QUENOPODIACEAE	
1.1.	Clasificación botánica, distribución y especies más representativas	11
1.2.	Aerobiología	
1.2.1.	Morfología del grano de polen	13
1.2.2.	Polinización y niveles de polen	14
1.3.	Alergenicidad y composición alérgica	15
1.3.1.	Alergenos en chenopodiáceas	16
1.3.2.	Identificación de Sal k1	18
1.3.3.	Reactividad cruzada	22
1.3.4.	Patrones de reconocimiento en distintas áreas geográficas	24
2.	FORMAS CLÍNICAS DE LA ALERGIA RESPIRATORIA: RINITIS Y ASMA BRONQUIAL	
2.1	Fisiopatología	25
2.2	Asma bronquial	29
2.2.1.	Diagnóstico de asma bronquial	29
2.2.2.	Gravedad del asma	32
2.2.3.	Tratamiento farmacológico del asma bronquial	34
2.3	Rinitis	36
2.3.1.	Diagnóstico de rinitis	36
2.3.2.	Gravedad de la rinitis	37
2.3.3.	Tratamiento farmacológico de la rinitis	37

3.	TRATAMIENTO ESPECÍFICO DE LA ALERGIA RESPIRATORIA.....	38
3.1.	Medidas de control ambiental inespecíficas.....	38
3.2.	Medidas de control ambiental específicas.....	38
3.3.	Inmunoterapia con extractos alérgicos	
3.3.1	Concepto.....	39
3.3.2.	Mecanismos de acción de la inmunoterapia con alérgicos.....	39
3.3.3.	Estandarización de extractos alérgicos.....	44
3.3.4.	Tipos de extractos alérgicos.....	46
3.3.5.	Eficacia clínica de la inmunoterapia.....	47
3.3.6.	Seguridad de la inmunoterapia.....	50
3.3.7.	Pautas de administración de los extractos alérgicos.....	53
3.3.8.	Indicaciones y contraindicaciones de la inmunoterapia.....	57
II.	<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....</u>	58
III.	<u>MATERIAL Y METODOS.....</u>	62
1.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	63
2.	EXTRACTOS ALÉRGICOS DE <i>S.KALI</i>.....	63
2.1.	Producción de los extractos	
2.1.1.	Extracto nativo.....	64
2.1.2.	Extracto despigmentado.....	65
2.1.3.	Extracto despigmentado y polimerizado.....	66
2.2.	Caracterización y Estandarización de los extractos.....	66
2.3.	Extracto para tratamiento.....	68
2.4.	Extracto para pruebas cutáneas.....	69

3.	INMUNOTERAPIA.....	70
3.1.	Protocolo de administración de inmunoterapia.....	70
3.2.	Reacciones adversas de la inmunoterapia.....	71
3.3.	Tratamiento de las reacciones adversas.....	72
4.	RECUENTO DE POLENES.....	74
5.	VALORACIÓN CLÍNICA.....	74
5.1.	Registro de síntomas.....	75
5.2.	Registro de consumo de medicación.....	76
5.3.	Escala analógica visual.....	77
5.4.	Cuestionarios de calidad de vida para rinitis.....	77
6.	PRUEBAS IN VIVO	
6.1.	Pruebas cutáneas.....	78
6.2.	Prueba de provocación nasal.....	80
7.	PRUEBAS IN VITRO	
7.1.	Determinación de IgE específica frente a <i>S. kali</i> e IgG4.....	81
8.	CRONOGRAMA DEL ESTUDIO.....	81
9.	METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	82
IV.	<u>RESULTADOS</u>.....	84
1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	85
2.	NIVELES DE PÓLENES DE LAS QUENOPODIÁCEAS.....	86
3.	VALORACIÓN CLÍNICA.....	86
3.1.	Puntuaciones de síntomas.....	86
3.2.	Puntuaciones de medicación.....	90
3.3.	Puntuaciones de síntomas+medicación.....	94
3.4.	Escala analógica visual.....	98
3.5.	Cuestionarios de calidad de vida para rinitis.....	99

4.	EVOLUCIÓN GLOBAL DE SÍNTOMAS Y MEDICACIÓN	
4.1	Evolución global de síntomas.....	102
4.2	Evolución global de medicación.....	102
4.3	Evolución global de síntomas+medicación.....	103
5.	PRUEBAS IN VIVO	
5.1	Pruebas cutáneas.....	104
5.2	Pruebas de provocación nasal.....	105
6.	PRUEBAS IN VITRO	
6.1	Determinación de IgE específica frente a <i>S.kali</i>	106
6.2	Determinación de IgG4 específica frente a <i>S.kali</i>	107
7.	TOLERANCIA DE LOS EXTRACTOS.....	108
V.	<u>DISCUSIÓN</u>.....	111
VI.	<u>CONCLUSIONES</u>.....	119
VII.	<u>ANEXOS</u>.....	122
VIII.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>.....	142

I. INTRODUCCIÓN

La eficacia de las vacunas alergénicas administradas por vía subcutánea ha sido demostrada en varios estudios doble ciego controlados con placebo y en ensayos clínicos abiertos ^{1,2}. El factor que limita en gran parte el empleo de inmunoterapia es la seguridad. Las propiedades intrínsecas de los alérgenos (epítomos que unen IgE) y la susceptibilidad del paciente alérgico son las responsables de los efectos secundarios observados en el paciente alérgico tras la administración de inmunoterapia ³. Existen diferentes métodos para administrar los extractos alergénicos disponibles, de forma que resulten más seguros y cómodos que la inmunoterapia subcutánea (SCIT) convencional, manteniendo la eficacia de la inmunoterapia. Uno de estos métodos actualmente en uso y extensamente estudiado es la polimerización de los extractos alergénicos con glutaraldehído, para que tengan menor capacidad de unión a IgE^{4,5}. La introducción del proceso de despigmentación previo al de polimerización del extracto también ha resultado ser una alternativa segura y cómoda a la SCIT convencional, manteniendo su eficacia. Extractos obtenidos empleando este procedimiento han demostrado eficacia y seguridad en estudios abiertos y doble ciego controlados con placebo de un año o menos de duración.

La inhalación de polen de *S.kali* es una de las causas más importantes de enfermedad alérgica respiratoria en Zaragoza. Sin embargo, los estudios sobre inmunoterapia con extracto de *S.kali* son escasos. Tampoco hay estudios que comparen eficacia y seguridad de dos extractos de **S. kali, depot y polimerizado**. El **objetivo** de este estudio fue comparar la eficacia y seguridad de la inmunoterapia con un extracto polimerizado, despigmentado de *S.kali* frente a un extracto depot convencional. Este trabajo forma parte de un estudio

iniciado en 1998 cuyos resultados iniciales ya fueron presentados⁶. Presentamos los resultados finales de este estudio.

1. QUENOPODIACEAS

1.1. Clasificación botánica, distribución y especies más representativas

Las **quenopodiaceae** constituyen una familia de plantas herbáceas o arbustivas, perennes, que incluyen más de 2500 especies. Desde el punto de vista taxonómico las Quenopodiáceas pertenecen al orden Caryophyllales. Se dividen en dos subfamilias: *Quenopodiodeas* y *Salsoloideas*⁷. Estas plantas se distribuyen por zonas templadas y cálidas, con clima desértico, ocupando generalmente suelos salinos (marismas, saladares) o terrenos alterados ricos en derivados de nitrógeno (escombreras, basureros, barbechos, bordes de caminos, etc.). Son plantas con gran resistencia a la sequía⁸. La sensibilización a estos pólenes se ha extendido al centro y área mediterránea de España: Albacete, Zaragoza, Murcia y Alicante, probablemente debido a la desertización del Sur de Europa. El uso de estas malezas como plantas ornamentales también ha promovido el aumento de la relevancia alérgica de estas especies⁹.

Las **Amarantáceas** pertenecen al mismo orden que las quenopodiáceas, pero a diferente familia. El grano de polen de estas dos familias es indistinguible a su visión óptica. Las plantas pertenecientes a esta familia apenas tienen importancia alérgica, pero sí económica (**Tabla 1**). Son la espinaca (*Spinacia oleracea*), la acelga (*Beta vulgaris cilca*) o la remolacha (*Beta vulgaris*).

Tabla 1. Especies de interés alergológico del orden Caryophyllales

ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Caryophyllales	Chenopodiaceae	Chenopodium	album
			ambrosioides
			berlandieri
		Salsola	pestifer (kali)
			soda
		Kochia	scoparia
		Bassia	hyssopifolia
		Sacobatus	vermiculatus
		Atiplex	canescens
			polycarpa
			letiformis
			wrighti
			patula
			cofertifolia
		Eurotia (Ceratooides)	lanata
		Suaeda	maritima
		Dondia	suffrutescens
		Allenrolfia	occidentales
		Axyris	amaranthoides
	Beta	vulgaris	
	Spinacia	oleracea	
	Amaranthaceae	Amaranthus	retroflexus
			palmeri
spinosa			
blitoides			
albus			

Entre las Amarantáceas la especie más abundante en toda la Península es la *Amaranthus retroflexus*, que florece en mayo y de agosto a septiembre^{7,10}.

Salsola kali* o *Salsola pestifer es una maleza denominada comúnmente Salsola, capitana, pincho, espinardo, barrilla pinchosa, salicor, hierba del cristal, etc.

Hierba anual de tallo erecto, ramificada desde la base con tallos y ramas con estrías purpúreas o verdosas, sus hojas son finas, rígidas y terminan en una fina espina. Las flores tienen cinco sépalos, cuatro de ellos libres. Las antenas miden 0,5-1,1 mm y las semillas 2-2,5 mm. Morfológicamente son arbustos de tamaño variable, esféricos y que tras florecer adquieren un tono marrón grisáceo. En otoño la planta se seca y el tallo se rompe a ras del suelo, convirtiéndose en una planta rodadora que es empujada por el viento dispersando las semillas en su recorrido^{7,10,11}.

Chenopodium album es una maleza anual denominada comúnmente quenopodio, cenizo, céñigo salado, sayón, armuelle blanco o bledo. Planta de tallo erguido irregularmente ramificado, con estrías verdes, a veces rojizo y de altura muy variable (desde 20 cm hasta 250 cm). Las hojas son irregulares, ovales, ovoides o lanceoladas. Las flores son hermafroditas, con cinco sépalos verdes libres, cinco estambres y semillas negras, lisas y brillantes^{7,11}.

1.2. Aerobiología

1.2.1. Morfología del grano de polen^{7,12}

El polen de las Chenopodiáceas y las Amarantáceas es indistinguible a su visión óptica, hasta el punto de que en los registros polínicos los pólenes de ambas familias se contabilizan juntos al no poderse identificar por separado con

las técnicas habituales de microscopía óptica. Morfológicamente es un polen pantoporado, con gránulos irregularmente dispuestos en toda su superficie, dando una imagen típica de “pelota de golf”.

El número de poros varía desde 15 en la *H. thamnoides* hasta 80-90 que tiene la *K. scoparia* y la *S. oleracea*. Los poros están delimitados por bandas de exina que subdividen la superficie en zonas hexagonales y pentagonales. La exina de estos pólenes tiene un tectum continuo con microespículas o pequeñas granulaciones que cubren toda la superficie y son visibles al microscopio. El grosor medio de la exina es de 1,8 micras en el *C. album* y algo más gruesa en *S. kali*.

1.2.2. Polinización y niveles de polen

Las **quenopodiáceas** producen, en general, una gran cantidad de pólenes, lo que, junto a su ubicuidad y gran abundancia en ciertas áreas, contribuye a su importante representación en los recuentos de pólenes de la atmósfera en ciertas regiones.

Son plantas que presentan polinización a través del viento (anemófilas), pudiendo transportar el grano de polen a larga distancia. Florecen de Abril a Diciembre y poseen un periodo de polinización muy amplio, teniendo dos máximos en abril y a finales de agosto, principio de septiembre¹³.

En zonas como la costa levantina y Murcia los niveles pueden llegar a representar el 18% de la totalidad de los pólenes recogidos, aunque los valores medios suelen situarse en torno al 5%. Los niveles de polen obtenidos en el recuento polínico no suelen ser muy elevados (valores medios en torno a 50 granos/m³, aunque se pueden alcanzar máximos de 180 granos/m³). Así pues,

si los comparamos con los pólenes de árboles y gramíneas, las Quenopodiáceas tienen una presencia aerobiológica bastante reducida.

En el caso de la Península Ibérica, la sensibilización al polen de quenopodio, medida por prueba cutánea, es más frecuente en la zona Mediterránea y zona Sur¹⁴, donde puede llegar a afectar hasta a un 34,5 % de la población. En el resto del país el porcentaje varía desde un 0% en las Islas Canarias a un 9,1% en Castilla-La Mancha.

En Zaragoza, el polen de *Salsola kali* constituye una de las principales fuentes de sensibilización¹⁵, ocupando el tercer lugar en importancia (40% de los polínicos) a diferencia del resto del resto de España donde no llega al 10%¹⁶. También este polen predomina en áreas semidesérticas con una frecuencia baja de lluvias: el Valle del Ebro y el área de confluencia entre Albacete, Almería y Murcia.

Fuera de la Península Ibérica, en países como Kuwait, Arabia Saudí, Iran, algunas zonas de Italia y el Oeste de los Estados Unidos, el polen de quenopodiáceas es considerado como la fuente alérgica más relevante.

1.3. Alergenicidad y composición alérgica

Es bien sabido que los pólenes de la familia Chenopodiaceae son una fuente importante de polinosis en algunas zonas secas¹⁷. En España, las especies más relevantes desde un punto de vista alérgico son el ***Chenopodium album*** y la ***Salsola kali***.

La caracterización de los alérgenos sensibilizantes de esta familia no se ha estudiado en profundidad, probablemente por su concomitancia con otras polinosis. Sin embargo, la incidencia de polinosis por estas malezas se ha

incrementado últimamente debido al aumento de la desertización en todo el mundo⁹.

1.3.1. Alergenos en chenopodiáceas

En 1981, Shafiee y cols¹⁸ aislaron en el polen de *Salsola Kali*, por cromatografía de intercambio iónico e isoelectroforesis, dos glicoproteínas (RT1y RT2) de 39 kDa y 42 kDa, respectivamente, pero con la misma composición de aminoácidos.

Lombardero y cols¹⁹ observaron bandas que fijaban IgE en el inmunoblotting de un extracto de *S. kali*, una de ellas de 14 kDa y otra de 35 kDa. Estas dos bandas se encontraban también en el extracto de *C. album* y *B. vulgaris*. No obstante, los patrones de las quenopodiáceas son diferentes, sugiriendo que los determinantes alérgicos comunes están presentes en bandas proteicas con diferente peso molecular o punto isoeléctrico.

En 1989²⁰, detectaron hasta 20 bandas que fijaban IgE e IgG en otro inmunoblotting de extracto de *S. kali*. El peso molecular de estos alergenos se encontraba entre 12,2 y 85 kD con un punto isoeléctrico (PI) entre 3,95 y 7,7, presentando los pacientes alérgicos diferentes bandas de reconocimiento de proteínas.

De la Hoz²¹ tras la separación de los componentes proteicos de un extracto de *S. kali* identificó 28 bandas diferentes de polipéptidos de pesos moleculares entre 106 kD y 13,22 kDa. El patrón de reconocimiento para IgE era heterogéneo; sin embargo un 64% de pacientes presentaban fijación de IgE frente a una banda e peso molecular de 54,4 kDa y un 44% de los pacientes frente a una banda de 36,6 kDa.

Würtzen et al ²² , detectaron bandas proteicas de 15, 25 y 55 kDa.

En los últimos años, tres alérgenos de *C. album* (Che a 1, Che a 2 y Che a 3) y uno de *S. kali* (Sal k 1) han sido aislados y caracterizados. El grupo del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, aisló en 2001 ²³ el **Che a 1**, glicoproteína de 18,8 kDa y 143 residuos aminoácidos, cuya secuencia muestra una identidad del 27-45% con Ole e 1. A pesar de ello encuentran escasa reactividad cruzada *in vitro* entre los mismos, probablemente debido a diferencias significativas en la secuencia polipeptídica²⁴. Aunque la prevalencia de Che a 1 varía dependiendo del área geográfica, en prácticamente todas las poblaciones es considerado un **alérgeno principal**, atendiendo a su incidencia en la población alérgica que suele ser superior al 50%. Un alérgeno principal es, desde un punto de vista alérgico, aquel que es reconocido por más del 50 % de los pacientes que se han sensibilizado a esa fuente biológica. Pero no cabe duda que además de una alta prevalencia, para que el alérgeno sea realmente relevante es necesario que tenga un título alto de IgE específica. Esta potencia inmunológica suele ir asociada con el hecho de ser proteínas mayoritarias en el contenido proteico de los extractos. En este caso, Che a 1 en el extracto de quenopodio se encuentra en muy baja concentración a diferencia de su homólogo Ole e 1 y los niveles de IgE dirigidas a esta proteína son muy bajos luego podemos aventurar que Che a 1 es un alérgeno principal con capacidad inmunogénica alta capaz de desencadenar la unión de IgE pero con poca relevancia clínica. Este mismo grupo, ha descrito y caracterizado posteriormente otros dos alérgenos del polen de *Chenopodium album*, **Che a 2** (profilina) y **Che a 3** (polcalcina) ^{25,26}. Che a 2 y Che a 3 son panalérgenos con una prevalencia

variable según el área geográfica de la que proceden los pacientes, homólogos a proteínas de origen vegetal, bien pólenes o alimentos. Las profilinas son moléculas muy ubicuas encontradas en un gran número de especies vegetales y animales. La profilina aislada a partir de quenopodio es una proteína ácida (PI 5.2) que posee una masa molecular de 12.6 a 15.2 kDa, lo que parece estar de acuerdo con su carácter polimórfico. Che a 2 está compuesto por una cadena polipeptídica de 131 residuos aminoacídicos. Che a 3 es una proteína que une calcio mediante dos sitios de unión. Es una proteína pequeña con un peso molecular aparente de 9.8 kDa y un punto isoelectrico ácido (PI 4.4). Posee una cadena polipeptídica de 86 residuos, con una gran similitud con proteínas homólogas de otros pólenes. Estos autores afirman que aunque Che a 1 haya mostrado una alta prevalencia, los niveles de IgE específica frente al mismo son bajos, y en cambio los niveles de IgE específica frente a Che a 2 y Che a 3 son los principales anticuerpos contribuyentes a toda la alergenicidad de las proteínas de quenopodio²⁶.

Posteriormente, Carnés y cols ²⁷. caracterizaron el alergeno principal de *S. kali*, inscrito en el banco de alergenos con el nombre de **Sal k 1**. Es una proteína de 43 kDa y no encontraron aparente homología con otras proteínas del banco de alergenos.

1.3.2. Identificación de Sal k 1 ²⁷

Finalmente se ha logrado identificar el **alergeno mayor de *S. kali***, siendo dado de alta en el Swiss Prot data bank con el número p 83181 y nombrado como **Sal k 1** en el banco de datos de alergenos. Carnés y colaboradores prepararon un extracto de *S. kali* y realizaron la caracterización del mismo empleando sueros

de pacientes del área de Zaragoza. A continuación seleccionaron la proteína mayoritaria, la purificaron, caracterizaron *in vitro* e *in vivo* la secuenciaron y por último estudiaron su homología con otras proteínas del banco de datos.

Fabricación del extracto

Para fabricar el extracto se utilizó polen de *S. kali* (Biopol Laboratory Inc., Washington, USA) con una riqueza superior al 95%. Cincuenta gramos de polen fueron diluidos en PBS 0.01 M (pH 7.4) en una proporción 1:10 y extraídos durante 4 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, el extracto fue centrifugado a 10,000 r.p.m. durante 30 minutos, y el sobrenadante recogido. El precipitado fue resuspendido nuevamente en PBS 0.01 M (pH 7.4) en una proporción 1:10 peso/volumen y extraído durante 16 horas. Transcurrido el tiempo fue centrifugado a 10,000 r.p.m y el sobrenadante recogido y mezclado con el de la primera extracción. El extracto fue filtrado, dializado, congelado y liofilizado.

Caracterización antigénica

El perfil antigénico fue analizado mediante SDS-PAGE e IEF. Atendiendo al punto isoeléctrico, en el extracto aparecían bandas con un rango desde 3,5 a 9, predominando las proteínas de carácter ácido. En función del tamaño molecular, se encontraron bandas con pesos moleculares entre 7 y 98 kDa.

Caracterización alérgica

Las muestras separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de P-Immobilon, que posteriormente fue secada durante 4 horas e incubada toda la noche con un pool de sueros perteneciente a nuestro estudio.

Se utilizaron además 3 muestras como controles negativos. La unión específica antígeno-anticuerpo fue detectada mediante anticuerpo monoclonal IgE marcado con peroxidasa previamente. El perfil alergénico mostró que en el extracto existen varias bandas de entre 26 y 90 kDa (36, 43, 57, 69, 81) con capacidad de reconocimiento de IgE.

Purificación de la proteína

El extracto nativo se purificó mediante cromatografía de filtración en gel, donde las fracciones proteicas se juntaron y los pigmentos fueron desechados. Para el siguiente paso de purificación se utilizó un sistema de electroforesis continua. El estudio mediante SDS-PAGE e inmunoblot en gel bidimensional demostró que aparecía una única banda de alrededor de 43 kDa con 6 isoformas diferentes con punto isoeléctrico entre 5,5 y 7, que presentaba capacidad de unión a IgE. Esta proteína fue seleccionada, dializada frente a agua bidestilada, filtrada, congelada y liofilizada.

ELISA directo frente al extracto nativo y a la proteína purificada

Tras diluir el suero e incubarlo durante 2 horas en las placas, se lavaron e incubaron nuevamente con IgE marcada con peroxidasa. Además se colocaron 3 muestras que se utilizaron como controles negativos. Los resultados de los sueros fueron considerados positivos cuando se obtuvo una densidad óptica superior a 4 veces la media de los controles. El 59,1% presentaba IgE específica frente al extracto completo y el 66% frente a la proteína purificada.

ELISA inhibición

Se realizó ELISA inhibición del extracto completo y de la proteína para valorar su actividad biológica in vivo. Para ello se tapizó una placa con extracto completo. Con cada muestra se realizaron varias diluciones a fin de obtener una recta. Las muestras fueron incubadas con suero durante 2 horas y a continuación depositadas en la placa previamente tapizada con el extracto nativo e incubadas toda la noche.

Después de lavar la placa se incubó con anti IgE humana marcada con peroxidasa durante 2 horas y transcurrido el tiempo la muestra fue desarrollada. La actividad alérgica de ambas muestras fue evaluada calculando el 50% de inhibición, usando como control un pool de sueros no inhibido previamente.

Las curvas obtenidas mostraron un coeficiente de regresión superior a 0.95 y ambas cumplieron el test de paralelismo. Un total de 1.12 μg de proteína fueron necesarios para alcanzar el 50% de inhibición en el extracto completo, mientras que 2.08 μg de proteína fueron necesarias en el caso de la proteína purificada.

Pruebas cutáneas

Los 20 pacientes positivos testados presentaron prueba cutánea positiva a la proteína purificada y al extracto completo mientras que ninguno de ellos reconoció el extracto fabricado a partir de los pigmentos desechados. La media geométrica de las pápulas fue de 44,9 mm^2 (7-127) para el extracto nativo y de 70,9 mm^2 (17-195) para la fracción purificada. El coeficiente de correlación obtenido entre ambos pricks fue de 0,73. Ninguno de los controles negativos utilizados dio pápula frente a ninguno de las 3 concentraciones del extracto²⁷.

Secuenciación parcial de la proteína

Después de la digestión con tripsina, se obtuvieron 4 péptidos internos que fueron secuenciados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y denominados IP1, IP2, IP3 e IP4 y hasta el momento no se ha encontrado homología con otras proteínas descritas.

La proteína ha sido dada de alta en el Swiss Prot data bank con el número P83181 y nombrada como *Sal k 1* en el banco de datos de alergen²⁷.

1.3.3. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada dentro de la familia Chenopodiaceae y Amarantáceas está bien documentada^{19,22,24}.

En 1931 Lamson²⁸, utilizando pruebas cutáneas observó una importante reactividad cruzada entre el polen de *A. retroflexus* y pólenes de varias especies de quenopodiales. Sellers, en 1932²⁹ demostró utilizando la técnica de transferencia pasiva, que los extractos de *S. kali* y *C. album* poseían alergen^{os} comunes con pólenes de amarantáceas, pero que existían en estos últimos pólenes, alergen^{os} que no se encontraban en las quenopodiales.

Weber³⁰ realizó pruebas cutáneas a 200 pacientes alérgicos con polen de 9 especies de Chenopodiaceae de los seis géneros y 3 especies de Amaranthaceae, encontrando la mayor asociación entre los pólenes de *S. kali* y *C. album*. Mediante inmunodifusión, observó que todas las especies tenían antígenos comunes, siendo los más similares los de *S. kali* y *C. album*.

Lombardero¹⁹ estudió a 20 pacientes con pruebas cutáneas positivas frente a *C. album*. Todos los pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas frente a *S. kali*, *B. vulgaris*, *A. latifolia* y *A. retroflexus*, siendo el extracto de *S. kali* el más

potente. Con antisueros de conejo frente a *C. album* y técnicas de inmunolectroforesis, describió un alérgeno anódico del polen de *C. album* que se encuentra en el polen de otras Chenopodiaceae (*S. kali* y *B. vulgaris*) y Amaranthaceae (*A. retroflexus*). Además las tres chenopodiaceae presentaban al menos una banda común en el polo catódico que une IgE.

De la Hoz ²¹ encontró en un estudio realizado con pacientes monosensibilizados a *S. kali* que un 96,4% de los pacientes presentaban test cutáneos positivos a *Salsola kali* y *Chenopodium album*, mientras que el RAST era positivo para ambos extractos en un 75% de los pacientes.

La mayoría de los pacientes sensibilizados a polen de *C. album* y *S. kali* reconocen cualquiera de los alérgenos encontrados en *C. album* (Che a 1 y los panalérgenos Che a 2 y Che a 3), y por tanto estos alérgenos explicarían la reactividad cruzada en estos pacientes ^{10,19,31}. Es decir, la sensibilización concomitante a *S. kali* y *C. album* podría ser atribuida a la presencia de alérgenos homólogos con similar secuencia proteica.

Partiendo de la base de que un pequeño porcentaje de pacientes que oscila entre un 10 y un 30%, están sensibilizados únicamente a *S. kali*, el grupo de Barderas ⁹ y el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, realizaron un estudio en 11 pacientes de Murcia sensibilizados a *S. kali*, pero no a *C. album*, para investigar el alérgeno específico responsable de esta exclusiva sensibilización. Para ello aislaron, purificaron y clonaron Sal k1 en esos pacientes. Comparando la secuencia completa de aminoácidos de este alérgeno con proteínas del banco de alérgenos, observaron que este alérgeno pertenecía a la familia **pectin metilesterasa** (PME), y que **Sal k 1** es el alérgeno principal

en pacientes sensibilizados a polen de *S. kali* y no a polen de *C. album*, convirtiéndolo en una **herramienta diagnóstica útil** en estas áreas de población.

1.3.4. Patrones de reconocimiento en distintas áreas geográficas

La prevalencia de algunos alérgenos es variable según la distribución geográfica de la población alérgica. La prevalencia de determinados alérgenos cambia de forma notable dependiendo de factores como el clima, la abundancia de la planta en una determinada área, la presencia de otros pólenes, etc. Eso complica extraordinariamente el diagnóstico preciso de un paciente y la aplicación de una terapia eficaz. Por ejemplo, en Murcia aumenta de forma notable la sensibilización a panalérgenos. En esta región existen otros pólenes con alto contenido en proteínas homólogas como el olivo. En Zaragoza la mayor parte de los pacientes alérgicos a quenopodiáceas lo son a salsola, siendo extremadamente baja la sensibilización a quenopodio. En ambas poblaciones, de manera más rotunda en Zaragoza, la sensibilización a Salsola es mucho más relevante que al quenopodio, pudiendo ser considerado como el sensibilizador primario. En ambas regiones, se ha detectado la aparición de bandas específicas en Salsola, que no están presentes en quenopodio ^{32,9}.

En regiones como Murcia donde existen altos niveles de exposición a quenopodio, se incrementan las sensibilizaciones a Che a 1, alérgeno específico, y a panalérgenos, especialmente Che a 3, bien por aumento en los niveles de polen y/o por la aparición de reactividades cruzadas con alérgenos de otros pólenes abundantes en la zona y relacionados como el olivo ²⁴. En polínicos sin ir más lejos, a medida que aumentan los niveles de polen a los que

está expuesto un paciente aumenta la frecuencia de reconocimiento de alérgenos menores mientras que a bajos niveles de exposición, son los alérgenos mayores los que predominan como fuente sensibilizante.

2. FORMAS CLÍNICAS DE LA ALERGIA RESPIRATORIA:

RINITIS Y ASMA BRONQUIAL

2.1. Fisiopatología

La rinitis y el asma bronquial son enfermedades inflamatorias de vía aérea y dicha inflamación está presente incluso en las formas más leves de la enfermedad. En la rinitis y el asma atópicas la inflamación es consecuencia de la respuesta inmunológica al alérgeno, que está mediada por anticuerpos IgE³³.

La IgE es generada por las células B bajo la regulación de citocinas producidas por los linfocitos T, como IL₄ e IL₁₃, además de citocinas copromotoras como la IL₆ y las interacciones ligando-receptor específico que tienen lugar durante el contacto celular entre las dos poblaciones linfocitarias. Entre estas interacciones se encuentran unas cognitivas (entre el MHC clase II del linfocito B y el complejo CD3-receptor del linfocito T) y otras no cognitivas, como la que ocurre entre el CD40 del linfocito B y su ligando expresado en los linfocitos T activados o entre B7-1 y B7-2 y los ligandos CD28/CD152, también expresados en la célula T. Estas interacciones y la síntesis de IgE parecen tener lugar en los ganglios linfáticos regionales tras la presentación al linfocito T del alérgeno procesado por las células presentadoras de antígeno. La IgE específica frente al alérgeno sintetizada pasa por la circulación y posteriormente se fija a sus receptores de alta afinidad, localizados principalmente en la membrana mastocitos y basófilos, y de baja afinidad, expresado en varios tipos de células,

como linfocitos, monocitos, células NK, macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans y eosinófilos³⁴.

Tanto en la rinitis como en el asma atópica, como ya ha sido expuesto, la exposición al alérgeno causal produce una respuesta inmediata, que se inicia en minutos, y una respuesta tardía, que se manifiesta varias horas después, asociada con la instauración de fenómenos inflamatorios más evidentes. La exposición repetida conlleva una cronificación del proceso y subsiguientes intentos de restauración, que en última instancia pueden ocasionar cambios en las estructuras de las vías aéreas.

La respuesta inmediata se produce tras la activación de los mastocitos con IgE específica frente al alérgeno en su superficie. La unión de la IgE al alérgeno produce la activación de una serie de mecanismos que conducen a la degranulación mastocitaria con la liberación de sus mediadores, como la histamina, triptasa y eicosanoides. Por la acción de estos mediadores en la mucosa bronquial se producen broncoconstricción, hiposecreción mucosa y vasodilatación, que contribuyen a la extravasación de las proteínas plasmáticas y a consiguiente edema de la pared bronquial y en la mucosa nasal estornudos, hidrorrea, prurito y congestión^{33,35}.

Los mastocitos y los basófilos aparecen degranulados en las vías aéreas, incluso en fases estables de la enfermedad. Su activación se produce no sólo de forma alérgeno-específica sino también por la acción de los neuropéptidos, fracciones del complemento y proteínas granulares de eosinófilos. La producción de citocinas (IL₄, IL₁₃, IL₁₆) tiene la capacidad de activar a los linfocitos T y B. La actividad quimiotáctica de IL₅ y GM-CSF favorece la concentración de eosinófilos, células que contribuyen a perpetuar la inflamación³⁶.

La respuesta tardía a partir de las 4 horas se caracteriza por la concentración y activación de varios tipos de células como linfocitos T, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y macrófagos, que llegan atraídos por mediadores quimiotácticos y acceden gracias a la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular, que es incrementada por la histamina ³⁷.

Los eosinófilos ocupan un papel primordial en la inflamación, en la rinitis y en el asma. Liberan mediadores proinflamatorios como PAF y LT C₄, proteínas altamente tóxicas para el epitelio como MBP, ECP, EPO, EDN producen citocinas (IL₃, IL₅, IL₁₀, IFN- γ y GM-CSF) que contribuyen a aumentar la respuesta inflamatoria ³⁶.

La evidencia de que el origen y la persistencia de la inflamación en el asma y la rinitis asienta en los linfocitos T de memoria activados crónicamente y sensibilizados frente a alérgenos u otros antígenos es cada vez más sólida. Mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado en las biopsias tanto bronquiales como nasales el predominio de linfocitos T que expresan ARN-m para IL₃, IL₅ y GM-CSF, que entre otras acciones se encargan del reclutamiento y activación de eosinófilos, y para IL₄, esencial para la desviación isotópica hacia la producción de IgE por parte de los linfocitos B ³⁴.

En el fenómeno inflamatorio también participan las células epiteliales y terminaciones nerviosas y, en el bronquio, el músculo liso bronquial, los fibroblastos y la matriz extracelular.

Existe en el epitelio bronquial una descamación característica, probablemente secundaria a la acción de las proteínas del eosinófilo o radicales libres, que conlleva su desestructuración, alterando la permeabilidad de la mucosa y permitiendo el acceso de alérgenos e irritantes. Además disminuye su

producción de factores relajantes musculares y de endoproteasas que neutralizan la acción de los neuropéptidos inflamatorios, como la sustancia P. Las células epiteliales activadas son fuente de múltiples mediadores de la inflamación, como GM-CSF, IL₆, IL₈, implicados en el reclutamiento de células y en la amplificación de la respuesta inflamatoria. También intervienen en los procesos reparadores, ya que sintetizan proteínas de la matriz extracelular, segregan factores fibrogénicos y regulan la proliferación de fibroblastos.

En el tejido nervioso, las fibras sensitivas C, dada la desestructuración del epitelio, son estimuladas por agentes irritantes. Su activación transmite impulsos nerviosos de forma antidrómica a otras terminaciones nerviosas libres y origina la liberación de neuropéptidos (sustancia P y neuroquinina A), con potente actividad broncoconstrictora y proinflamatoria ³⁸.

Los fenómenos de reparación y reestructuración asociados a los procesos inflamatorios en la vía aérea ocasionan un aumento del espesor de la pared bronquial, en parte por hiperplasia e hipertrofia de la capa muscular que favorece la contracción del músculo liso y disminuye el calibre de la vía aérea. Estos fenómenos ocasionan también un aumento del tamaño de las glándulas mucosas con hipersecreción de moco y una fibrosis subepitelial por depósito de colágeno I y III y fibronectina en la *lámina reticularis* debajo de la membrana basal. Estos fenómenos de reestructuración se traducen en el aumento de la hiperreactividad bronquial y en el deterioro de la función pulmonar a lo largo de los años con posible desarrollo de obstrucción persistente al flujo aéreo³⁸.

2.2. Asma bronquial

A lo largo de la segunda mitad del siglo XX han ido sucediéndose diferentes definiciones de asma, incorporando cada una de ellas la evolución en el conocimiento de la enfermedad. De una definición puramente funcional, se pasó a otra que incorporaba el concepto de hiperreactividad de la vía aérea y, finalmente, en la década de los 90 surgen las definiciones que hacen referencia a hallazgos inflamatorios.

Una de las más aceptadas es la del Nacional Heart, Lung and Blood Institute de 1995 que define el asma como trastorno crónico inflamatorio de las vías aéreas en el que intervienen múltiples células, en particular mastocitos, eosinófilos y linfocitos T. En individuos susceptibles, esta inflamación causa episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, especialmente por la noche y/o primeras horas de la madrugada. Estos síntomas se asocian habitualmente con una limitación generalizada del flujo aéreo que es, al menos parcialmente, reversible de forma espontánea o con tratamiento. La inflamación también provoca un aumento de la respuesta de las vías aéreas a una diversidad de estímulos ³⁹.

2.2.1. Diagnóstico

El diagnóstico clínico puede sospecharse cuando se presentan episodios de disnea, sibilancias, opresión torácica y tos, especialmente por la noche o de madrugada, o bien provocados por desencadenantes tales como exposición a alérgenos, ejercicio físico, irritantes bronquiales o infecciones respiratorias. Sin embargo, la confirmación diagnóstica requiere establecer de forma objetiva que existe una obstrucción bronquial reversible e inflamación en la vía aérea³⁹.

Los métodos para establecer el grado y la reversibilidad de la obstrucción bronquial son: la espirometría forzada con prueba broncodilatadora y la medición seriada del Flujo Espiratorio Máximo (FEM). En la espirometría forzada, los parámetros que se utilizan para medir el grado de obstrucción bronquial son:

-Capacidad vital forzada (FVC)

-Volumen espiratorio máximo en el primer segundo (VEMS o FEV₁)

-Índice de Tiffeneau (FEV₁/VC)

Cuando existe obstrucción (FEV₁ y FEV₁/FVC <80%), la prueba broncodilatadora (administración de un fármaco agonista de β₂ receptores por vía inhalada) se utiliza para comprobar la reversibilidad de la obstrucción (aumento del FEV₁ al menos un 12% y 200 ml con respecto al inicial en una segunda espirometría forzada). Cuando la prueba broncodilatadora es negativa debe hacerse un ensayo terapéutico con corticoides antes de concluir que la limitación al flujo aéreo es irreversible)⁴⁰. Cuando la espirometría forzada es normal puede ser útil el registro seriado del FEM, cuyo valor se correlaciona bastante bien con el del FEV₁³⁹. Habitualmente, el registro se realiza dos veces al día, por la mañana al levantarse y por la noche. El valor de referencia o normalidad se obtiene cuando el paciente se encuentra asintomático (el mejor FEM personal), y se valoran los cambios en dicho parámetro durante periodos de 1 ó 2 semanas. Se considera que descensos del FEM por debajo del 80% del mejor personal, o variaciones del FEM de más del 20%, son diagnósticos de asma. El método más fiable para calcular estas variaciones es la amplitud, expresada en la fórmula ⁴¹:

$$\text{Variabilidad diaria} = \frac{\text{FEM noche} - \text{FEM mañana}}{\frac{1}{2} (\text{FEM noche} + \text{FEM mañana})} \times 100$$

Sin embargo, en pacientes con asma leve o muy grave esta variabilidad del FEM puede no estar presente.

Cuando las medidas de función pulmonar descritas no son suficientes para establecer el diagnóstico de asma, la medida de la hiperreactividad bronquial mediante una prueba de provocación bronquial con metacolina o histamina puede ayudar al diagnóstico, aunque la especificidad de este método es moderada y su valor predictivo positivo bajo, ya que puede detectarse un grado variable de hiperreactividad bronquial en fumadores, en pacientes con rinitis y en otras enfermedades que cursan con obstrucción de la vía aérea como la fibrosis quística, bronquiectasias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica entre otras. Por otro lado, cabe destacar que la principal utilidad de la técnica reside en su alto valor predictivo negativo en el diagnóstico de asma ⁴².

Para establecer el diagnóstico de asma atópica, es esencial una historia clínica detallada y la demostración de anticuerpos IgE específicos frente al o a los alérgenos sospechosos a los que el paciente está expuesto. Si existen dudas en el diagnóstico etiológico, puede recurrirse a la provocación bronquial con alérgeno, como método de demostrar la relación entre la causa (alérgeno) y el efecto (asma) ⁴³.

2.2.2. Gravedad del asma

De las múltiples clasificaciones del asma, atendiendo a su gravedad, la actualmente más aceptada es la de la GINA (The Global Initiative on Asthma), surgida en 1995 del esfuerzo conjunto del Nacional Heart, Lung and Blood Institute y de la O.M.S ³⁹. La primera edición fue basada en la opinión, pero la revisión posterior, en 2002 ⁴⁴, fue basada en la evidencia. Se clasificó al asma según gravedad en intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (**figura 1**). La presencia de una de las características de gravedad es suficiente para clasificar al paciente en la categoría de más gravedad, pero la categoría se puede modificar a lo largo del tiempo en función de la evolución del paciente asmático.

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

Figura 1. Clasificación del asma atendiendo a su gravedad

Una nueva revisión de la guía GINA ha tenido lugar recientemente, en 2006⁴⁵, y se basa en el nivel de control de la enfermedad. La clasificación anterior del asma según gravedad en intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave se recomienda sólo con fines de investigación. El documento recomienda ahora clasificar el asma según el nivel de control: controlada, parcialmente controlada o no controlada (**figura 2**). Con ello se refleja la idea de que la gravedad del asma no solo implica la gravedad en sí de la enfermedad subyacente, sino también la respuesta al tratamiento, y que la gravedad no es una característica invariable del asma específica de un paciente, sino que puede cambiar con los meses o los años⁴⁵.

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

Figura 2. Clasificación del asma atendiendo a su control

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

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

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

2.2.3. Tratamiento farmacológico

El nivel actual de control del asma del paciente y el tratamiento actual determinan la selección del tratamiento farmacológico. Cada paciente es asignado a uno de cinco escalones de tratamiento. La **figura 3** detalla cada uno de los tratamientos recomendados para cada nivel en adultos y niños mayores de 5 años ⁴⁵.

En cada uno de los niveles, el tratamiento de rescate debe de ser utilizado para el alivio de los síntomas según sea necesario. El medicamento controlador más recomendable a iniciar en un niño de 5 años o menor son los glucocorticosteroides inhalados como terapia inicial. Si este tratamiento no logra controlar los síntomas, la mejor opción es aumentar la dosis del mismo.

Los **fármacos controladores** actualmente empleados en el tratamiento del asma son:

- Glucocorticosteroides inhalados y orales
- Cromonas
- Agonistas β_2 de acción larga inhalados
- Combinación de glucocorticosteroides inhalados y agonistas β_2 de acción prolongada
- Teofilina de liberación prolongada
- Antileucotrienos
- Inmunomoduladores (Anti IgE)

Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Educación y Control ambiental				
Agonistas β_2 de acción corta a demanda	Agonistas β_2 de acción rápida a demanda			
Opciones de control	Seleccionar uno	Seleccionar uno	Añadir uno o más	Añadir uno o ambos
	Dosis baja de GCEI *	Dosis baja de GCEI más agonista β_2 de acción prolongada	Dosis media o alta De GCEI más agonistas β_2 de acción prolongada	Glucocorticoesteroides orales (dosis más baja)
	Modificador de leucotrienos **	Dosis media o alta de GCEI	Modificador de leucotrienos	Tratamiento con Anti IgE
		Dosis baja de GCEI más modificador de leucotrienos	Teofilina de liberación sostenida	
		Dosis baja de GCEI más teofilina de liberación sostenida		

Figura 3. Enfoque de tratamiento basado en el control

*GCEI= glucocorticoesteroides inhalados

** = antagonista del receptor o inhibidores de la síntesis

Los **fármacos de rescate** actualmente empleados en el tratamiento del asma son:

- Agonistas β_2 de acción corta, inhalados y orales
- Anticolinérgicos
- Teofilina de acción corta

Los medicamentos inhalados son los de elección ya que se distribuyen directamente en las vías aéreas, que es donde son necesarios, siendo una

terapia efectiva y potente con menos efectos sistémicos secundarios que los medicamentos administrados por vía oral.

2.3. Rinitis

La rinitis se define como la inflamación del revestimiento interno de la nariz, caracterizada por uno o más de los siguientes síntomas: congestión nasal, rinorrea, estornudos y prurito de al menos una hora de duración la mayoría de los días ⁴⁶.

Es una enfermedad muy prevalente. Se estima que la prevalencia de rinitis alérgica está alrededor del 15%-20%, que genera un gran coste económico y social, y que tiene un gran impacto sobre la calidad de vida ^{47, 48, 49}.

Actualmente, la clasificación de rinitis más utilizada es la del documento ARIA ⁴⁹ (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma), cuya última actualización ha tenido lugar recientemente⁵⁰. Este documento clasifica la rinitis según su duración en intermitente y persistente; la rinitis alérgica puede cursar con síntomas intermitentes, definidos como aquellos que aparecen menos de 4 días por semana o menos de 4 semanas por año, o con síntomas persistentes, en el caso de aparecer más de 4 días por semana y más de semanas por año.

2.3.1. Diagnóstico

En el diagnóstico es esencial la historia clínica detallada, constatando no sólo los síntomas sino su periodicidad, posibles desencadenantes, duración y gravedad. Para establecer la presencia de la inflamación eosinófila nasal característica, realizaremos una citología del exudado con recuento de eosinófilos.

Para el diagnóstico de la rinitis alérgica, al igual que en el asma, es necesario realizar un estudio alergológico con el fin de demostrar la presencia de IgE específica frente a los alérgenos sospechosos. Si existen dudas en el diagnóstico causal, puede recurrirse a la provocación nasal con alérgeno para clarificar el diagnóstico ⁵¹.

2.3.2. Gravedad de la rinitis

El documento ARIA ^{49,50}, también clasifica la rinitis según su gravedad en leve y moderada-grave. Así, la rinitis leve es aquella que no interfiere el sueño ni la realización de la actividad diaria normal en el tiempo libre o en el medio escolar o laboral, mientras que la rinitis moderada o grave puede afectar a cualquiera de ellos.

2.3.3. Tratamiento farmacológico ⁵²

El tratamiento farmacológico de la rinitis estacional incluye antihistamínicos administrados por vía oral, nasal o intraocular, corticoides nasales, antileucotrienos ⁵⁰, cromonas intranasales o intraoculares, descongestionantes nasales u orales y anticolinérgicos.

El tratamiento de la rinitis propuesto de forma escalonada es ⁵²:

- Rinitis leve o síntomas ocasionales: Antihistamínicos orales o nasales (+/- cromonas).
- Rinitis moderada o síntomas frecuentes: corticoide nasales.
- Rinitis grave: Corticoides nasales y antihistamínicos orales o nasales.

3. TRATAMIENTO ESPECÍFICO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS RESPIRATORIAS

El tratamiento específico de la rinitis y el asma causados por *S. kali* se basa en:

- a) Medidas de control ambiental, con el fin de poder reducir o eliminar la exposición a los alérgenos causantes de la enfermedad.
- b) Inmunoterapia con extracto de *S. kali*, con el objetivo de disminuir o anular la respuesta alérgica del paciente a los alérgenos del polen.

3.1. Medidas de control ambiental inespecíficas

En el aire que respiramos hay una gran cantidad de sustancias que pueden desencadenar síntomas nasales o bronquiales. Dejando a un lado a los aeroalérgenos, existen otras partículas inhalantes, que son producidas por nosotros, las cuales al salir al aire en forma de gases o partículas, pueden ser irritantes, amenazando al medio ambiente y a nuestra salud. Estas sustancias contaminantes con posible relevancia clínica son: ozono, dióxido de azufre, dióxido nítrico, compuestos volátiles y formaldehído, polución debida a los automóviles y el humo del tabaco⁵³.

Las evidencias epidemiológicas indican que existe una interacción entre ellas y la rinitis. Los mecanismos por los cuales estas sustancias producen o exacerban los síntomas se conocen mejor actualmente⁵⁴.

3.2. Medidas de control ambiental específicas

En toda rinitis y asma alérgico es muy importante evitar la exposición a los alérgenos responsables. El polen es imposible de evitar, por lo que lo único que

podemos hacer es evitar la exposición a fuertes concentraciones en la estación polínica correspondiente. La información al paciente es fundamental y hoy podemos hacerlo con el Mapa Polínico de cada Comunidad, realizado por el Comité y Red de Aerobiología de la SEAIC. Estos datos aparecen en los medios de comunicación, y de esta forma el paciente puede organizarse para evitar los días más peligrosos con más índice de polen, prevenir sus actuaciones y poner en marcha la medicación que le sea necesaria. Las principales recomendaciones que actualmente se le dan al paciente para disminuir la exposición al polen son:

- Evitar salidas al campo o jardines.
- Evitar paseos en bicicleta o similar, así como viajar en el coche con la ventanilla abierta.
- Ventilar la casa por la mañana temprano, manteniendo cerradas las puertas y ventanas durante las horas de mayor calor.

3.3. Inmunoterapia con extractos alergénicos

3.3.1. Concepto

La inmunoterapia (IT) con extractos alergénicos consiste en la administración gradual de dosis crecientes del extracto alergénico, alcanzando una dosis que sea eficaz en reducir los síntomas asociados con la exposición al alérgeno causal ⁵⁵.

3.3.2. Mecanismos de acción de la inmunoterapia con alérgenos

La IT pretende provocar un estado de tolerancia clínica frente a alérgenos en aquellos pacientes que presentan reacciones de hipersensibilidad de tipo I (IgE

mediada). Las características fisiopatológicas clásicas de la respuesta inflamatoria alérgica son la activación de mastocitos y basófilos dependiente de IgE y la eosinofilia tisular, pero además, se ha demostrado la participación esencial de las citocinas de origen linfocitario en dicha respuesta. Los mecanismos de acción de la inmunoterapia con alérgenos han sido revisados en profundidad por Till y Durham ^{56,57}.

Efectos de la IT sobre las células efectoras y mediadores inflamatorios

La IT con extractos de alérgenos produce efectos sobre la producción de mediadores inflamatorios de las respuestas inmediata y tardía a la exposición al alérgeno.

Dieguez y cols. ⁵⁸ demostraron un aumento inicial de la liberación específica de histamina por los basófilos seguido de una disminución gradual en el curso de la IT con pólenes, reducción que se relacionó de forma directa con la duración del tratamiento y la mejoría clínica obtenida.

Ferrer y cols. ⁵⁹ han descrito una disminución en la liberación de histamina y en la producción de sulfidoleucotrienos tras estimulación con el alérgeno en los pacientes que habían recibido IT con *D. pteronnyssinus* durante más de dos años.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado una reducción de los mastocitos nasales en pacientes que recibieron tratamiento con polen de gramíneas comparado con los que recibieron placebo, y esta disminución en los mastocitos se ha correlacionado con la mejoría clínica ⁶⁰.

Durham y cols ⁶¹ pudieron comprobar una inhibición de la respuesta tardía a la provocación nasal y una disminución de los eosinófilos totales en la biopsia

nasal obtenida al cabo de 24 horas de la provocación específica con alérgeno en pacientes tratados con IT con polen de gramíneas.

En resumen, la IT disminuye el número de células inflamatorias, su activación y la liberación de sus mediadores en el órgano diana de la respuesta inflamatoria alérgica.

Modificaciones de la IT en los anticuerpos circulantes

Durante la IT convencional con extractos alérgicos, las concentraciones séricas de IgE total y de IgE alérgeno-específicas aumentan inicialmente para caer de forma gradual a niveles basales o similares a los de pacientes no alérgicos en el curso de la inmunoterapia, lo cual además se relaciona con la mejoría clínica en estos pacientes. Hay estudios que demuestran que en casos de poca o nula respuesta a la IT no se produce este descenso en los niveles de IgE. Sin embargo, estas modificaciones en la IgE específica se producen con una gran variabilidad individual, y en ocasiones no guardan una relación temporal con la mejoría clínica ⁶⁰.

En la mayoría de los estudios realizados, la IT provoca la producción de anticuerpos IgG (subtipos 1 y 4) e IgA ^{62,63}. La mayoría de los anticuerpos IgG actúa como “bloqueantes”, es decir, éstos compiten con la IgE para la fijación de alérgenos y dificultan la activación de mastocitos-basófilos dependientes de IgE ⁶⁴. A pesar de esta teoría, se ha demostrado por inmunodetección que la unión de IgE al alérgeno no se ve alterada a pesar de la inducción de IgG específica por el tratamiento ⁶⁰. Al igual que ocurre con la IgE específica, tampoco la concentración en suero de IgG específica se relaciona con la respuesta clínica a la IT ⁵⁶. En la IT rápida con venenos de himenópteros se observa un aumento

precoz de la IgG específica que se ha asociado a protección, pero no tiene valor predictivo en los pacientes de forma individual en cuanto a la posterior tolerancia a picaduras de himenópteros ⁶⁵.

En cualquier caso, la IgG es un marcador útil de la respuesta inmunológica a la IT con alergenos ⁶⁰.

Las propiedades de estos anticuerpos IgA todavía están por determinar.

Se ha investigado acerca de la existencia de IgM e IgD específicas en suero sin que hasta la fecha se hayan obtenido datos concluyentes.

Efectos de la IT sobre la respuesta linfocitaria

Existe una clara relación entre la producción de citocinas de tipo Th2 y la patología alérgica. Existen dos tipos de linfocitos T-CD4+ (CD4 +, cluster de diferenciación), clásicamente conocidos como T-helper (Th), según el perfil de las citocinas específicas que producen tras su activación:

- Linfocitos Th1. Sintetizan especialmente interferón γ (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2).
- Linfocitos Th2. Producen, sobre todo, interleucinas 4,5 y 13 (IL-4, IL-5 e IL-13).

La IT con alergenos disminuye la producción de citocinas de tipo Th2, aumenta la producción de citocinas Th1 y/o induce un estado de anergia de la célula T específica para el alergeno ⁶⁰, tanto en sangre periférica como en el órgano diana.

En sangre periférica, Secrist y cols ⁶⁶ observaron una reducción de la producción de IL₄ por los linfocitos T específicos después de la IT con ácaros o pólenes, pero no detectaron cambios en la producción de IFN- γ .

También en sangre periférica se ha evaluado la cinética de secreción de citocinas durante la IT con ácaros siguiendo una pauta convencional, observándose un aumento en la producción de IFN- γ al cabo de 3 meses (al alcanzar la dosis máxima) y una posterior disminución de IL4 desde este momento hasta el año de tratamiento⁶⁷.

La **figura 4** ilustra esta hipótesis de la desviación de respuestas inmunológicas de perfil Th2 a respuestas Th1 como consecuencia de la IT.

La IT puede inducir anergia en los linfocitos T CD4+ específicos. Aunque estas células anérgicas no proliferan tras la re-estimulación con el antígeno, pueden aumentar la expresión de receptores de IL2 (CD25) y proliferar en respuesta a IL2 exógena.

Es posible que la IT actúe por ambos mecanismos, anergia de los linfocitos T y desviación inmunitaria, en poblaciones diferentes de células T. Por ejemplo, las dosis altas de antígeno, además de inducir anergia en los linfocitos T específicos, pueden favorecer la expresión de citocinas de tipo Th1 directamente o modificando el tipo de APC que interacciona con la célula T. De forma alternativa, el aumento de expresión de las citocinas de perfil Th1 por los linfocitos T específicos puede ser consecuencia directa de la anergia.

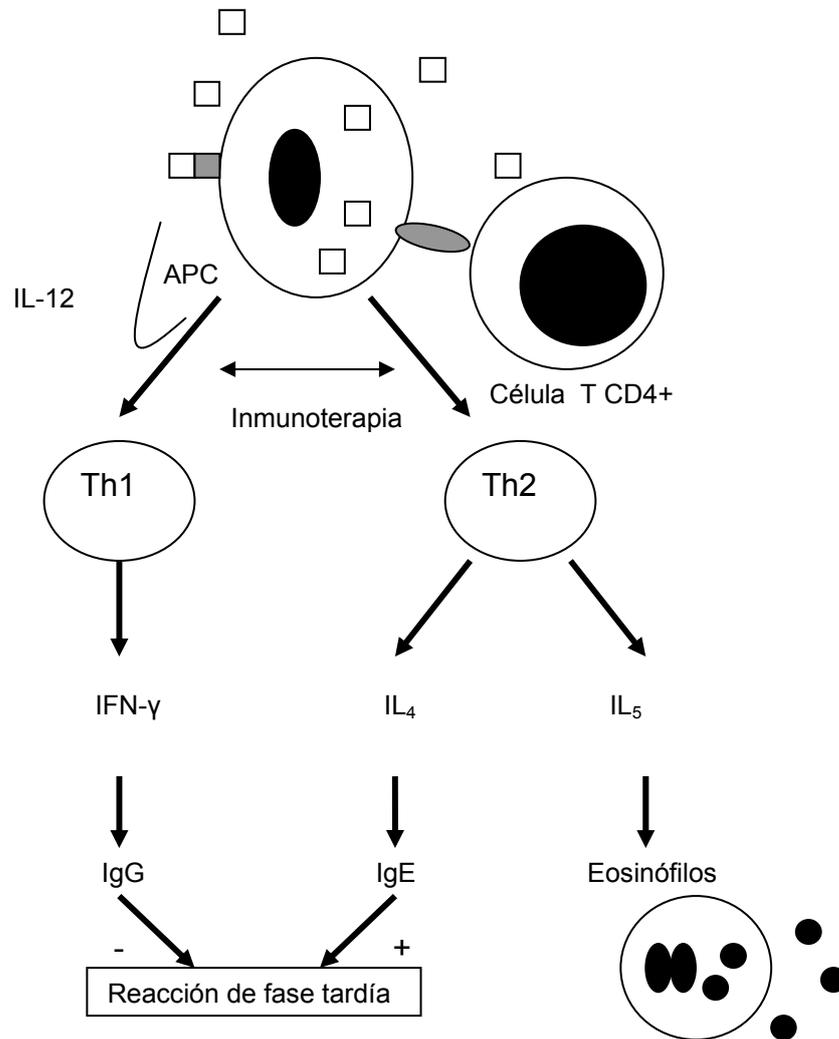


Fig. 4 Efectos de la inmunoterapia en las respuestas inmunológicas. Modificada de Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1025-34.

3.3.3. Estandarización de extractos alérgicos

En la Farmacopea Europea, los productos alérgicos son aquellos preparados farmacéuticos que derivan de materiales existentes en la naturaleza que contienen alérgenos y que son sustancias que causan y/o provocan enfermedad alérgica. Los componentes alérgicos son, en su mayoría, de naturaleza proteica. Los productos alérgicos están destinados al diagnóstico

in vivo y/o al tratamiento de las enfermedades alérgicas atribuidas a estos alergen⁵⁵.

El éxito del tratamiento depende en gran parte del uso de extractos alérgicos de alta calidad, adecuadamente estandarizados, que pueden ser fabricados de forma homogénea. Por ello, se han establecido los requisitos sobre la obtención de la materia prima, la estandarización y la calibración de alergen^{68,69}.

La estandarización biológica consiste básicamente en medir la potencia alérgica del extracto y se realiza mediante pruebas *in vivo* (midiendo la respuesta cutánea de pacientes alérgicos obtenida en las pruebas cutáneas, que será similar para extractos de igual potencia) e *in vitro* (mediante inhibición de RAST o métodos similares utilizando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos y un extracto de referencia con potencia conocida). Existen diferentes métodos de estandarización biológica con diferentes unidades de medida dependiendo del fabricante, y ello supone un problema a la hora de comparar la potencia alérgica de unos extractos con respecto a otros. Por este motivo, se han elaborado estándares para varios productos alérgicos dentro de un programa de estandarización de alergen⁵⁵ de la O.M.S.

Además de la potencia del extracto, es importante valorar la composición proteica del mismo, que se realiza por técnicas semicuantitativas como el SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico) o el IEF (Isoelectroenfoque), y la presencia de las proteínas alérgicas mediante Inmunodetección y CRIE (Radioinmunolectroforesis cruzada).

Un último avance en la estandarización es cuantificar los principales alergen⁵⁵, habitualmente utilizando anticuerpos monoclonales específicos, con

el fin de garantizar que la concentración de estos alérgenos sea la misma en sucesivos lotes de fabricación de los extractos.

3.3.4. Tipos de extractos alérgicos

Los tipos de extractos alérgicos más comunes para tratamiento incluyen **extractos no modificados** (acuosos) y extractos **modificados** física y/o químicamente. La modificación física supone la adsorción del extracto en diferentes vehículos, como aluminio, fosfato cálcico, tirosina o liposomas, con el fin de retrasar la liberación del alérgeno (extractos depot) y disminuir la frecuencia de las reacciones adversas. La modificación química pretende disminuir la alergenidad, es decir, la capacidad de provocar la reacción mediada por IgE, manteniendo o aumentando la inmunogenicidad o capacidad de modular el sistema inmunitario, mejorando así la tolerancia del tratamiento manteniendo la eficacia clínica. Con este objetivo, se han fabricado extractos modificados con glutaraldehído ^{4,5} o polimerizados con formaldehído. En general, con este tipo de modificaciones se precisa mayor cantidad de alérgeno para conseguir el mismo efecto clínico ⁷⁰.

Se están investigando otros tipos de extractos alérgicos modificados genéticamente. Son extractos con alérgenos recombinantes basados en técnicas de biología molecular ^{71,72}. Estos extractos intentan reducir la alergenidad, sin disminuir su inmunogenicidad. Uno de los mayores inconvenientes para la comercialización de este tipo de extractos es el coste económico. Jutel M y cols ⁷³ llevaron a cabo un estudio con una mezcla de alérgenos principales recombinantes de gramíneas. A pesar de que la

inmunotepia resultó eficaz no se redujo la alergenicidad de los extractos recombinantes, y por tanto no hay grandes ventajas con respecto a los extractos nativos. Mediante péptidos, secuencias inmunoestimuladoras de DNA y proteínas de fusión también se intenta reducir la alergenicidad manteniendo la inmunogenicidad de los extractos ⁷⁴.

3.3.5. Eficacia clínica de la IT

Durante muchos años, la IT con extractos alérgicos ha sido un tratamiento controvertido. Con el mayor conocimiento de los alérgenos, se han ido mejorando los métodos de producción de los extractos y su estandarización, adecuando la potencia del extracto para poder conseguir una dosis eficaz y segura.

Se ha demostrado que la administración de dosis bajas incluso durante tiempo prolongado es ineficaz, pero también la administración de altas dosis conlleva un elevado riesgo de reacciones adversas. Por lo tanto, el objetivo en toda IT es conseguir una dosis de mantenimiento eficaz clínicamente, con la mínima frecuencia de reacciones adversas.

La eficacia de la SCIT con pólenes, ácaros, epitelio de gato y el hongo *Alternaria* está bien documentada mediante ensayos doble ciego, existiendo varios meta-análisis ^{1,2} que demuestran que las vacunas alérgicas proporcionan una reducción de síntomas y consumo de medicación en pacientes bien seleccionados, cuando se aplican programas terapéuticos correctos. De forma paralela, se produce una reducción de la respuesta específica al alérgeno determinada por pruebas cutáneas o de provocación nasal específica.

La IT es un tratamiento eficaz siempre que esté indicada correctamente, se utilicen extractos de alta calidad, dosis óptimas y que tenga una duración adecuada, entre 3 y 5 años. Según algunos documentos de consenso, la magnitud de la eficacia debería establecerse como el porcentaje de reducción de las puntuaciones globales de síntomas en los grupos estudiados. La eficacia adicional inferior a la obtenida por los antihistamínicos no se considera aceptable y consecuentemente la eficacia mínima clínicamente relevante debería de ser por lo menos un 20% superior del placebo ⁷⁵.

La efectividad de la IT es duradera después de suspenderla. Así lo han ido comprobando diferentes autores en sus estudios:

Golden ⁷⁶ realizó provocaciones con picadura de abeja en el laboratorio al cabo de 2-5 años de haber finalizado el tratamiento de IT, y los pacientes o no presentaban reacción, o esta era mínima.

Jacobsen ⁷⁷ investigó el efecto a largo plazo de 3 años de IT con extracto de polen de árboles 6 años después de finalizar el tratamiento y observó que en el 86% de pacientes con rinitis y en el 68% de pacientes con asma se mantenía la eficacia. Además, ningún paciente con rinitis desarrolló asma en este periodo.

Naclerio ⁷⁸ llevó a cabo un estudio doble ciego controlado con placebo en pacientes que habían recibido IT con polen de ambrosía durante 3 años con buena respuesta. Al finalizar estos 3 años de tratamiento los pacientes fueron aleatoriamente divididos en dos grupos: unos continuaron con IT durante 1 año más y los otros recibieron placebo. No observó diferencias entre ambos grupos de pacientes en los síntomas de rinitis y sí un discreto empeoramiento en la respuesta nasal a la provocación con alérgeno en los pacientes que habían suspendido la IT.

Durham ⁷⁹ utilizó un diseño similar en pacientes que habían recibido eficazmente IT con polen de gramíneas durante 3 ó 4 años. Al finalizar este periodo, a unos pacientes se les administró placebo y otros continuaron con IT durante 3 años más. Se añadió además al diseño del estudio un grupo control no tratado con IT. Entre los pacientes que inicialmente habían recibido IT, aquellos que continuaron con placebo tenían registros de síntomas y de consumo de medicación similares a los 3 años de suspender el tratamiento activo, pero hubo un discreto aumento de la sensibilidad cutánea y conjuntival al alérgeno comparado con los que continuaron con IT. Sin embargo, no hubo diferencias en la respuesta cutánea tardía a la inyección intradérmica del alérgeno, ni en la biopsia de esta respuesta en cuanto al número de células CD3+ infiltrantes o en cuanto a células que expresaran ARN-m para IL-4. Por el contrario, había marcadas diferencias en todos los parámetros entre estos dos grupos de pacientes inicialmente tratados y el grupo control. Concluyen que 3 ó 4 años de IT con polen de gramíneas es un tratamiento eficaz, incluso hasta 3 años después de finalizar el tratamiento.

Cools ⁸⁰ evaluó de forma retrospectiva el efecto de 5 años de IT con pólenes y ácaros en asmáticos 9 años después de finalizar el tratamiento, comparándolos con un grupo control de pacientes que no habían recibido IT. El riesgo de síntomas frecuentes de asma resultó ser 3 veces mayor en los pacientes controles que en el grupo tratado previamente con IT.

En los últimos años se ha atribuido a la IT, además de la eficacia clínica buscada, otros efectos importantes, como son la prevención del desarrollo de asma en pacientes con rinitis. La rinitis alérgica se asocia al asma bronquial con

una frecuencia del 20% al 40%. Aún sin presentar síntomas de asma, en muchos pacientes con rinitis se demuestra una hiperreactividad bronquial a histamina o metacolina y respuesta positivas a la provocación bronquial con alérgeno. En realidad, la rinitis y el asma son manifestaciones de la misma enfermedad alérgica y en muchos casos no son entidades claramente separadas ⁴⁹.

Möller ⁸¹, y cols. observaron los beneficios del uso de la inmunoterapia en las fases iniciales de la rinitis, previniendo así la aparición de asma, teniendo en cuenta que el grupo control contaba con más pacientes asmáticos que el grupo tratado con inmunoterapia.

Purello-D'Ambrosio ⁸², Pajno ⁸³ y cols. observaron en sus diferentes trabajos los beneficios del uso de la inmunoterapia en la prevención de nuevas sensibilizaciones en niños con síntomas respiratorios monosensibilizados a un alérgeno ambiental (ácaros, polen de gramíneas, olivo, parietaria o mezcla de Compuestas).

En conclusión, parece que el efecto de la IT no se reduce sólo a la mejoría clínica de las enfermedades alérgicas respiratorias sino que puede modificar el curso natural de la enfermedad, evitando su progresión.

3.3.6. Seguridad de la IT

Existe acuerdo general en que SCIT es un tratamiento bastante seguro cuando se administra adecuadamente y en las condiciones apropiadas⁷⁹.

Las reacciones adversas atribuidas a la IT con extractos alérgicos son reacciones de hipersensibilidad, reacciones inespecíficas y, en algunas

ocasiones, empeoramiento de la patología alérgica que se pretende tratar. Las reacciones de hipersensibilidad son las más frecuentes y potencialmente peligrosas. Siguiendo la clasificación de la E.A.A.C.I.⁷⁰ podemos distinguir entre reacciones locales, que se presentan en el lugar de la inyección, y las sistémicas, en que se detectan síntomas generalizados que se presentan a distancia del lugar de la inyección.

a) Reacciones Locales:

- Inmediatas: diámetro ≥ 5 cm (≥ 3 cm en niños) en los primeros 30 minutos de la inyección.
- Tardías: diámetro ≥ 10 cm (≥ 7 cm en niños) tras los primeros 30 minutos de la inyección
- Nódulos subcutáneos locales en el lugar de administración, que generalmente son indoloros y desaparecen a las pocas semanas.

b) Reacciones sistémicas:

- Grado 0: Sin síntomas
- Grado I: Reacciones inespecíficas, probablemente no IgE-mediadas (p.e. malestar general, cefalea, artralgia, etc)
- Grado II: Reacciones sistémicas leves (Rinitis o Asma leve que responde bien a antihistamínicos o β 2-agonistas inhalados)
- Grado III: Reacciones sistémicas sin compromiso vital (urticaria, angioedema o asma severo que responden bien al tratamiento)
- Grado IV: shock anafiláctico

Tanto las reacciones locales como las sistémicas pueden presentarse de forma inmediata (en los primeros 30 minutos) o tardía (después de los primeros 30 minutos de su aplicación). El tratamiento de estas reacciones adversas se comentará en el apartado de inmunoterapia de Material y Métodos.

Una parte importante de las reacciones adversas son debidas a errores humanos en la administración del tratamiento⁸⁴. Otros factores de riesgo son presencia de asma sintomático, alto grado de sensibilidad al alérgeno (determinado por pruebas cutáneas o *in vitro*), tratamiento coexistente con betabloqueantes, inyecciones de nuevos viales de extractos no estandarizados, no esperar al menos 20 minutos después de la inyección o inyecciones en el propio domicilio e inyecciones administradas durante la estación de exacerbación de síntomas. Todos estos errores pueden ser causa de reacciones adversas variadas que van desde reacciones locales a la muerte. En el estudio de Bernstein y cols, la mayoría de las reacciones mortales ocurrían en pacientes asmáticos, muchos no bien controlados⁸⁵. En este estudio se constató un retraso importante en la administración de adrenalina, e incluso en muchos de estos casos ni siquiera se llegó a administrar.

Los extractos alérgicos para inmunoterapia alérgeno-específica, incluso del mismo fabricante, se diferencian en su tendencia para producir efectos secundarios. En un estudio multicéntrico, prospectivo, llevado a cabo en Dinamarca y Copenhague por Winther y cols⁸⁶ con 1038 pacientes, se empleó IT subcutánea (SCIT) frente a diferentes extractos de pólenes y epitelios. Se observó que apenas hubo diferencias en la severidad de las reacciones adversas entre los diferentes extractos alérgicos salvo en el extracto de gramíneas, que fue el único que produjo reacciones severas de grado IV tras la

inyección ($p=0,02$), sin que tuviera nada que ver los antecedentes previos de asma ni el sexo del paciente. Los autores concluyeron en este estudio que los extractos alérgicos difieren entre sí en su tendencia para producir efectos secundarios.

De todo lo expuesto, se deduce que **la correcta administración y el exhaustivo control de la IT, reduce el riesgo de reacciones adversas y permite determinar mejor la eficacia del tratamiento**. En este sentido, como forma de llevar a cabo un control óptimo de seguridad y eficacia, el comité de inmunoterapia de la E.A.A.C.I. recomienda la creación de las denominadas Unidades de IT, pensadas como hospitales de día donde se administra este tratamiento. Estas Unidades de IT están dotadas de personal técnico entrenado y un médico especialista en esta modalidad terapéutica que supervisa de forma individualizada el tratamiento, siguiendo protocolos de actuación establecidos, que se van modificando con el tiempo en función de los resultados obtenidos. Este tipo de organización permite, además de minimizar el número de reacciones adversas debido a que se valora al paciente antes de cada administración de la dosis correspondiente, analizar las reacciones adversas y así determinar los factores de riesgo que intervienen en su aparición, realizar un seguimiento o evaluar nuevas pautas de administración⁷⁰.

3.3.7. Pautas de administración de los extractos alérgicos

La pauta de administración por vía subcutánea más extendida es la denominada **convencional**, que consiste en inyectar dosis crecientes del extracto una vez por semana hasta alcanzar una dosis prefijada considerada

eficaz, y posteriormente repetir esta dosis mensualmente. Habitualmente, en la pauta convencional no se alcanza la dosis máxima de mantenimiento hasta 3 meses después de iniciar el tratamiento.

Con el fin de reducir el número de visitas necesarias para alcanzar la dosis de mantenimiento, se han ensayado otras pautas de administración en la fase de incremento de dosis, como las pautas rápida (**rush**) y agrupada o semirrápida (**cluster**). Diferentes pautas se han venido realizando en numerosos ensayos clínicos con alérgenos inhalantes ambientales o en los últimos años para demostrar la seguridad de estas pautas y mejorar el cumplimiento. Con estas pautas, el principal problema puede ser un **aumento de reacciones adversas sistémicas** ⁷⁰.

Cada vez hay más experiencia en la utilización de pautas no convencionales de IT. Con alérgenos inhalantes ambientales se han venido realizando en los últimos años diferentes estudios.

Moreno C y cols ⁸⁷ llevaron a cabo un estudio en 306 pacientes con rinitis y/o asma por sensibilización a polen de olivo y/o gramíneas. Estos autores evaluaron una pauta cluster utilizando un extracto depot estandarizado, valorado en unidades de masa. Se obtuvieron 47 reacciones adversas, 40 locales y 39 sistémicas (12 de grado I, 11 grado II, 14 grado III y ninguna grado IV). La mayor frecuencia de reacciones sistémicas tuvieron lugar en el cluster 3, con el vial de máxima concentración. En un estudio posterior, estos autores modificaron la pauta de iniciación, aumentando la dosis en el cluster 1 y 2, consiguiendo así disminuir las reacciones sistémicas en el cluster 3. De este modo, concluyeron que la pauta mostraba un buen perfil de tolerancia

Tabar A.I. y cols ⁸⁸ realizaron un estudio comparativo doble ciego con pautas cluster y convencional para inmunoterapia subcutánea con extracto depot estandarizado en unidades de masa de *D. pteronyssinus*. Se recogieron 239 pacientes con rinitis con o sin asma bronquial por *D. pteronyssinus*. 120 de estos pacientes fueron asignados aleatoriamente a la pauta cluster, y 119 a la pauta convencional. Se recogieron las reacciones adversas, eficacia clínica, reactividad cutánea e inmunoglobulinas específicas para *D. pteronyssinus* antes de la inmunoterapia, una vez alcanzada la dosis máxima con ambas pautas y después de un año de tratamiento. Durante la fase de incremento de dosis hubo 19 reacciones adversas en 15 pacientes. Ocho de estas reacciones fueron sistémicas y de esas, 3 inmediatas y 5 tardías. Todas las reacciones adversas fueron moderadas (grado II). No hubo diferencias entre las dos pautas en frecuencia o tipo de reacciones adversas. Durante la fase de mantenimiento hubo 9 reacciones adversas en 8 pacientes. Dos fueron reacciones locales retardadas, que aparecieron 30 minutos después de la inyección. Siete fueron sistémicas; ninguna de ellas inmediata (una con síntomas inespecíficos y 6 con asma). En este estudio concluyeron que la pauta cluster ensayada es una alternativa segura a la inmunoterapia convencional, y que ofrece la ventaja de alcanzar una mejoría clínica e inmunológica en un período de tiempo más corto que con la pauta convencional.

Garde y cols ⁸⁹ realizaron un estudio prospectivo, observacional, multicéntrico y abierto, en el que se incluyeron 88 pacientes, con enfermedad alérgica respiratoria por sensibilización a *Salsola kali*. La administración de un extracto estandarizado biológicamente de *Salsola kali*, adsorbido en hidróxido de aluminio, se realizó por vía subcutánea, mediante dos esquemas de tratamiento:

agrupado (8 dosis en 4 visitas) o convencional (13 dosis en 12 visitas). Se registraron un total de 42 reacciones adversas en 26 pacientes (35 locales en 21 pacientes y 7 sistémicas en 6 pacientes). De las 7 reacciones sistémicas, 4 se registraron con la pauta agrupada y 2 con la convencional. No se registró ninguna reacción adversa grave. Estos investigadores concluyeron que la administración subcutánea de un extracto de *Salsola kali* es segura y bien tolerada, tanto cuando se administra con una pauta convencional como con una pauta agrupada.

C.Colás y cols.⁶ llevaron a cabo un estudio doble ciego controlado con placebo con pauta cluster para inmunoterapia subcutánea con un extracto despigmentado, polimerizado y adsorbido en hidróxido de aluminio de polen de *Salsola kali*. Sería la fase inicial del estudio que presentamos en esta tesis doctoral. Se reclutaron 60 pacientes con rinoconjuntivitis (19 de ellos además tenían asma) y se les asignó aleatoriamente al grupo activo (41 pacientes) o al grupo placebo (19 pacientes). Durante la fase de iniciación se registraron con el extracto modificado 16 reacciones locales en 8 pacientes y 10 reacciones locales en 4 pacientes del grupo placebo. Todas las reacciones locales fueron retardadas. De éstas reacciones locales 8 del grupo placebo y 9 del grupo activo fueron nódulos subcutáneos producidos por el hidróxido de aluminio. Se recogieron 4 reacciones sistémicas retardadas en 3 pacientes del grupo placebo, y 16 (4 inmediatas y 12 retardadas) en el grupo activo. Todas estas reacciones sistémicas fueron moderadas, de grado 2 (rinoconjuntivitis o prurito ótico) y se resolvieron sin medicación. Se concluyó con los resultados de este estudio que la inmunoterapia empleada en pauta cluster era segura.

En definitiva, las pautas cluster son mucho mejor toleradas que las rápidas, presentan un perfil de seguridad similar al obtenido con pautas convencionales en ensayos clínicos con pocos pacientes y mejoran el cumplimiento.

3.3.8. Indicaciones y contraindicaciones de la inmunoterapia con extractos alergénicos

En la actualidad, la IT únicamente está indicada en el tratamiento de la alergia a veneno de himenópteros y en las enfermedades alérgicas respiratorias. La IT con alimentos o con extractos de alergenios ambientales para el tratamiento de la dermatitis atópica está aún en fase experimental y no se debe utilizar mientras no se demuestre su eficacia en ensayos clínicos controlados⁵⁵.

Las indicaciones y las contraindicaciones de la IT para el tratamiento de la rinitis y el asma atópicas se detallarán en el apartado de la selección de pacientes del capítulo de Material y Métodos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La inmunoterapia específica con alérgenos es la única vía de la que dispone el alergólogo para lograr mejorar o curar, parcial o definitivamente, un proceso alérgico ⁵⁵.

Un campo en el que se ha avanzado de forma importante en los últimos años ha sido el de mejorar la calidad de los extractos alérgicos por medio de adecuados procesos de estandarización biológica, obteniéndose extractos más puros y potentes, responsables no obstante de un mayor número de reacciones adversas. Para obviar o disminuir este riesgo se han realizado diversos intentos encaminados a incrementar la seguridad, es decir, disminuir los efectos secundarios manteniendo o aumentando la efectividad.

La inmunoterapia convencional emplea adyuvantes para estimular las respuestas inmunes de los alérgenos administrados, mejorando la eficacia. Al mismo tiempo estos adyuvantes reducen la cantidad de alérgeno administrado mejorando la seguridad de la inmunoterapia ⁹⁰. Desde hace más de 60 años para los extractos depot o retardados se ha empleado como adyuvante hidróxido de aluminio ^{91,92}.

Otro tipo de modificación más reciente de las vacunas alérgicas son los alergoides o extractos polimerizados. Son vacunas modificadas con formaldehído ^{93,94}, glutaraldehído ⁹⁵ y alginato ⁹⁶. Distintos estudios han demostrado que la eficacia clínica se mantiene en estas vacunas modificadas y que los preparados de alto peso molecular son más seguros que las vacunas acuosas no modificadas ^{5,97}.

Sabemos que el polen de las Quenopodiáceas causa alergia respiratoria, que este polen constituye el 5% del total de los pólenes anuales recogidos y que

sensibiliza hasta el 42% de los polínicos en esta área, ocupando el tercer lugar entre la población polínica de esta región ^{15,16}.

En el área de Zaragoza, la mayor parte de los pacientes alérgicos a quenopodiáceas lo son a *S. Kali*, siendo extremadamente baja la sensibilización a quenopodio.

Debido a la alta prevalencia de sensibilizaciones a polen de *S.kali* en el área de Zaragoza y a la escasez de estudios sobre inmunoterapia con extracto de *S.kali*, los Dres. Colás, Lezaún y cols. llevaron a cabo un ensayo clínico prospectivo doble-ciego controlado con placebo para evaluar la eficacia y la seguridad de la inmunoterapia con un extracto despigmentado, polimerizado y adsorbido en hidróxido de aluminio, frente a pacientes tratados con placebo. Los resultados de esta primera parte ya fueron publicados por el Dr. Colás y cols ⁶. y presentados por la Dra. Monzón en su tesis doctoral ⁹⁸. Se demostró que la utilización del alergoide de polen de *S. kali* frente a placebo es eficaz y segura.

Debido a la escasez de estudios sobre comparación de eficacia y seguridad de la inmunoterapia con extractos polimerizados y depot convencionales, y mucho menos de largos períodos de seguimiento, nos planteamos continuar con el estudio de la fase anterior, tratando a los pacientes del grupo placebo con un extracto depot convencional, con el **objetivo** de comparar un extracto polimerizado, despigmentado de polen de *S.kali* frente a un extracto depot convencional, durante los años 2002,2003 y 2004.

Para ello se realizó el seguimiento de los siguientes parámetros:

- ✓ **Valoración de la sintomatología** de los pacientes mediante:
 - Registro de síntomas y del consumo de medicación mediante cartillas de seguimiento
 - Escala Analógica Visual
 - Cuestionario de calidad de vida para rinitis (RQLQ)

- ✓ Modificación de los **test *in vivo***:
 - Medición de la reactividad cutánea al alérgeno mediante prueba de prick-test y análisis de la variación de la superficie de la pápula a lo largo del estudio.
 - Prueba de provocación nasal

- ✓ Modificación de los **tests *in vitro***:
 - IgE total
 - IgE alérgeno-específica
 - IgG₄

- ✓ Evaluación de la **seguridad** mediante registro de todos los acontecimientos adversos que sean observados por el personal investigador, y los comunicados espontáneamente por los participantes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio comenzó siendo un ensayo clínico prospectivo, doble ciego controlado con placebo. En una primera parte, se seleccionaron 60 pacientes que fueron distribuidos, según un listado de números aleatorios, en dos grupos: el **grupo activo** con 41 pacientes, que sería tratado con un alergoide de polen de *Salsola kali* y el **grupo placebo** con 19 pacientes. Esta primera parte del estudio tuvo un año de duración. En ella se evaluó la clínica de los pacientes tratados con alergoide de *S.kali* frente a la de los pacientes tratados con placebo. Los resultados de esta primera parte ya fueron presentados por la Dra. Monzón en su tesis doctoral ⁹⁸. Posteriormente, los pacientes del grupo placebo recibieron inmunoterapia con un extracto depot de *S.kali* y pasarían a llamarse **Grupo retard**. El grupo activo continuó recibiendo inmunoterapia con alergoide que había comenzado hacía un año y pasó a llamarse **Grupo Depigoid**. En esta segunda parte del estudio se comparó la evolución clínica de los dos grupos de pacientes que participaron en el estudio. La duración fue de 3 años.

2. EXTRACTOS ALERGENICOS DE S.KALI

Los extractos de *Salsola kali* fueron suministrados por C.B.F. LETI. El extracto para el grupo Depigoid es un extracto despigmentado, polimerizado con glutaraldehído y adsorbido en hidróxido de aluminio (Depigoid®). El extracto para el grupo Retard es un extracto adsorbido en hidróxido de aluminio (Retard®).

A lo largo de todo el estudio se empleó el mismo extracto de *S. kali*, en estado nativo para las pruebas de diagnóstico y modificado para el tratamiento.

2.1. Producción de los extractos

2.1.1. Extracto Nativo (N)

Cien gramos de polen de *Salsola kali* previamente desengrasados con éter se extrajeron mediante agitación mecánica con 1 litro de PBS 0.01M - NaCl 0.15M – Tween-20 0.05% durante 4 horas en cámara fría (3-8°C). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 4500 rpm, en frío (3-8°C) durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall. Se recogió el líquido sobrenadante que se guardó en cámara fría, y el sedimento se volvió a extraer con 1 litro de PBS 0.01M - NaCl 0.15M – Tween-20 0.05% durante 4 horas en cámara fría (3-8°C). Pasado este tiempo se centrifugó en idénticas condiciones que las anteriores, se recogió el sobrenadante y se juntó con el anterior.

El extracto final se filtró secuencialmente por membranas de 0.8, 0.4 y 0.22 micras, obteniendo un volumen final de 1700 ml. Para eliminar todos los componentes libres en el extracto que tienen un peso molecular inferior a 3000 Daltons, este extracto se sometió a un proceso de diálisis tangencial en un sistema Pellicon (Millipore) con membranas cuyo punto de corte era de 3000 Daltons. Una vez dializado se filtró secuencialmente por membranas de 0,8, 0,4 y 0,22 micras y se liofilizó.

Parte de este extracto se empleó para continuar el proceso de obtención del extracto Depigoid® con el paso de despigmentación y con el de polimerización. Otra parte de este extracto se empleó para obtener el extracto E.H. Retard® con la adsorción en hidróxido de aluminio, mientras que una pequeña parte de conservó para que sirviera de referencia para los estudios de comparación con los nuevos productos (estandarización).

2.1.2. Extracto Despigmentado (DP)

Tres mil setecientos cuarenta y cuatro mg de liofilizado de extracto nativo se reconstituyeron con agua bidestilada para que quedaran a una concentración final de 10 mg/ml (374,4 ml). Para eliminar los pigmentos que permanecen absorbidos a las proteínas se realizó el proceso de despigmentación (diálisis a pH ácido). Bajo agitación constante y a temperatura ambiente se ajustó el pH del extracto a 2.5 con una solución de HCl 2N, y finalmente a 2,0-2,1 con una solución de HCl 0,1 N. Este extracto se introdujo en bolsas de diálisis de celofán (punto de corte 3500 Daltons). El proceso de diálisis se realizó durante 17 horas contra 10 volúmenes de agua de segunda ósmosis a 4-8°C, seguido de 4 horas a la misma temperatura con 4 cambios de 10 volúmenes de agua de segunda ósmosis (1 cambio cada hora)⁹⁹.

Una vez concluido este proceso, se recogió el líquido de las bolsas de diálisis y se ajustó a 390 ml. Bajo agitación constante y a temperatura ambiente, el pH se ajustó hasta 6,5 con una solución de NaOH 1N, y finalmente a 7,0-7,1 con una solución de NaOH 0.1N.

Posteriormente el extracto DP se clarificó mediante centrifugación a 10000 rpm, en frío (4-8°C), durante 30 minutos (centrífuga Sorvall). El extracto final se filtró secuencialmente por membranas de 0,8, 0,4 y 0,22 micras, ajustando el volumen final a 390 ml con agua de segunda ósmosis y se liofilizó.

La mayor parte de este extracto se empleó para continuar el proceso con el paso de polimerización; mientras que una pequeña parte se conservó para los estudios de comparación con el extracto N y los productos posteriores.

2.1.3. Extracto Despigmentado Polimerizado (DPP)

Ochocientos sesenta y siete mg de liofilizado de extracto despigmentado se reconstituyeron con PBS 0,01M para que quedaran a una concentración final de 15 mg/ml (57,8 ml).

En condiciones de agitación mecánica constante y temperatura ambiente se realizó el proceso de polimerización añadiendo, gota a gota, 0,52 ml de glutaraldehído grado I al 50%. La agitación mecánica se mantuvo durante 7 horas a temperatura ambiente. El proceso de polimerización con glutaraldehído se paró mediante la adición de 2313 mg de glicina, manteniendo la agitación durante 18 horas en cámara fría (4-8°C) ¹⁰⁰.

Para eliminar la glicina y todos los componentes del extracto que no han polimerizado y que tienen un peso molecular inferior a 100 kDa, este extracto se sometió a un proceso de diálisis tangencial en un sistema Minitan (Millipore) con membranas de 100 kDa. Una vez dializado se filtró secuencialmente por membranas de 0,8, 0,4 y 0,22 micras y se liofilizó.

2.2. Caracterización y Estandarización de los extractos

En cada uno de los extractos se determinó el contenido proteico empleando el método de Bradford ¹⁰¹, el contenido de nitrógeno proteico empleando el método de micro-Kjeldahl, la capacidad de unión frente a IgE e IgG específicas mediante métodos de ELISA de inhibición ^{102, 103}. La caracterización de las proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y tiéndolos con el colorante Coomassie brilliant blue; como marcador de pesos moleculares se empleó el

estándar low molecular weight de BioRad, que utiliza proteínas de peso molecular conocido: fosforilasa B (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa). La cuantificación de las bandas que aparecieron en los geles se realizó mediante densitometría, empleando un escáner Sharp JX-330 junto al software para tratamiento de imágenes Image Master 1D ELITE versión 4.00. La determinación de la cantidad de alérgeno principal de *S. kali* (Sal k 1) se realizó mediante densitometría²⁷. El grado de polimerización se comprobó determinando, en los tres extractos, las aminas primarias empleando el método fluorométrico (Floram), basado en la reacción casi inmediata de la fluorescamina con dichas aminas primarias^{104, 105} que produce compuestos fluorescentes que son estables durante horas en la oscuridad.

Contenido proteico

El contenido de proteínas de los extractos fue de 246, 163 y 334 µg por mg de extracto liofilizado N, DP y DPP, respectivamente. La cantidad de unidades de nitrógeno proteico fueron respectivamente 7560, 6612 y 6132 por mg de liofilizado.

La cantidad de cada uno de estos extractos necesaria para producir el 50% de inhibición frente a IgE específica fue de 0,043 µg para el N, 0,313 para el DP y 1,408 mg para el DPP.

La cantidad de cada uno de estos extractos necesaria para producir el 50% de inhibición frente a IgG específica fue de 2,032 µg para el N, 1,684 para el DP y 0,309 mg para el DPP.

Contenido de alergen principal

El extracto N contenía 33,6 µg de Sal k 1 por mg de extracto liofilizado. En el extracto DPP la cantidad de Sal k 1 fue indetectable debido al proceso de polimerización que hace que los determinantes antigénicos que son reconocidos por el anticuerpo monoclonal sean inaccesibles a éste. El extracto E.H. Retard® contenía 6,38 µg de Sal k 1.

Determinación de aminas primarias

En el extracto N se detectaron 85,18 µg por mg de extracto liofilizado, en el DP 84,07 µg/mg y en el DPP 2,55 µg/mg. La reducción observada entre los valores del extracto nativo los obtenidos en el DPP es superior al 98%.

2.3. Extracto para tratamiento

Para el **grupo Depigoid** se empleó un extracto alergénico de polen de *S.kali* modificado en solución salina (0,9%) con fenol al 0,5%, despigmentado, polimerizado con glutaraldehído y adsorbido en hidróxido de aluminio (3 gr/l) (**Depigoid**®).

Se presenta en dos concentraciones para establecer una pauta de administración progresiva:

*** Vial nº1**

Corresponde a una concentración máxima de alergen que tenía 100 HEP/ ml antes del proceso de despigmentación y polimerización, o lo que es lo mismo, 100 DPP/ml tras el proceso (1 DPP es el resultado de despigmentar y polimerizar 1 HEP). La potencia residual después del proceso de modificación química fue de 0,33 HEP/ml.

* **Vial nº2**

Corresponde a una concentración máxima de alérgeno que tenía 1000 HEP/ml antes del proceso de despigmentación y polimerización, o lo que es lo mismo 1000 DPP/ml tras el proceso. La potencia residual después del proceso de modificación química fue de 3,3 HEP/ml.

Para el **grupo Retard** se empleó un extracto alérgico de polen de *S.kali* modificado en solución salina (0,9%) con fenol al 0,5% y adsorbido en hidróxido de aluminio (3 gr/l) (**E.H. Retard**®).

Se presenta en cuatro concentraciones para establecer una pauta de administración progresiva:

* Vial nº1

Corresponde a una concentración máxima de alérgeno de 0,1 HEP/ml

* Vial nº2

Corresponde a una concentración máxima de alérgeno de 1 HEP/ml

* Vial nº3

Corresponde a una concentración máxima de alérgeno de 10 HEP/ml

* Vial nº4

Corresponde a una concentración máxima de alérgeno de 100 HEP/ml

2.4. Extracto para pruebas cutáneas

Inmediatamente antes de la realización de las pruebas cutáneas se diluía el extracto liofilizado con Solución Salina fenolada (0.05% de fenol) para obtener las siguientes concentraciones: 100 HEP/ml, 10 HEP/ml, 1 HEP/ml y 0,1 HEP/ml de alérgeno.

3. INMUNOTERAPIA

El **grupo Depigoid** continuó con las dosis de mantenimiento mensuales con Depigoid®, (0,5 ml, vial 2 de 1000 HEPL/ml) siguiendo una pauta coestacional, durante 2 años más.

El **grupo Retard** inició la inmunoterapia con E.H. Retard® siguiendo la pauta de la **tabla 2**. Se continuó con el mantenimiento (0,5 ml, vial 4 de 100 HEPL/ml) durante 3 años.

Tabla 2: Pauta iniciación grupo Retard

Día	Vial	HEPL/ml	ml
1	2	1	0.1+0.3+0.5
3	3	10	0.1+0.3+0.5
5	4	100	0.1+0.3+0.5
15 días	4	100	0,5
mes	4	100	0,5

3.1. Protocolo de administración de inmunoterapia

Todos los pacientes acudieron al Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza para la administración del tratamiento durante todo el periodo del estudio.

Antes de la administración de la IT se realizaba un interrogatorio sobre el estado de salud del paciente, la gravedad de los síntomas alérgicos, la tolerancia de la inmunoterapia administrada y la existencia de reacciones adversas desde la última visita; además se realizaba la medición del Flujo Espiratorio Máximo en tres ocasiones para anotar la mejor junto con la dosis de inmunoterapia administrada.

El paciente permanecía durante 30 minutos en observación antes de marcharse. Se medía nuevamente el FEM, anotando la mejor de las tres mediciones realizadas y se citaba para la próxima visita. En el caso de que alguien tuviera una reacción adversa posterior a los 30 minutos de observación, el paciente acudía de nuevo para comunicárnoslo o al Servicio de Urgencias hospitalario más próximo para su tratamiento. Se realizó un registro de cada dosis administrada y de las reacciones adversas locales y sistémicas, que fueron clasificadas y tratadas según la normativa del Immunotherapy Subcomité de la E.A.A.C.I.⁷⁰.

Se comparó la seguridad de la inmunoterapia en ambos grupos de pacientes en la fase de iniciación y de mantenimiento durante los 3 años de tratamiento.

3.2. Reacciones adversas de la inmunoterapia

Siguiendo la clasificación de la E.A.A.C.I.⁷⁰, las reacciones se clasificaron en:

a) Reacciones Locales:

- Inmediatas: diámetro ≥ 5 cm (≥ 3 cm en niños) en los primeros 30 minutos de la inyección.
- Tardías: diámetro ≥ 10 cm (≥ 7 cm en niños) tras los primeros 30 minutos de la inyección
- Nódulos subcutáneos locales en el lugar de administración, que generalmente son indoloros y desaparecen a las pocas semanas.

b) Reacciones sistémicas:

- Grado 0: Sin síntomas
- Grado I: Reacciones inespecíficas, probablemente no IgE-mediadas (p.e. malestar general, cefalea, artralgia, etc)

- Grado II: Reacciones sistémicas leves (Rinitis o Asma leve que responde bien a antihistamínicos o β 2-agonistas inhalados)
- Grado III: Reacciones sistémicas sin compromiso vital (urticaria, angioedema o asma severo que responden bien al tratamiento)
- Grado IV: shock anafiláctico

3.2. Tratamiento de las reacciones adversas

El tratamiento de las reacciones adversas fue el recomendado por la E.A.A.C.I.⁷⁰:

-Reacciones locales inmediatas:

Si el diámetro de la reacción era menor de 5 cm se continuaba con la pauta; si el diámetro era mayor de 5 cm se inyectaba la dosis anterior tolerada, para después intentar seguir con la pauta establecida.

-Reacciones locales tardías:

Si el diámetro mayor era menor de 10 cm se continuaba con la misma pauta; si el diámetro mayor era superior a 10 cm se repetía la última dosis tolerada. Sólo se trataron aquellas reacciones locales tardías que ocasionaran un gran malestar en el paciente. Por orden las medidas a adoptar fueron: aplicación de frío en el área afectada, antihistamínicos orales, esteroides orales (sólo cuando la reacción persistiera más de 48 horas).

-Reacciones sistémicas:

- Rinitis: antihistamínico oral. Observación durante 60 minutos.
- Urticaria leve: antihistamínico oral o parenteral. Observación durante 60 minutos.

- Urticaria generalizada, angioedema o asma:
 - Adrenalina (1mg/ml): 0,3-0,5 ml subcutáneo o intramuscular
 - Infiltración local del lugar de inyección con adrenalina (0,2-0,5 ml).
 - Control de tensión arterial y pulso.
 - Establecer una vía venosa periférica.
 - Antihistamínico oral o parenteral.
 - Corticoides orales o parenterales.
 - En caso de obstrucción bronquial:
 - Leve o moderada: β_2 -agonistas inhalado
 - Grave: (FEV1<50%): β_2 -agonistas (0,5mg/ml) intravenosos (0,25-0,5 mg) y/o teofilina (22mg/ml) intravenosa (200-400mg) en 15 minutos. Considerar hospitalización.

- Choque anafiláctico:
 - Adrenalina (1mg/ml): 0,5-0,8 subcutánea o intramuscular. En caso de ponerse intravenosa (0,1 mg/ml): 0,3-0,5 mg, fraccionados en dosis de 0,1 mg. Se podrá repetir tras 5-15 minutos.
 - Infiltración local del lugar de inyección con adrenalina (0,2-0,5 ml).
 - Colocar al paciente en posición de Trendelemburg.
 - Establecer una vía venosa de acceso periférico con suero fisiológico y valorar expansores del plasma.
 - Oxígeno a un flujo de 5-10 l/min.
 - Torniquete proximal a la inyección.
 - Antihistamínicos intravenosos.

- Corticoides intravenosos (metilprednisolona: 80-120 mg).
- En caso de obstrucción bronquial, como en el anterior apartado.
- Hospitalización necesaria por el riesgo de choque anafiláctico recurrente.

4. RECUENTO DE POLENES

Los datos de los recuentos de pólenes fueron cedidos por los **Dres. Pola y Zapata**, responsables de la estación de recuentos de pólenes de la SEAIC en Zaragoza, que consta de un captador de pólenes de tipo **Burkard**, a 15 m de altura y con un flujo de aspiración de 10 L/min. El recuento polínico se realizó siguiendo las recomendaciones de la Asociación Europea de Aerobiología ¹⁰⁶.

5. VALORACIÓN CLINICA

La valoración de la sintomatología de los pacientes se realizó mediante la cumplimentación de cartillas de síntomas a lo largo de la época polínica de *S. kali*. En estas cartillas se recogían detalladamente la valoración subjetiva del paciente de la existencia de síntomas oculares, nasales y bronquiales y el consumo de medicación.

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

Para evaluar el impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes se utilizaron unos cuestionarios de calidad de vida para rinitis.

5.2. Registro de síntomas

La valoración de la sintomatología de los pacientes se realizó mediante la cumplimentación de **cartillas de síntomas** a lo largo de la época polínica de *S. kali*. En estas cartillas se recogían los síntomas oculares, nasales y bronquiales. El modelo de cartilla queda recogido en el **Anexo I**. En una primera página de la cartilla de síntomas constaban sus iniciales, el número que se les había asignado y la semana en la que se encontraban. En la segunda página iban calificando cada día por la mañana y por la noche la intensidad de sus síntomas nasales, oculares y bronquiales, según los siguientes criterios:

0=Ninguna (sin síntomas evidentes)

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

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

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

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

Al final del estudio se comparó la gravedad de los síntomas en los dos grupos de pacientes.

5.3. Registro de consumo de medicación

La valoración de la puntuación del consumo de medicación se realizó, con ligeras modificaciones, siguiendo la metodología empleada por Dreborg ¹⁰⁷, mediante la cumplimentación de **cartillas de medicación** en época polínica. El modelo de cartilla queda recogido en el **Anexo II**. A cada tratamiento le era asignada una puntuación; la medicación sintomática era prescrita gradualmente según criterio médico y el paciente la tomaba según la intensidad de sus síntomas. La puntuación de medicación queda recogida en la **tabla 3**.

Tabla 3. Puntuación de medicación en la cartilla de medicación

FÁRMACO	POSOLOGÍA	PUNTUACIÓN	TRATAMIENTO ESCALONADO
Clarityne 10mg , comp.	1 comp / 24 h	1 comp. = 1 PUNTO	Rinitis 1 ^{er} nivel
Stopcold , cápsulas	1 cápsula / 12 h	2 cápsulas = 2 PUNTOS	Rinitis 2 ^o nivel
Nasacort inhalador	2 inhalaciones en cada fosa, cada 24 h	2+2 inh. = 3 PUNTOS	Rinitis 3 ^{er} nivel
Afluon colirio	1 gota en cada ojo, cada 12h	2+2 gotas =1 PUNTO	Conjuntivitis 1 ^{er} nivel
Terbasmán turbuhaler (0,5 mg)	A demanda	1 inhal =1 PUNTO	Asma 1 ^{er} nivel
Pulmicort turbuhaler (200 µg)	1 - 2 inhal / 12h	1 inhal =1 PUNTO	Asma 2 ^o nivel
Dacortín 30 mg, comp.	1 comp. al día durante 5 días	1 tanda = 30 PUNTOS	Asma 3 ^{er} nivel

5.4. Escala analógica visual

La evaluación subjetiva de la evolución de la enfermedad se realizó mediante una escala analógica visual; sobre una línea de 10 cm de longitud el paciente valoraba su situación clínica desde 0 (muy mal) hasta 10 (muy bien), señalando con una cruz sobre esa línea ⁷⁰.

5.5. Cuestionarios de calidad de vida para rinitis

Todos los pacientes, cada año de tratamiento, cumplimentaron un cuestionario de calidad de vida específico para rinitis mediante el cual evaluamos el impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes. Dicho cuestionario fue la versión española validada del Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire (**RQLQ**)¹⁰⁸, con la autorización y siguiendo las recomendaciones de su autora, la Prof. **Junniper** ¹⁰⁹.

A partir de 2003, los AQLQ no se analizaron debido a que sólo contábamos con 19 pacientes asmáticos y la mayoría de ellos de tipo intermitente, por lo que además de no ser la muestra lo suficientemente representativa, los síntomas no serían constantes.

La diferencia mínima importante (DMI) se define como la diferencia más pequeña en la puntuación de un dominio de interés que el paciente percibe como beneficiosa. Un cambio de 0,5 puntos o más sobre la puntuación basal puede considerarse que tiene una relevancia clínica, y por lo tanto es adecuado para cambiar el tratamiento del paciente ¹¹⁰.

6. PRUEBAS IN VIVO

6.1. Pruebas cutáneas

Se realizaron según el procedimiento descrito por Osterballe en 1979 ¹¹¹, con el extracto de *S. kali* mencionado en el apartado de material, mediante lancetas estandarizadas (Prick-Lancett BN. Dome /Hollister-Stier). Como control positivo se utilizó clorhidrato de histamina a 10 mg/ml y como control negativo solución salina. Se realizaron pruebas cutáneas en prick-test por duplicado en concentraciones de 0.1,1,10 y 100 HEP. Se siguieron las recomendaciones del Subcomité on Skin Test de la E.A.A.C.I ⁶⁹. Entre ellas se recogen los siguientes criterios:

-Se efectuaron por la misma persona y con el mismo tipo de lanceta durante todo el estudio.

-Se realizaron en la cara anterior del antebrazo disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm y comenzando a unos 3 cm de la flexura del codo y hacia la muñeca hasta 5cm de la misma. En el antebrazo opuesto se dispusieron las concentraciones en orden inverso.

-Se hicieron por duplicado para cada concentración de antígeno y de los controles positivo y negativo. El tiempo de lectura fue de 15 minutos para todos los pacientes.

-No recibieron ningún tipo de medicación que pudiera modificar la respuesta cutánea.

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

La comparación de grupos se realizó determinando la respectiva recta de regresión dosis-respuesta, empleando el método de los mínimos cuadrados, calculando las constantes X e Y, para describir la ecuación: $\log (m) = a+b \times \log (C)$, siendo:

- m: media geométrica del área de las dos pápulas provocadas por cada una de las concentraciones del alérgeno(mm^2)
- C :concentración de alérgeno(HEP/ml)
- a: ordenada en el origen
- b: pendiente

En cada paciente se calculó la dosis de extracto alérgico que producía el mismo tamaño de pápula que el control positivo (**valor 10 HEP**). Para calcular la cantidad de alérgeno que produciría una pápula de igual tamaño que el control positivo (10 HEP individuales) se interpola el valor de la media geométrica (mm^2) del área de la pápula producida por la histamina (m-H) en la ecuación anterior obteniendo el correspondiente valor C (=CH), por tanto, CH es la concentración necesaria de alérgeno que produciría una pápula cuya área es igual a la producida por la histamina a 10 mg/ml en un determinado paciente. Esta operación se realiza para cada paciente. El valor que corresponde a la

mediana CH (en mg/ml) de todos los pacientes representa la concentración que corresponde a 10 HEP/ml para la población ¹¹².

6.2. Prueba de provocación nasal

Las pruebas de provocación nasal tratan de estudiar la confirmación o el descarte de un posible alérgeno cuando la anamnesis y las pruebas cutáneas no concuerdan completamente, así como comprobar los efectos terapéuticos de un determinado tratamiento sobre la vía nasal. También se han utilizado con fines de investigación, para comprender la fisiopatología nasal y para probar fármacos potencialmente beneficiosos ^{113,114}.

Se realizaron 3 mediciones del **pico flujo nasal inspiratorio** (PFNI), que tenían que tener un valor >100 L/min, considerándose el valor basal a la mayor de las mismas. En primer lugar, la provocación se realizaba con solución salina. Si ésta no producía síntomas ni una variación >10% en el PFNI se administraban concentraciones progresivamente mayores del extracto hasta obtener una respuesta positiva. Se consideraba la prueba positiva si se cumplían al menos uno de los siguientes criterios:

- **5 o más estornudos**
- **disminución \geq 50% del PFNI**

7. PRUEBAS IN VITRO

7.1 Determinación de IgE específica frente a *S. kali* e IgG4

Se obtuvieron muestras de sangre de cada paciente, cada año, para determinar la IgE total, IgE específica frente a *S.kali* y la IgG4.

Las muestras de suero de los pacientes se obtuvieron por punción venosa y posterior centrifugación a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación con una pipeta pasteur se aspiró el suero y se distribuyó en alícuotas congelándose a -20°C hasta el final del estudio para proceder a su análisis inmunológico el mismo día y por el mismo técnico de laboratorio.

Las determinaciones se realizaron por ELISA¹¹⁵. Los valores de IgE específica se expresaron en densidades ópticas (DO).

1. CRONOGRAMA DEL ESTUDIO

La duración del estudio fue de 3 años. El seguimiento constó de 3 tiempos (T1, T2 y T3) (**tabla 4**).

Tabla 4: Tiempos de seguimiento del estudio

T0		Año 3		
		T1	T2	T3
2000	2001	2002	2003	2004
-----	D	D	D	-----
-----	P	R	R	R

A:Grupo Activo, P:Grupo Placebo, D:Grupo Depigoid, R:Grupo Retard

De la línea vertical a la izquierda se representa el cronograma de la primera parte del estudio. De la línea vertical a la derecha se representa el cronograma de la segunda parte del estudio. T0 se corresponde con el año 2000. En ese

tiempo se inició el estudio. Ninguno de los dos grupos llevaba tratamiento. T1 se corresponde con el año 2002. En este tiempo el grupo Depigoid llevaba 2 años de inmunoterapia y el grupo Retard un año. T2 se corresponde con el año 2003. En este tiempo el grupo Depigoid concluía su inmunoterapia de 3 años de duración y el grupo Retard llevaba 2 años de inmunoterapia. T3 corresponde a 2004. En este tiempo el grupo Retard concluía su inmunoterapia después de 3 años de tratamiento. Se denominó Año 3 al T2 del grupo Depigoid y al T3 del Retard; es decir, al tercer año de tratamiento para ambos grupos.

En cada tiempo de seguimiento se recogieron las cartillas de síntomas, se obtuvo suero, se realizaron las pruebas in vivo, la prueba de provocación nasal y se les entregó los RQLQ y la escala analógica visual.

2. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se comparó la evolución clínica entre los dos grupos de pacientes (Depigoid y Retard) durante los años 2002, 2003 y 2004, y se compararon los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro* antes de comenzar el tratamiento y al finalizarlo. El período de estudio de síntomas y medicación fue desde el 15 de julio hasta el 15 del septiembre. El nivel de rechazo de la hipótesis nula para los tests estadísticos que se usan se situó en $\alpha = 0,05$.

Para la **estadística descriptiva** de los resultados de las puntuaciones de síntomas y medicación, RQLQ, EAV y valores 10 HEP se empleó la media (con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%), la desviación estándar, la mediana (con los percentiles del 25 y 75%).

Para **estadística comparativa** se han empleado análisis estadísticos no paramétricos: para comparar dentro de un mismo grupo los valores obtenidos en

dos determinaciones distintas se ha empleado el **test de Wilcoxon** para datos pareados (paramétrico). Se ha empleado el **test de Mann-Whitney** para datos no pareados para comparar entre los dos grupos la media diaria de la puntuación de síntomas, de medicación, la puntuación conjunta de síntomas más medicación, la calidad de vida en rinitis (RQLQ) y valores 10 HEP.

El **test exacto de Fisher** se ha empleado para la comparación entre grupos de los días que no rellenaron los diarios de síntomas y los días libres de síntomas, medicación y síntomas + medicación.

Para comparar dentro de un mismo grupo los valores obtenidos en dos determinaciones distintas se ha empleado el **test de Wilcoxon** para datos pareados (paramétrico). El **test no paramétrico de Friedman** se empleó para evaluar la evolución de la puntuación de síntomas, de medicación, la puntuación conjunta de síntomas más medicación a lo largo de los años 2002, 2003 y 2004.

Las **tablas de contingencia** y el **test estadístico de χ^2** se utilizaron para evaluar la evolución dentro de un mismo grupo y analizar las diferencias entre los grupos de los test de provocación nasal.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Al inicio de la segunda parte del estudio, el número de pacientes en el grupo Depigoid fue de 41 y en el Retard de 19. No hubo diferencias significativas en ambos grupos en cuanto a edad, sexo y tipo de patología (**tabla 5**).

Tabla 5: Características de los pacientes

	Depigoid	Retard
Número de pacientes	41	19
Sexo (M/F)	11/30	5/14
Edad		
Media	34	33
Rango	18-51	18-51
Número de pacientes con asma	13	6

En el 2002 dos pacientes del grupo Depigoid y dos del grupo Retard abandonaron el estudio y no proporcionaron ningún dato de puntuación de síntomas y medicación, ni ningún dato de calidad de vida. En el 2003 dos pacientes del grupo Depigoid abandonaron el estudio sin proporcionar datos. En el 2004 los pacientes del grupo Depigoid hacía un año que habían terminado la inmunoterapia. Solo 14 pacientes de este grupo proporcionaron datos. Cuatro pacientes del grupo Retard abandonaron el estudio ese año sin proporcionar datos. Así pues, el estudio fue concluido por 27 pacientes, 13 del grupo Retard y 14 del grupo Depigoid (**tabla 6**).

Tabla 6: Abandonos del estudio

	Depigoid	Retard
Número de pacientes	41	19
Abandonos 2002	2	2
Abandonos 2003	2	0
Abandonos 2004	----	4

2. NIVELES DE PÓLENES DE LAS QUENOPODIÁCEAS

La época de máxima polinización de *Salsola kali* en la provincia de Zaragoza abarca desde mediados de Julio hasta mediados de Septiembre.

Durante el periodo comprendido entre el 15 de julio y el 15 de septiembre de 2002 la media de pólenes de quenopodiáceas fue de 8,95 (IC del 95%: 7,46-10,45), y la mediana de 8 (rango intercuartílico: 4,5-13) (**figura 5**).

Durante el periodo comprendido entre el 15 de julio y el 15 de septiembre de 2003 la media de pólenes de quenopodiáceas fue de 10,75 (IC del 95%: 8,56-12,93), y la mediana de 9 (rango intercuartílico: 3-15) (**figura 6**).

Durante el periodo comprendido entre el 15 de julio y el 15 de septiembre de 2004 la media de pólenes de quenopodiáceas fue de 7,08 (IC del 95%: 5,1-9,04), y la mediana de 4 (rango intercuartílico: 1-11) (**figura 7**).

3. VALORACIÓN CLÍNICA

Se estudió la evolución clínica de los dos grupos de pacientes (Depigoid y Retard) durante los años 2002, 2003 y 2004. **El período de estudio de síntomas y medicación fue desde el 15 de julio hasta el 15 de septiembre.**

3.1. PUNTUACIONES DE SÍNTOMAS

Durante el período de estudio en el **año 2002**, la media diaria de síntomas del grupo Depigoid fue de 3,95 (IC del 95% 3,79-4,12) y la mediana de 3,93 (3,43-4,43). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 6,23 (IC del 95% 5,89-6,57) y la mediana de 6,29 (5,28-7,20). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p < 0,0001$, test de Mann-Whitney, **tabla 7**).

Tabla 7. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas en el año 2002

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	3,95 (3,79-4,12)	6,23 (5,89-6,57)	<0,0001
Mediana	3,93 (3,43-4,43)	6,29 (5,28-7,20)	<0,0001
Número de pacientes	39	17	

La **figura 5** muestra la evolución de la puntuación de síntomas a lo largo del período de estudio en el año 2002. A simple vista vemos que el grupo Depigoid obtuvo menores puntuaciones de síntomas. Esta diferencia entre los grupos es muy significativa.

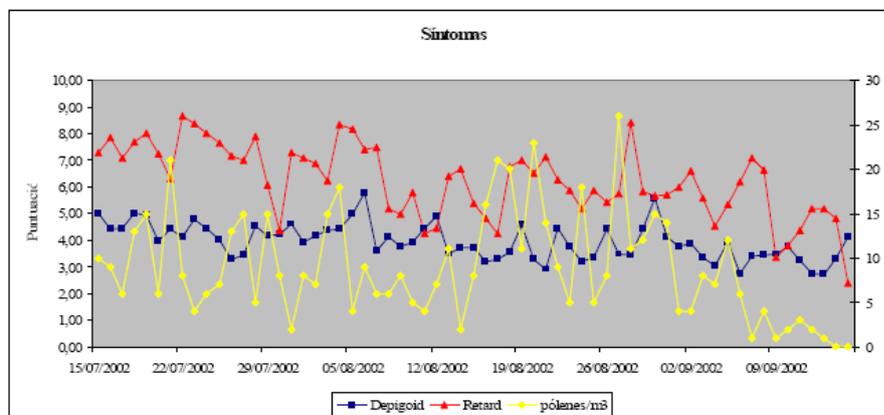


Figura 5. Evolución de la puntuación de síntomas en el año 2002

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas fue de 673 (41,85%), mientras que en el grupo Retard fue de 94 (12,48%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

Durante el período de estudio en el año **2003**, la media diaria de síntomas del grupo Depigoid fue de 3,78 (IC del 95% 3,62-3,94) y la mediana de 3,81 (3,49-4,16). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 4,52 (IC del 95% 4,22-4,82) y la mediana de 4,18 (3,71-5,23). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p= 0,0003$, test de Mann-Whitney, **tabla 8**).

Tabla 8. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas en el año 2003

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	3,78 (3,62-3,94)	4,52 (4,22-4,82)	0,0003
Mediana	3,11 (2,27-3,83)	3,088 (2,83-3,74)	0,0003
Número de pacientes	37	17	

La **figura 6** muestra la evolución de la puntuación de síntomas a lo largo del período de estudio en el año 2003. Las diferencias entre los grupos se van acortando pero todavía el grupo Depigoid obtiene menores puntuaciones de síntomas, siendo la diferencia entre los grupos significativa.

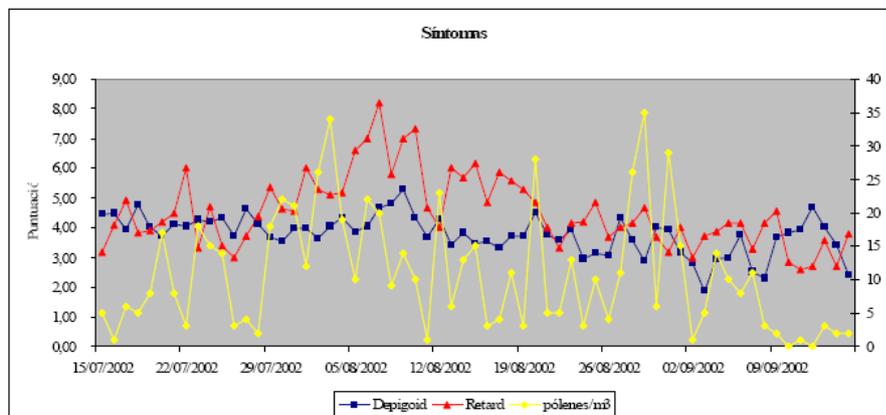


Figura 6. Evolución de la puntuación de síntomas en el año 2003

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas fue de 588 (46,11%), mientras que en el grupo Retard fue de 140 (25,27%)($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

Durante el período de estudio en el **año 2004**, la media diaria de síntomas del grupo Depigoid fue de 3,04 (IC del 95% 2,77-3,31) y la mediana de 3,11 (2,27-3,83). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 3,31 (IC del 95% 3,08-3,54) y la mediana de 3,088 (2,83-3,74). La diferencia entre los dos grupos no es significativa ($p = 0,3449$, test de Mann-Whitney, **tabla 9**).

Tabla 9. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas en el año 2004

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	3,04 (2,77-3,31)	3,31 (3,08-3,54)	0,3449
Mediana	3,11 (2,27-3,83)	3,088 (2,83-3,74)	0,3449
Número de pacientes	14	13	

La **figura 7** muestra la evolución de la puntuación de síntomas a lo largo del período de estudio. Observamos que las diferencias entre las puntuaciones de ambos grupos son todavía menores pero el grupo Depigoid obtiene menores puntuaciones de síntomas, siendo la diferencia entre los grupos significativa. A pesar de que el grupo Depigoid lleva un año sin inmunoterapia la mejoría clínica continúa.

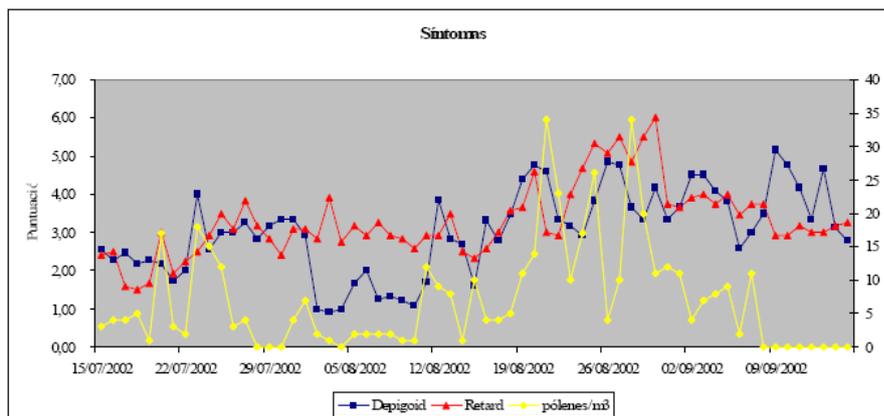


Figura 7. Evolución de la puntuación de síntomas en el año 2004.

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas fue de 388 (53,44%), mientras que en el grupo Retard fue de 331 (44,42%) ($P < 0,0037$, prueba exacta de Fisher).

3.2. PUNTUACIONES DE MEDICACIÓN

Durante el período de estudio en el **año 2002**, la media diaria de medicación del grupo Depigoid fue de 1,00 (IC del 95% 0,92-1,07) y la mediana de 0,96 (0,72-1,22). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 1,58 (IC del 95% 1,48-1,68) y la mediana de 1,54 (1,27-1,85). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p < 0,0001$, test de Mann-Whitney, **tabla 10**).

La **figura 8** muestra la evolución de la puntuación de medicación a lo largo del período de estudio en el año 2002. A simple vista vemos que el grupo Depigoid obtuvo menores puntuaciones de medicación. Esta diferencia entre los grupos es muy significativa

Tabla 10. Media y mediana de las puntuaciones de medicación en el año 2002

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	1,00 (0,92-1,07)	1,58 (1,48-1,68)	<0,0001
Mediana	0,96 (0,72-1,22)	1,54 (1,27-1,85)	<0,0001
Número de pacientes	39	17	

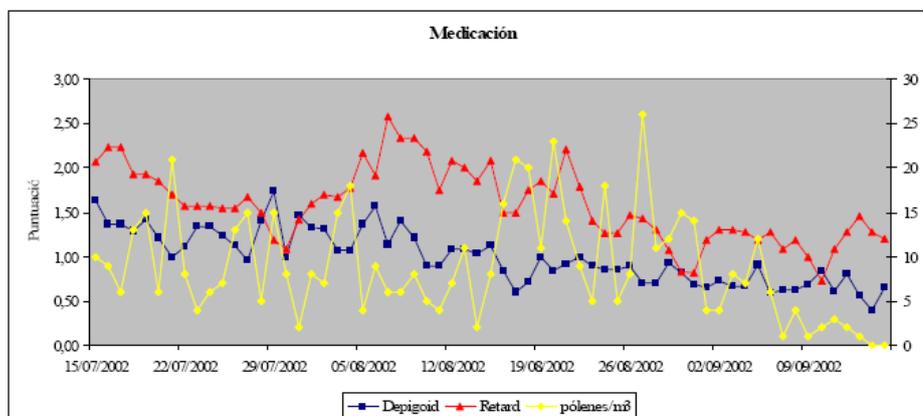


Figura 8. Evolución de la puntuación de medicación en el año 2002

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de medicación fue de 816 (50,7%), mientras que en el grupo Retard fue de 250 (33,2%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

Durante el período de estudio en el **año 2003**, la media diaria de medicación del grupo Depigoid fue de 0,69 (IC del 95% 0,62-0,76) y la mediana de 0,64 (0,47-0,89). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 0,75 (IC del 95% 0,69-0,82) y la mediana de 0,80 (0,67-0,86). La diferencia entre los dos grupos no es significativa ($p = 0,06$, test de Mann-Whitney, **tabla 11**).

Tabla 11. Media y mediana de las puntuaciones de medicación en el año 2003

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	0,69 (0,62-0,76)	0,75 (0,69-0,82)	0,06
Mediana	0,64 (0,47-0,89)	0,80 (0,67-0,86)	0,06
Número de pacientes	37	17	

La **figura 9** muestra la evolución de la puntuación de medicación a lo largo del período de estudio en el año 2003. Apenas se observan diferencias entre las puntuaciones de ambos grupos.

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de medicación fue de 882 (69,17%), mientras que en el grupo Retard fue de 278 (50,18%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

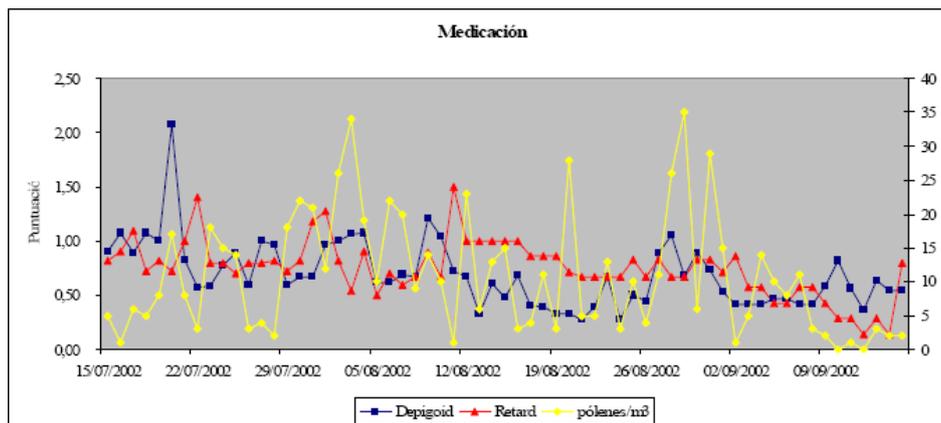


Figura 9. Evolución de la puntuación de medicación en el año 2003

Durante el período de estudio en el **año 2004**, la media diaria de medicación del grupo Depigoid fue de 0,34 (IC del 95% 0,29-0,39) y la mediana de 0,33 (0,17-0,52). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 0,51 (IC del 95% 0,48-0,55) y la mediana de 0,50 (0,42-0,58). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p= 0,0001$, test de Mann-Whitney, **tabla 12**).

Tabla 12. Media y mediana de las puntuaciones de medicación en el año 2004

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	0,34 (0,29-0,39)	0,51 (0,48-0,55)	0,0001
Mediana	0,33 (0,17-0,52)	0,50 (0,42-0,58)	0,0001
Número de pacientes	14	13	

La **figura 10** muestra la evolución de la puntuación de medicación a lo largo del período de estudio. De nuevo hay diferencias entre las puntuaciones de ambos grupos, obteniéndose menores puntuaciones para el grupo Depigoid.

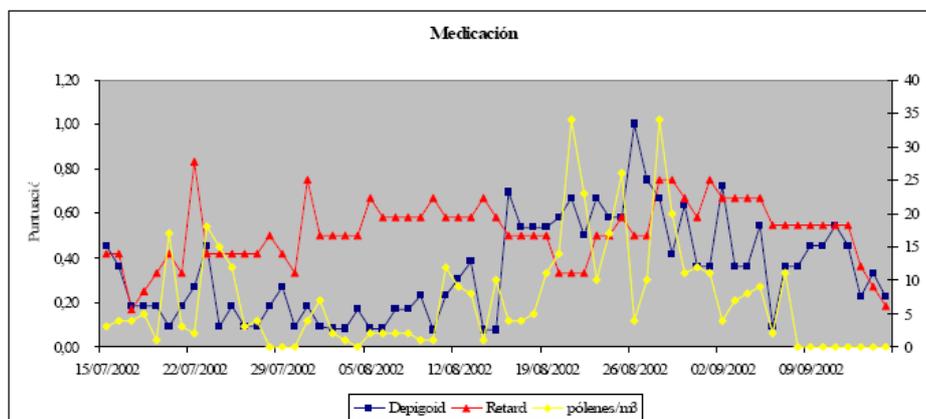


Figura 10. Evolución de la puntuación de medicación en el año 2004

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de medicación fue de 583 (80,30%), mientras que en el grupo Retard fue de 491 (65,9%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

3.3. PUNTUACIONES DE SÍNTOMAS Y MEDICACIÓN

Durante el período de estudio en el **año 2002**, la media diaria de síntomas y medicación del grupo Depigoid fue de 4,80 (IC del 95% 4,62-4,98) y la mediana de 4,84 (4,27-5,31). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 7,83 (IC del 95% 7,44-8,23) y la mediana de 7,0 (6,59-9,19). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p < 0,0001$, test de Mann-Whitney, **tabla 13**).

Tabla 13. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas y medicación en el año 2002

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	4,80 (4,62-4,98)	7,83 (7,44-8,23)	<0,0001
Mediana	4,84 (4,27-5,31)	7,0 (6,59-9,19)	<0,0001
Número de pacientes	39	17	

La **figura 11** muestra la evolución de la puntuación de síntomas+medicación a lo largo del período de estudio. A simple vista vemos que el grupo Depigoid obtuvo menores puntuaciones de síntomas y medicación. Esta diferencia entre los grupos es muy significativa.

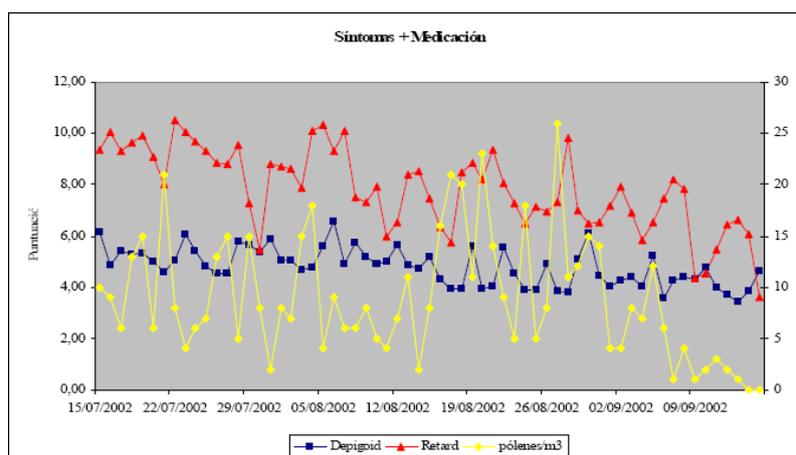


Figura 11. Evolución de la puntuación de síntomas+medicación en el año 2002.

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas+medicación fue de 539 (33,51%), mientras que en el grupo Retard fue de 62 (8,23%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

Durante el período de estudio en el **año 2003**, la media diaria de síntomas+medicación del grupo Depigoid fue de 4,49 (IC del 95% 4,28-4,7) y la mediana de 4,64 (4,00-4,98). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 5,28 (IC del 95% 4,95-5,61) y la mediana de 5,00 (4,46-6,12). La diferencia entre los dos grupos es muy significativa ($p = 0,0001$, test de Mann-Whitney, **tabla 14**).

Tabla 14. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas y medicación en el año 2003

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	4,49 (4,28-4,7)	5,28 (4,95-5,61)	0,0001
Mediana	4,64 (4,00-4,98)	5,00 (4,46-6,12)	0,0001
Número de pacientes	37	17	

La **figura 12** muestra la evolución de la puntuación de síntomas+medicación a lo largo del período de estudio. Las diferencias entre los grupos se van acortando pero todavía el grupo Depigoid obtiene menores puntuaciones de síntomas y medicación, siendo la diferencia entre los grupos significativa.

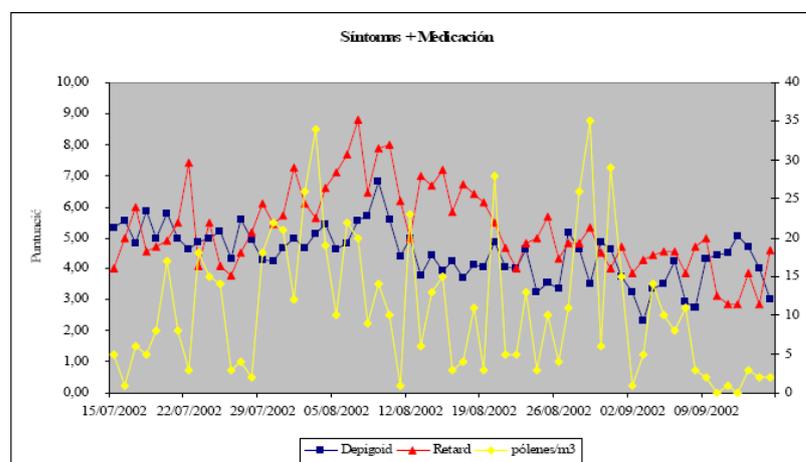


Figura 12. Evolución de la puntuación de síntomas+medicación en el año 2003.

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas+medicación fue de 560 (43,92%), mientras que en el grupo Retard fue de 113 (20,57%) ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher).

Durante el período de estudio en el **año 2004**, la media diaria de síntomas+medicación del grupo Depigoid fue de 3,26 (IC del 95% 2,95-3,58) y la mediana de 3,18 (2,36-4,23). Para el grupo Retard los valores de la media fueron de 3,82 (IC del 95% 3,57-4,07) y la mediana de 5,00 (4,46-6,12). La diferencia entre los dos grupos es significativa ($p = 0,0110$, test de Mann-Whitney, **tabla 15**).

Tabla 15. Media y mediana de las puntuaciones de síntomas y medicación en el año 2004

	Depigoid	Retard	Valor P
Media	3,26 (2,95-3,58)	3,82 (3,57-4,07)	0,0110
Mediana	3,18 (2,36-4,23)	5,00 (4,46-6,12)	0,0110
Número de pacientes	14	13	

La **figura 13** muestra la evolución de la puntuación de síntomas+medicación a lo largo del período de estudio. Observamos que las diferencias entre las puntuaciones de ambos grupos son todavía menores pero el grupo Depigoid obtiene menores puntuaciones de síntomas y medicación, siendo la diferencia entre los grupos significativa. Observamos que a pesar de que el grupo Depigoid lleva un año sin inmunoterapia la mejoría clínica continúa.

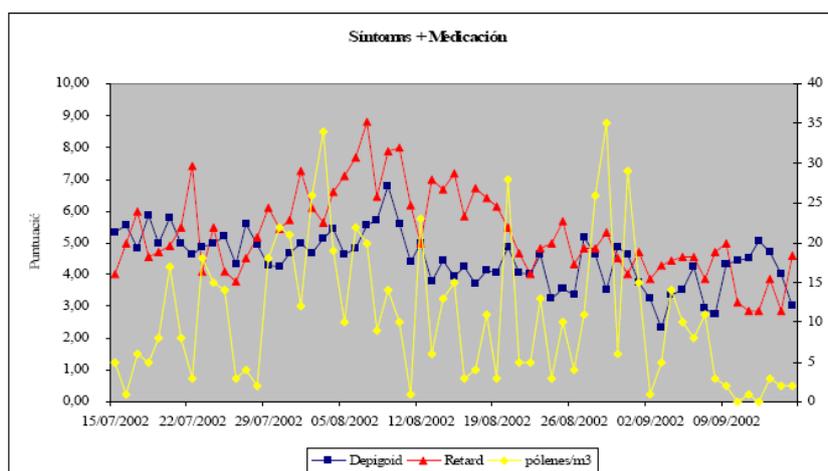


Figura 13. Evolución de la puntuación de síntomas+medicación en el año 2004.

El número de días que el grupo Depigoid estuvo libre de síntomas+medicación fue de 388 (53,44%), mientras que en el grupo Retard fue de 325 (43,62%) ($p > 0,0002$, prueba exacta de Fisher).

3.4. ESCALA ANALÓGICA VISUAL

El análisis se hizo antes del inicio de la inmunoterapia (T0) y al final de la inmunoterapia que fue el tercer año de inmunoterapia para el grupo Retard y el segundo año para el grupo Depigoid. No pudimos analizar los datos de la escala analógica visual en el tercer año de tratamiento para el grupo Depigoid porque esos datos no se recogieron apropiadamente en la fase investigadora. Los resultados fueron expresados en cm. En la siguiente tabla se recoge la estadística descriptiva (**tabla 16**).

Tabla 16. Descripción de los valores estadísticos en cada grupo y para cada tiempo

TRATAMIENTO	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
DEPIGROID					
EAV Final	39	6,4	10,0	8,962	1,0557
EAV basal	39	1,8	10,0	6,677	1,6075
N válido (según lista)	39				
EHR					
EAV Final	18	4,0	10,0	8,122	1,7542
EAV basal	15	3,5	9,9	7,287	1,6483
N válido (según lista)	15				

Mediante el test de Wilcoxon (**Anexo IV**) comparamos las diferencias entre T0 y el último año de tratamiento (tercer año en el grupo Retard y segundo año en el grupo Depigoid) en cada uno de los grupos, que resultaron ser significativas en el grupo Depigoid ($p < 0,0001$), pero no en el grupo Retard ($p = 0,132$).

Mediante el test de Mann-Whitney (**Anexo V**) comparamos las diferencias entre T0 y el último año de tratamiento (tercer año en el grupo Retard y segundo año en el grupo Depigoid) entre ambos grupos, que resultaron ser no significativas ni en T0 ($p=0,085$) ni al final del tratamiento ($p=0,262$).

3.5. CUESTIONARIOS DE CALIDAD DE VIDA PARA RINITIS (RQLQ)

Los resultados del cuestionario de calidad de vida del **año 2002** se muestran en las **tablas 17 y 18**. La diferencia entre ambos grupos para todos los dominios fue no significativa, aunque sí clínicamente relevante, por ser $>0,5$ la diferencia mínima importante (DMI) para todos los dominios. Según expertos en estos aspectos, para que la diferencia entre grupos sea clínicamente relevante debe superar los 0,5 puntos en todos los dominios analizados ¹¹⁰.

Tabla 17. Estadística descriptiva de los resultados del RQLQ en el año 2002

Dominios	media		valor p*	DMI
	Depigoid	Retard		
Actividades	9,08 (8,00-10,15)	8,13 (5,97-10,28)	>0,05	0,95
Sueño	5,50 (4,23-6,77)	4,00 (2,32-5,68)	>0,05	1,5
Síntomas generales	14,15 (11,31-16,99)	11,13 (7,69-14,56)	>0,05	3,02
Problemas prácticos	9,18 (7,97-10,38)	8,20 (5,63-10,77)	>0,05	0,98
Síntomas nasales	10,95 (9,41-12,49)	9,63 (6,84-12,41)	>0,05	1,32
Síntomas oculares	8,43 (6,76-10,09)	5,88 (3,55-8,20)	>0,05	2,55
Emociones	5,48 (3,78-7,17)	3,56 (1,92-5,20)	>0,05	1,92
Cuestionario global	8,96 (7,63-10,30)	7,14 (5,10-9,19)	>0,05	1,82

* Test de Mann-Whitney

Tabla 18. Estadística descriptiva de los resultados del RQLQ en el año 2002

Dominios	mediana		valor P [*]
	Depigoid	Retard	
Actividades	9,00 (6,00-12,00)	9,00 (5,50-12,00)	>0,05
Sueño	5,00 (3,00-8,00)	3,00 (2,00-5,25)	>0,05
Síntomas generales	13,50 (6,75-20,25)	10,50 (7,50-19,00)	>0,05
Problemas prácticos	9,00 (7,00-11,25)	9,00 (4,00-13,00)	>0,05
Síntomas nasales	10,50 (7,00-14,00)	12,00 (4,00-14,00)	>0,05
Síntomas oculares	8,00 (4,00-13,00)	4,50 (2,50-10,00)	>0,05
Emociones	3,00 (2,00-9,00)	3,50 (0,00-6,25)	>0,05
Cuestionario global	8,29 (6,11-11,50)	8,29 (3,57-9,57)	>0,05

* Test de Mann-Whitney

Los resultados del cuestionario de calidad de vida del **año 2003** se muestran en la **tabla 19 y 20**. Las medias obtenidas son más bajas que las del año pasado, lo cual denota una mejoría en la calidad de vida de los pacientes. La mayoría de las diferencias entre los grupos no son clínicamente relevantes, por ser <0,5 la diferencia mínima importante para la mayoría de los dominios ¹¹⁰.

Tabla 19. Estadística descriptiva de los resultados del RQLQ en el año 2003

Dominios	Media		valor p [*]	DMI
	Depigoid	Retard		
Actividades	7,21 (5,76-8,66)	7,25 (5,73-8,77)	>0,05	0,04
Sueño	4,94 (3,38-6,50)	3,55 (2,06-5,04)	>0,05	1,39
Síntomas generales	11,29 (8,61-13,98)	8,85 (5,36-12,34)	>0,05	2,44
Problemas prácticos	7,59 (5,81-9,37)	7,60 (5,71-9,49)	>0,05	0,01
Síntomas nasales	9,12 (7,35-10,88)	9,50 (7,23-11,77)	>0,05	0,38
Síntomas oculares	6,18 (4,51-7,84)	6,45 (4,34-8,56)	>0,05	0,27
Emociones	3,97 (2,54-5,40)	3,80 (2,07-5,53)	>0,05	0,17
Cuestionario global	7,18 (5,70-8,67)	6,71 (5,02-8,41)	>0,05	0,47

* Test de Mann-Whitney

Tabla 20. Estadística descriptiva de los resultados del RQLQ en el año 2003

Dominios	mediana		valor p *
	Depigoid	Retard	
Actividades	7,50 (4,25-10,00)	8,50 (5,75-9,25)	>0,05
Sueño	3,00 (1,00-8,00)	3,50 (0,75-6,00)	>0,05
Síntomas generales	11,00 (6,00-15,75)	8,00 (3,75-10,75)	>0,05
Problemas prácticos	8,00 (3,25-11,50)	8,00 (4,75-10,50)	>0,05
Síntomas nasales	9,50 (5,00-12,75)	10,00 (6,75-13,00)	>0,05
Síntomas oculares	5,00 (3,00-8,75)	6,50 (3,25-10,00)	>0,05
Emociones	2,50 (1,00-6,50)	2,50 (0,00-7,00)	>0,05
Cuestionario global	7,43 (3,50-10,75)	7,00 (4,79-8,89)	>0,05

* Test de Mann-Whitney

Los resultados de los RQLQ del año 2004 no los mostramos porque no se pudo hacer comparaciones entre ambos grupos, ya que hay datos de los pacientes del grupo Retard, pero únicamente hay datos de 3 pacientes del grupo Depigoid.

Mediante el test de Wilcoxon (**Anexo VI**) comparamos las diferencias entre T0 y el tercer año de tratamiento (Año 3) en cada uno de los grupos, que resultaron ser significativas tanto en el grupo Depigoid, como en el grupo Retard ($p < 0,05$) excepto para los síntomas oculares en este último grupo ($p = 0,113$).

Mediante el test de Mann-Whitney (**Anexo VII**) comparamos las diferencias entre T0 y el tercer año de tratamiento (Año 3) entre ambos grupos, que resultaron ser no significativas ni en T0 ni en el tercer año de tratamiento ($p > 0,05$).

4. EVOLUCIÓN GLOBAL DE SÍNTOMAS Y MEDICACIÓN

4.1. Evolución global de síntomas

La **figura 14** muestra el box-plot de la evolución de la puntuación de síntomas a lo largo de los años de estudio.

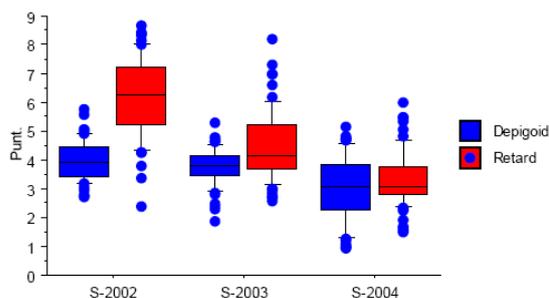


Figura 14. Evolución global de síntomas

Se puede observar que el grupo Depigoid presenta al inicio (año 2002) una puntuación de síntomas inferior a la del grupo Retard, ya que tenía un año previo de tratamiento. El grupo Retard muestra una mejoría a lo largo de estos años y prácticamente se iguala con la del grupo Depigoid. Durante el período de estudio de los años 2002, 2003 y 2004 ambos grupos experimentan una mejoría muy significativa ($p < 0,0001$, test de Friedman) en la puntuación de síntomas.

4.2. Evolución global de medicación

La **figura 15** muestra el box-plot de la puntuación de medicación a lo largo de los años de estudio.

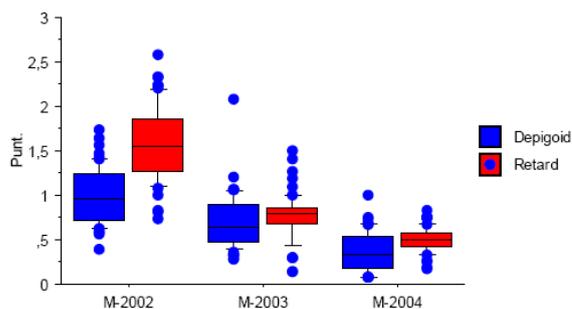


Figura 15. Evolución global de medicación

Se puede observar que el grupo Depigoid presenta al inicio (año 2002) una puntuación de medicación inferior a la del grupo Retard, ya que tenía un año previo de tratamiento. El grupo Retard muestra una mejoría a lo largo de estos años de estudio y prácticamente se iguala con la mejoría del grupo Depigoid. Durante el período de estudio de los años 2002, 2003 y 2004 ambos grupos experimentan una mejoría muy significativa ($p < 0,0001$, test de Friedman) en la puntuación de medicación.

4.3. Evolución global de síntomas+medicación

La **figura 16** muestra el box-plot de la puntuación de medicación a lo largo de los años de estudio.

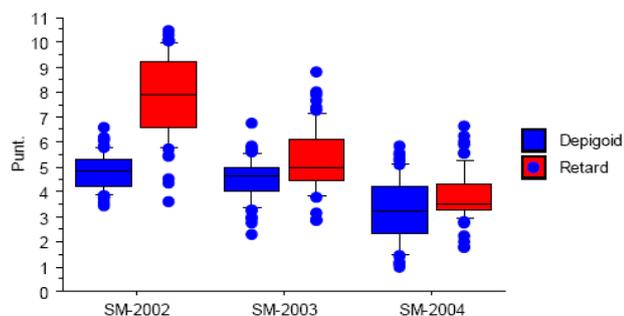


Figura 16. Evolución global de síntomas+medicación

Se puede observar que el grupo Depigoid presenta al inicio (año 2002) una puntuación de síntomas y medicación inferior a la del grupo Retard, ya que tenía un año previo de tratamiento. El grupo Retard muestra una mejoría a lo largo de estos años y prácticamente se iguala con la del grupo Depigoid. Durante el período de estudio de los años 2002, 2003 y 2004 ambos grupos experimentan

una mejoría muy significativa ($p < 0,0001$, test de Friedman) en la puntuación de síntomas y medicación.

5. PRUEBAS IN VIVO

5.1. PRUEBAS CUTÁNEAS

El **valor de 10 HEP** (cantidad de extracto alérgico necesaria para obtener una pápula de igual tamaño que el control positivo de histamina 10 mg/ml) obtenido en ambos grupos en el **año 2002** se muestra en la **tabla 21**. La diferencia entre los dos grupos fue no significativa ($p > 0,05$, test de Mann-Whitney).

Tabla 21. Test cutáneos 2002

	DEPIGROID	RETARD
Media	0,40 mg	0,19 mg
IC del 95%	0,22-0,57	0,12-0,48
Percentil del 25%	0,2	0,1
Percentil del 75%	0,6	0,5

El valor de 10 HEP en el **año 2003** se muestra en la **tabla 22**. Observamos que la reactividad cutánea ha disminuido en ambos grupos. La diferencia entre los grupos fue no significativa.

Tabla 22. Test cutáneos 2003

	DEPIGROID	RETARD
Media	0,82 mg	0,76 mg
IC del 95%	0,50-1,38	0,51-1,12
Percentil del 25%	0,5	0,5
Percentil del 75%	1,7	1,1

En el año 2004 en el grupo Depigoid no se realizaron test cutáneos, y por tanto no teníamos datos para ver si había o no diferencia entre los dos grupos (**tabla 23**).

Tabla 23. Test cutáneos 2004

	DEPIGROID	RETARD
Media	—	0,29 mg
IC del 95%	—	0,21-0,54
Percentil del 25%	—	0,2
Percentil del 75%	—	0,4

5.2 PRUEBAS DE PROVOCACIÓN NASAL

Mediante tablas de contingencia y test estadístico de χ^2 se comparó la evolución dentro de cada grupo antes del inicio de la inmunoterapia (T0) y al tercer año de tratamiento (Año 3) (**Anexo VIII**). La diferencia fue muy significativa para el grupo Depigoid ($p < 0,0001$) y significativa para el grupo Retard ($p < 0,008$).

Mediante esta misma metodología estadística se analizaron las diferencias entre los grupos al inicio de la inmunoterapia (T0) y en los años 2002 y 2003

(Anexo IX). Las diferencias no fueron significativas ni en T0 ($p=0,6320$) ni en el año 2002 ($p=0,4639$) ni en el año 2003 ($p=0,8308$).

6. PRUEBAS IN VITRO

6.1 Determinación de IgE específica frente a *S. kali*

Los resultados de los niveles de IgE específica frente a *S. kali* fueron expresados en Densidades Ópticas (DO), y se analizaron antes del inicio de la inmunoterapia (T0) y al tercer año de tratamiento para cada grupo, que quedan reflejados en el Anexo X.

En la siguiente tabla (tabla 24) podemos ver los datos recogidos en relación a la estadística descriptiva:

Tabla 24. Estadística descriptiva de los valores obtenidos de IgE específica en cada grupo para cada tiempo

		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Depigoid	IgE T0	37	,000	3,483	1,75846	,944515
	IgE Año3	35	,011	2,864	,49437	,584477
	N	33				
Retard	IgE T0	18	,421	2,872	1,63067	,856060
	IgE Año3	15	,164	2,872	,93487	,657634
	N	13				

Mediante el test de Wilcoxon (Anexo XI) comparamos las diferencias entre T0 y el Año 3 en cada uno de los grupos, que resultaron ser significativas para el grupo Depigoid ($p<0,0001$), con una reducción media del 72%, y casi significativa para el grupo Retard ($p=0,064$) con una reducción media del 43%.

Mediante el test de Mann-Whitney (Anexo XII) comparamos las diferencias entre ambos grupos en cada uno de los tiempos, resultando no haber diferencias

en T0, pero sí en el Año 3 ($p=0,006$), experimentando el grupo Depigoid una reducción más cuantiosa.

6.2 Determinación de IgG4 específica frente a *S. kali*

Los resultados se analizaron antes del inicio de la inmunoterapia (T0) y en el tercer año de tratamiento para cada grupo (Año 3).

En la siguiente tabla (**tabla 25**) podemos ver los datos recogidos en relación a la estadística descriptiva.

Mediante el test de Wilcoxon (**Anexo XIII**) comparamos las diferencias entre T0 y el Año 3 en cada uno de los grupos, que resultaron ser muy significativas tanto para el grupo Depigoid ($p<0,0001$) como para el grupo Retard ($p=0,001$).

Mediante el test de Mann-Whitney (**Anexo XIV**) comparamos las diferencias entre ambos grupos en cada uno de los tiempos, resultando no haber diferencias en T0 ($p=0,374$) pero sí en el Año 3 ($p=0,043$), en el que el grupo Retard experimentó un aumento superior.

Tabla 25. Estadística descriptiva de los valores obtenidos de IgG4 en cada grupo para cada tiempo

TRATAMIENTO		N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
DEPIGOID	IgG4 específica basal	38	,000	2,795	,27124	,453385
	IgG4 específica Año 3	34	,041	3,204	1,27038	1,043055
	N válido (según lista)	34				
EHR	IgG4 específica basal	19	,000	2,303	,50489	,684175
	IgG4 específica Año 3	16	,459	3,605	1,85763	1,001675
	N válido (según lista)	15				

7. TOLERANCIA DE LOS EXTRACTOS

Un total de 41 pacientes en el grupo Depigoid y 19 en el Retard iniciaron la segunda parte del estudio. El grupo Depigoid continuó administrándose dos años más (de 2000 a 2003) el extracto modificado (0,5 ml, vial 2 de 1000 HEPL/ml) siguiendo una pauta coestacional y el grupo Retard, que previamente había formado parte del grupo placebo, inició la inmunoterapia en pauta agrupada con el extracto depot de *S. kali* (de 2001 a 2004).

Las reacciones que encontramos a lo largo del período de estudio tuvieron lugar en la fase de inicio y en el primer año de la fase de mantenimiento para ambos extractos. En los dos últimos años de inmunoterapia para ambos extractos no hubo reacciones adversas.

En el grupo Depigoid se administraron en el primer año de estudio (de 2000 a 2001) un total de 697 dosis, 205 en la iniciación y 492 en el mantenimiento.

En el grupo Retard se administraron en el primer año de estudio (2001-2002) un total de 399 dosis, 171 en la iniciación y 228 en el mantenimiento.

En el grupo Depigoid, las reacciones que encontramos a lo largo del primer año de inmunoterapia fueron todas sistémicas, ya que **las reacciones locales que recogimos se clasificaron como nódulos subcutáneos**. Estas reacciones fueron un total de 16, que representan un 2,29% de las dosis totales administradas en el primer año. Ocho de estas reacciones tuvieron lugar en la iniciación (el 3,9% de las dosis de inicio), y 8 en el mantenimiento (el 1,63% de las dosis). Las reacciones sistémicas fueron todas leves, de grado II. En la iniciación, como vemos en la **tabla 26**, de las 8 reacciones sistémicas recogidas 4 fueron inmediatas en pacientes distintos y consistieron en 2 rinitis y 2 pruritos óticos, y 4 tardías en pacientes distintos que consistieron en rinitis. En el

mantenimiento, se presentaron 8 reacciones sistémicas tardías consistentes en rinitis en tres pacientes diferentes.

Tabla 26. Reacciones sistémicas en el grupo Depigoid (% de dosis)

	Iniciación	Mantenimiento
Inmediatas	4 (1,95%)	0
Tardías	4 (1,95%)	8 (1,63%)

Contabilizamos los nódulos subcutáneos que encontramos, que fueron un total de 8 en 5 pacientes diferentes. Todos ellos se produjeron en el mantenimiento.

En el grupo Retard, las reacciones que encontramos a lo largo de un año de inmunoterapia fueron un total de 3, que representan un 0,75% de las dosis globales. Dos de estas reacciones tuvieron lugar en la iniciación (el 1,17% de las dosis de inicio), y una en el mantenimiento (el 0,44% de las dosis). Las reacciones sistémicas fueron todas leves, de grado II. En la iniciación, como vemos en la **tabla 27**, se presentaron 2 reacciones, una local inmediata de > 5 cm en un paciente con la dosis 0,5 del vial 4 que no volvió a repetirse en las siguientes dosis, y una rinitis leve con la dosis 0,5 del vial 2 que no precisó ningún tratamiento. En el mantenimiento se presentó una rinitis leve inmediata que tampoco precisó tratamiento.

No contabilizamos ningún nódulo subcutáneo con este tipo de extracto.

Tabla 27. Reacciones adversas en el grupo Retard (% de dosis)

	Iniciación	Mantenimiento
Inmediatas	1 (8,33%)	1 (8,33%)
Tardías	1 (8,33%)	0

Durante la fase de iniciación, la diferencia entre los dos tipos de extractos resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,002$).

Durante el primer año de la fase de mantenimiento, la diferencia entre los dos tipos de extractos no resultó ser estadísticamente significativa.

V. DISCUSIÓN

Tanto la inmunoterapia utilizada en el grupo Depigoid como la del grupo Retard redujeron significativamente las puntuaciones de síntomas, el consumo de medicación, aumentaron los días libres de síntomas y mejoraron la calidad de vida de los pacientes, sin apenas diferencias entre los grupos. Los resultados de las pruebas cutáneas mostraron una disminución de la reactividad cutánea sin diferencias significativas entre ambos grupos en los años 2002 y 2003. El grupo Depigoid obtuvo una mejoría en los resultados de la escala analógica visual a lo largo del estudio que no obtuvo el grupo Retard. Ambos grupos mejoraron los resultados del test de provocación nasal, sin diferencias entre ellos. Hubo una disminución significativa en los valores de IgE específica en el grupo Depigoid que no tuvo el grupo Retard, y un aumento significativo de IgG4 específica en ambos grupos.

La inhalación de polen de *S.kali* es una de las causas más importantes de enfermedad alérgica respiratoria en Zaragoza. Sin embargo, existe escasa documentación de la eficacia de la inmunoterapia con *S.kali* en publicaciones y revistas especializadas. En 1986 en un resumen de una comunicación a un congreso europeo de alergología se observaba un incremento en la producción de anticuerpos bloqueantes en los pacientes sometidos a inmunoterapia con polen de *S.kali*¹⁶. En 1995 la Dra. De la Hoz aportó con su Tesis doctoral el primer trabajo sobre eficacia de la inmunoterapia con polen de *S.kali* frente a un grupo control²¹. Posteriormente, Garde J y cols. publican un estudio multicentrico de tolerancia de un extracto depot de *S.kali* en pauta agrupada y convencional⁸⁹. En este estudio no se habla de eficacia. Y por último, el Dr. Colás y cols. publicaron los resultados de la fase inicial del estudio que presentamos en esta tesis doctoral. Esta primera fase comenzó siendo un

ensayo clínico prospectivo, doble ciego controlado con placebo, aleatorizado, de un año de duración. En ella se comparó el primer año de inmunoterapia con alergoide de polen de *S.kali* frente a placebo ⁶. Los resultados de esta primera parte ya fueron presentados por la Dra. Monzón en su tesis doctoral ⁹⁸. Se demostró que la utilización del alergoide de polen de *S. kali* frente a placebo es eficaz y segura. Posteriormente, los pacientes del grupo placebo recibieron inmunoterapia con un extracto depot de *S.kali* y pasarían a llamarse **Grupo retard**. El grupo activo continuó recibiendo inmunoterapia con alergoide que había comenzado hacía un año y pasó a llamarse **Grupo Depigoid**. Por lo tanto, mientras el grupo Depigoid comenzaba su segundo año de tratamiento, el grupo Retard comenzaba su primer año de tratamiento. El **objetivo** de esta segunda fase del estudio fue comparar la eficacia y seguridad de la inmunoterapia con un extracto polimerizado, despigmentado de *S.kali* frente a un extracto depot convencional. La duración fue de 3 años. Un total de 41 pacientes en el grupo Depigoid y 19 en el Retard iniciaron la segunda parte del estudio. A lo largo del estudio abandonaron 4 pacientes del grupo Depigoid y 6 del Retard. En el último año del estudio, los pacientes del grupo Retard completaron su tercer año de tratamiento, mientras que los pacientes del grupo Depigoid hacía un año que habían terminado su último año de inmunoterapia. Solo 14 pacientes del grupo Depigoid proporcionaron datos el último año de estudio. Así pues, el estudio fue concluido por 27 pacientes, 13 del grupo Retard y 14 del Depigoid.

La eficacia de la IT se mide mediante diferentes métodos: valoración clínica, evaluación de cambios en la sensibilidad al alergeno en diferentes órganos o bien valorando parámetros inmunológicos. Sin embargo, realmente los únicos parámetros que miden verdaderamente la eficacia de la IT son los parámetros

clínicos. Las modificaciones de los parámetros inmunológicos o de la sensibilidad cutánea al alérgeno pueden ser útiles para dilucidar los mecanismos de acción de la IT y para garantizar que la dosis administrada es suficiente como para producir cambios en la respuesta inmunológica, pero no pueden reemplazar a la evaluación clínica cuando se trata de valorar la eficacia ¹¹⁷. Los parámetros clínicos más utilizados para medir la eficacia de la IT son el registro de síntomas y del consumo de medicación de los pacientes.

Con respecto a las **puntuaciones de síntomas y medicación, y los días libres de síntomas** a lo largo del período de estudio de los años 2002, 2003 y 2004, observamos que en el primer año de estudio, el grupo Depigoid obtuvo menores puntuaciones de síntomas y medicación que el grupo Retard, y más días libres de síntomas, ya que aquel tenía un año previo de tratamiento, siendo estas diferencias muy significativas, aunque la magnitud de la eficacia no es muy importante por no ser la diferencia entre la eficacia de los grupos superior al 20%, de acuerdo con los criterios de Canonica ⁷⁵. En los siguientes años las diferencias entre los grupos se van acortando pero todavía el grupo Depigoid obtiene menores puntuaciones de síntomas y medicación y mayor número de días libres de síntomas, siendo la diferencia entre los grupos significativa, aunque la magnitud de la eficacia no la consideramos muy importante por no ser la diferencia entre la eficacia de los grupos superior al 20% ⁷⁵.

La **escala analógica visual** es un método de valoración subjetiva por parte del paciente. En el grupo Depigoid hubo una mejoría en los resultados de la escala analógica visual a lo largo del estudio que no hubo en el grupo Retard, quizás porque éste último grupo tenía un menor número de pacientes. No hubo diferencias significativas entre los grupos al final del estudio.

Los **test de calidad de vida** para rinitis de Juniper et al ¹⁰⁸ tienen el objeto de cuantificar el impacto que la enfermedad tiene en el bienestar global del paciente, de forma estandarizada, tal y como es percibido por el paciente. No realizamos los test de calidad de vida en asma (AQLQ) debido a que sólo contábamos con 19 pacientes asmáticos y la mayoría de ellos de tipo intermitente, por lo que además de no ser la muestra lo suficientemente representativa, los síntomas no serían constantes.

A lo largo del estudio se observó una mejoría de la calidad de vida en cada uno de los grupos para todos los dominios salvo en el de síntomas oculares para el grupo Retard, aunque sin diferencias significativas entre ambos grupos. En el año 2004 no se pudieron hacer comparaciones entre ambos grupos ya que había datos de los pacientes del grupo Retard, pero únicamente había datos de 3 pacientes del grupo Depigoid.

Los **tests de provocación nasal** se realizaron para comprobar los efectos terapéuticos de un determinado tratamiento sobre la vía nasal. Ambos grupos mejoraron los resultados de los test de provocación nasal a lo largo del estudio, sin diferencias entre ellos.

En la **evolución global de síntomas, medicación y síntomas + medicación** observamos que el grupo Depigoid presentó al inicio (año 2000) una puntuación de síntomas, medicación y síntomas + medicación inferior a la del grupo Retard, ya que tenía un año previo de tratamiento. El grupo Retard mostró una mejoría a lo largo de estos años y prácticamente se igualó con la del grupo Depigoid. Durante el período de estudio de los años 2002, 2003 y 2004 ambos grupos experimentaron una mejoría muy significativa ($p < 0,0001$, test de Friedman) en la puntuación de síntomas, medicación y síntomas+medicación.

En general, el efecto que la IT tiene sobre la **reactividad cutánea** del alérgeno es la progresiva reducción de la sensibilidad cutánea ⁷⁰, como ya han observado algunos autores ^{118,119,120}, que en algunos estudios se ha correlacionado con la mejoría clínica ¹²¹.

En nuestro trabajo hemos obtenido una reducción de la reactividad cutánea a lo largo del estudio en ambos grupos, sin diferencias significativas. En el año 2004 en el grupo Depigoid no se realizaron test cutáneos, y por tanto no teníamos datos para ver si había o no diferencia entre los dos grupos. Sí que se realizaron en el grupo Retard. Se observó que ese año había aumentado la reactividad cutánea en ese grupo, quizás porque los test cutáneos se realizaron cerca de la época polínica.

Durante la IT convencional con extractos alérgicos, en muchos trabajos se demuestra que la concentración en suero de la **IgE específica** frente al alérgeno aumenta inicialmente en la fase de incremento de dosis ^{122,123,124}, y posteriormente disminuye hasta el nivel basal después de unos meses de tratamiento. Sin embargo, estas modificaciones en la IgE específica se producen con una gran variabilidad individual ⁶⁰. Nosotros hemos observado que la IgE específica en el grupo Depigoid ha disminuido con respecto a los valores iniciales, siendo estas diferencias significativas. Sin embargo, en el grupo Retard la IgE específica ha aumentado con respecto a los valores iniciales. Estas diferencias entre los grupos son significativas.

Muchos trabajos demuestran que la IT aumenta los niveles de IgG específicas, en concreto IgG₁ e IgG₄ ^{125,126}. Sobre todo, la elevación progresiva y mantenida en el tiempo de la concentración sérica de IgG₄ se asocia con la eficacia de la IT ¹²⁷. Nosotros hemos observado que hubo un aumento

significativo de IgG₄ específica tanto en el grupo Depigoid como en el grupo Retard al final del período de estudio, siendo superior esta elevación en el grupo Retard, pero sin que este incremento se relacione con un mejor resultado clínico.

En relación con la **seguridad** de la IT, sabemos que la frecuencia de las reacciones adversas difiere dependiendo principalmente del extracto alérgico administrado, del conocimiento previo de la dosis óptima para dicho alérgeno y de la rapidez de la pauta en alcanzar la dosis de mantenimiento ⁸⁶. Hoy en día, las pautas cluster son las más utilizadas, ya que presentan un perfil de seguridad similar al de pautas convencionales, y mejoran el cumplimiento. En nuestro trabajo, con una pauta de inicio agrupada, la inmunoterapia con los dos tipos de extractos de *Salsola kali* se ha mostrado altamente segura. Las reacciones que encontramos a lo largo del período de estudio tuvieron lugar en la fase de inicio y en el primer año de la fase de mantenimiento para ambos extractos. En los dos últimos años de inmunoterapia para ambos extractos no se recogieron reacciones adversas. Durante la fase de inicio ocurrieron más reacciones con el extracto modificado que con el convencional, aunque todas estas reacciones fueron clasificadas como reacciones leves. Durante la fase de mantenimiento no se observaron diferencias en la seguridad con los dos tipos de extractos.

Otros estudios, en los que emplean este mismo tipo de extracto polimerizado que utilizamos nosotros, también comparan extractos depot y alérgoides, como los de seguridad de Casanovas y cols con polen de *Phleum pratense* ¹²⁸ durante 4 meses de seguimiento, y con *D. pteronyssinus* ¹²⁹ de 3 meses de seguimiento. En los respectivos estudios se observa que los extractos modificados de *P.*

pratense y *D. pteronyssinus* son igual o más seguros que los extractos nativos. Otros estudios, que no comparan extractos depot y alergoides, han demostrado la eficacia y seguridad de alergoides de *olea europaea*¹³⁰, *Parietaria judaica*¹¹⁸, *Phleum pratense*¹³¹, mezcla de *Dactylis glomerata* y *olea europaea*¹³², *D. Pteronyssinus*^{133,134,135} y *farinae*^{136,119}, en diferentes estudios abiertos y doble ciego controlados con placebo de un año o menos de duración.

Casanovas y cols.¹³⁷ han publicado recientemente un estudio de tolerancia con estos extractos polimerizados en pautas rápidas (rush). Para ello, reclutaron a 168 pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por ácaros y/o pólenes. Se alcanzó la dosis de mantenimiento el primer día de inmunoterapia. Se registraron 7 reacciones locales, 5 reacciones sistémicas de grado 1 (2 inmediatas y 3 tardías) y 3 reacciones sistémicas tardías de grado 2. Estos mismos autores⁹⁷ han publicado un estudio prospectivo, observacional, multicéntrico, que evalúa la seguridad de la IT con estos extractos polimerizados. En este caso reclutaron a 766 pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por ácaros y/o pólenes. Emplearon una pauta cluster para la iniciación. Se registraron 54 reacciones locales, 18 reacciones sistémicas tardías de grado 1, 15 reacciones sistémicas de grado 2 (6 inmediatas y 9 tardías) y una reacción sistémica tardía de grado 3.

Hasta la fecha, nuestro trabajo es el primer estudio de **eficacia y seguridad** en el que se comparan dos extractos de **S. kali, depot y polimerizado**, durante **3 años** de seguimiento.

VI. CONCLUSIONES

En este estudio se demuestra que la inmunoterapia con un **extracto despigmentado y polimerizado de *S.Kali*** muestra una **eficacia al menos tan significativa como la de la inmunoterapia con un extracto depot convencional** en la enfermedad alérgica respiratoria, dado que:

- Tanto la inmunoterapia utilizada en el grupo Depigoid como la del grupo Retard **reducen** significativamente las **puntuaciones de síntomas**, el **consumo de medicación** y **aumentan los días libres de síntomas**.
- Tanto la inmunoterapia utilizada en el grupo Depigoid como la del grupo Retard **mejoran la calidad de vida** de los pacientes, pero sin que haya una diferencia significativa.
- Los resultados de las pruebas cutáneas mostraron una **disminución** de la **reactividad cutánea** sin diferencias significativas entre ambos grupos en los años 2002 y 2003.
- El grupo Depigoid obtuvo una mejoría en los resultados de la escala analógica visual a lo largo del estudio que no obtuvo el grupo Retard, pero sin diferencias significativas entre los grupos.
- Tanto la inmunoterapia utilizada en el grupo Depigoid como la del grupo Retard mejoran los resultados del test de provocación nasal, sin diferencias significativas entre los grupos.
- En el grupo Depigoid hubo una disminución en los valores de IgE específica que no hubo en el grupo Retard, siendo la diferencia entre los grupos significativa.

- En ambos grupos hubo un aumento significativo de IgG4 específica, siendo superior esta elevación en el grupo Retard, con una diferencia significativa.

En este estudio se demuestra que la inmunoterapia con un **extracto despigmentado y polimerizado de *S.Kali*** muestra una **seguridad al menos similar a la de la inmunoterapia con un extracto depot convencional**, dado que:

- En el grupo Depigoid no hubo reacciones locales. En el grupo Retard únicamente hubo una reacción local inmediata >5 cm en la fase de inicio.
- A pesar de que durante la fase de inicio se recogieron más reacciones sistémicas con el extracto modificado que con el convencional, todas estas reacciones fueron clasificadas como leves, de grado 2, y no precisaron tratamiento farmacológico.
- Durante el primer año de la fase de mantenimiento no se observaron diferencias en la seguridad con los dos tipos de extractos.

VII. ANEXOS

Anexo I-Cartilla de registro de síntomas

iniciales <input style="width: 80px;" type="text"/>	número: <input style="width: 80px;" type="text"/>
fecha 1 ^{er} día: <input style="width: 80px;" type="text"/>	fecha 7 ^o día: <input style="width: 80px;" type="text"/>

1

	<input style="width: 40px;" type="text"/>						
	1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día	4 ^o día	5 ^o día	6 ^o día	7 ^o día

¿Ha tenido **síntomas** hoy durante el **día** ? ⇒

si/no si/no si/no si/no si/no si/no si/no

¿Ha tenido **síntomas** hoy durante la **noche** ? ⇒

si/no si/no si/no si/no si/no si/no si/no

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

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

		<input style="width: 40px;" type="text"/>						
		1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día	4 ^o día	5 ^o día	6 ^o día	7 ^o día

Estornudos	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
hidrorrea (agüilla)	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
obstrucción nasal (atasco)	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
picor nasal	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
picor ocular	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
lagrimeo	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
tos	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
pitos en el pecho	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
ahogo en el pecho	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
otro:	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
otro:	Día	<input style="width: 30px;" type="text"/>						
	Noche	<input style="width: 30px;" type="text"/>						

Anexo II- Cartilla de recogida de puntuación de medicación

3 ¿Ha necesitado emplear hoy la medicación prescrita por su médico ?

NO ⇒ escriba **0** (cero) en las casillas correspondientes del siguiente cuadro.

SÍ ⇒ escriba en las casillas correspondientes el **NUMERO** de comprimidos, cápsulas, inhalaciones, gotas, etc que haya utilizado ese día.

Marque con una ×



		1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día	4 ^o día	5 ^o día	6 ^o día	7 ^o día
⇒	Clarityne (comprimidos)							
⇒	Stopcold (cápsulas)							
⇒	Nasacort (inhalador)							
⇒	Afluon (colirio)							
⇒	Pulmicort Turbuhaler (inh.)							
⇒	Dacortín (comprimidos)							
⇒								
⇒								

4 En caso de que padezca asma

Por favor, escriba **la mejor medida** de tres obtenida con el medidor de PICO-FLUJO, durante el día y por la noche.

PICO-FLUJO (L/min)

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

Anexo III-Plantilla de recogida de pruebas cutáneas

Salsola kali

<input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>	100 HEP			CONTROL NEGATIVO
<input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>	10 HEP			HISTAMINA <input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>
<input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>	1 HEP			0,1 HEP <input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>
<input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>	0,1 HEP			1 HEP <input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>
<input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>	HISTAMINA			10 HEP <input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>
CONTROL NEGATIVO				100 HEP <input type="text" value="área (mm²)"/> <input type="text"/>

Anexo IV- Resultados estadística comparativa intragrupo en T0 y último año del que se obtuvieron datos de la escala analógica visual

Rangos

TRATAMIENTO			N	Rango promedio	Suma de rangos
DEPIGROID	EAV Final - EAV	Rangos negativos	36 ^a	20,74	746,50
		Rangos positivos	3 ^b	11,17	33,50
		Empates	0 ^c		
		Total	39		
EHR	EAV Final - EAV basal I	Rangos negativos	9 ^a	9,61	86,50
		Rangos positivos	6 ^b	5,58	33,50
		Empates	0 ^c		
		Total	15		

a. EAV Final < EAV basal

b. EAV Final > EAV basal

c. EAV Final = EAV basal

Estadísticos de contraste^b

TRATAMIENTO		EAV Final - EAV basal varificada
DEPIGROID	Z	-4,976 ^a
	Sig. asintót. (bilateral)	,000
EHR	Z	-1,507 ^a
	Sig. asintót. (bilateral)	,132

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Anexo V- Resultados estadística comparativa entre los grupos en T0 y en el último año del que se obtuvieron datos de la escala analógica visual

Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	dep=1 ret=2	N	Rango promedio	Suma de rangos
EAV basal	1	39	31,55	1230,50
	2	18	23,47	422,50
	Total	57		
EAV Final	1	39	26,01	1014,50
	2	15	31,37	470,50
	Total	54		

Estadísticos de contraste^a

	EAV basal	EAV Final
U de Mann-Whitney	251,500	234,500
W de Wilcoxon	422,500	1014,500
Z	-1,725	-1,121
Sig. asintót. (bilateral)	,085	,262

a. Variable de agrupación: dep=1 ret=2

Anexo VI –Resultados estadística comparativa en T0 y Año 3 dentro de cada grupo

Grupo Depigoid

Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos^y

		N	Rango promedio	Suma de rangos
ActividadT3 - ActividadT0	Rangos negativos	29 ^a	18,76	544,00
	Rangos positivos	6 ^b	14,33	86,00
	Empates	3 ^c		
	Total	38		
sueño T3 - SueñoT0	Rangos negativos	24 ^d	19,52	468,50
	Rangos positivos	12 ^e	16,46	197,50
	Empates	2 ^f		
	Total	38		
Sínt. GralesT3 - Sínt. GralesT0	Rangos negativos	25 ^g	20,00	500,00
	Rangos positivos	12 ^h	16,92	203,00
	Empates	1 ⁱ		
	Total	38		
Probl pracT3 - Probl pracT0	Rangos negativos	29 ^j	18,84	546,50
	Rangos positivos	5 ^k	9,70	48,50
	Empates	4 ^l		
	Total	38		
Sínt. NasalesT3 - Sínt. NasalesT0	Rangos negativos	30 ^m	19,87	596,00
	Rangos positivos	7 ⁿ	15,29	107,00
	Empates	1 ^o		
	Total	38		
Sínt OcularesT3 - Sínt OcularesT0	Rangos negativos	29 ^p	19,47	564,50
	Rangos positivos	8 ^q	17,31	138,50
	Empates	1 ^r		
	Total	38		
EmocT3 - EmocT0	Rangos negativos	30 ^s	16,87	506,00
	Rangos positivos	4 ^t	22,25	89,00
	Empates	4 ^u		
	Total	38		
GLOBALT3 - GLOBALT0	Rangos negativos	31 ^v	20,39	632,00
	Rangos positivos	7 ^w	15,57	109,00
	Empates	0 ^x		
	Total	38		

- a. ActividadT3 < ActividadT0
- b. ActividadT3 > ActividadT0
- c. ActividadT3 = ActividadT0
- d. sueño T3 < SueñoT0
- e. sueño T3 > SueñoT0
- f. sueño T3 = SueñoT0
- g. Sínt. GralesT3 < Sínt. GralesT0
- h. Sínt. GralesT3 > Sínt. GralesT0
- i. Sínt. GralesT3 = Sínt. GralesT0
- j. Probl pracT3 < Probl pracT0
- k. Probl pracT3 > Probl pracT0
- l. Probl pracT3 = Probl pracT0
- m. Sínt. NasalesT3 < Sínt. NasalesT0
- n. Sínt. NasalesT3 > Sínt. NasalesT0
- o. Sínt. NasalesT3 = Sínt. NasalesT0
- p. Sínt OcularesT3 < Sínt OcularesT0
- q. Sínt OcularesT3 > Sínt OcularesT0
- r. Sínt OcularesT3 = Sínt OcularesT0
- s. EmocT3 < EmocT0
- t. EmocT3 > EmocT0
- u. EmocT3 = EmocT0
- v. GLOBALT3 < GLOBALT0
- w. GLOBALT3 > GLOBALT0
- x. GLOBALT3 = GLOBALT0
- y. TTO NUMÉRICO = 1

Estadísticos de contraste^{b,c}

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
ActividadT3 - ActividadT0	-3,755 ^a	,000
sueño T3 - SueñoT0	-2,136 ^a	,033
Sínt. GralesT3 - Sínt. GralesT0	-2,242 ^a	,025
Probl practT3 - Probl practT0	-4,261 ^a	,000
Sínt. NasalesT3 - Sínt. NasalesT0	-3,692 ^a	,000
Sínt OcularesT3 - Sínt OcularesT0	-3,220 ^a	,001
EmocT3 - EmocT0	-3,574 ^a	,000
GLOBALT3 - GLOBALT0	-3,793 ^a	,000

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

c. TTO NUMÉRICO = 1

Grupo Retard

Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

		N	Rango promedio	Suma de rangos
ActividadT3 - ActividadT0	Rangos negativos	11 ^a	7,55	83,00
	Rangos positivos	2 ^b	4,00	8,00
	Empates	1 ^c		
	Total	14		
sueño T3 - SueñoT0	Rangos negativos	12 ^d	6,50	78,00
	Rangos positivos	0 ^e	,00	,00
	Empates	2 ^f		
	Total	14		
Sínt. GralesT3 - Sínt. GralesT0	Rangos negativos	12 ^g	8,50	102,00
	Rangos positivos	2 ^h	1,50	3,00
	Empates	0 ⁱ		
	Total	14		
Probl pracT3 - Probl pract0	Rangos negativos	12 ^j	6,71	80,50
	Rangos positivos	1 ^k	10,50	10,50
	Empates	1 ^l		
	Total	14		
Sínt. NasalesT3 - Sínt. NasalesT0	Rangos negativos	12 ^m	7,25	87,00
	Rangos positivos	1 ⁿ	4,00	4,00
	Empates	1 ^o		
	Total	14		
Sínt OcularesT3 - Sínt OcularesT0	Rangos negativos	9 ^p	7,56	68,00
	Rangos positivos	4 ^q	5,75	23,00
	Empates	1 ^r		
	Total	14		
EmocT3 - EmocT0	Rangos negativos	10 ^s	6,10	61,00
	Rangos positivos	1 ^t	5,00	5,00
	Empates	3 ^u		
	Total	14		
GLOBALT3 - GLOBALTO	Rangos negativos	12 ^v	8,25	99,00
	Rangos positivos	2 ^w	3,00	6,00
	Empates	0 ^x		
	Total	14		

- a. ActividadT3 < ActividadT0
- b. ActividadT3 > ActividadT0
- c. ActividadT3 = ActividadT0
- d. sueño T3 < SueñoT0
- e. sueño T3 > SueñoT0
- f. sueño T3 = SueñoT0
- g. Sínt. GralesT3 < Sínt. GralesT0
- h. Sínt. GralesT3 > Sínt. GralesT0
- i. Sínt. GralesT3 = Sínt. GralesT0
- j. Probl pracT3 < Probl pract0
- k. Probl pracT3 > Probl pract0
- l. Probl pracT3 = Probl pract0
- m. Sínt. NasalesT3 < Sínt. NasalesT0
- n. Sínt. NasalesT3 > Sínt. NasalesT0
- o. Sínt. NasalesT3 = Sínt. NasalesT0
- p. Sínt OcularesT3 < Sínt OcularesT0
- q. Sínt OcularesT3 > Sínt OcularesT0
- r. Sínt OcularesT3 = Sínt OcularesT0
- s. EmocT3 < EmocT0
- t. EmocT3 > EmocT0
- u. EmocT3 = EmocT0
- v. GLOBALT3 < GLOBALTO
- w. GLOBALT3 > GLOBALTO
- x. GLOBALT3 = GLOBALTO
- y. TTO NUMÉRICO = 2

Estadísticos de contraste^{b,c}

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
ActividadT3 - ActividadT0	-2,626 ^a	,009
sueño T3 - SueñoT0	-3,068 ^a	,002
Sínt. GralesT3 - Sínt. GralesT0	-3,111 ^a	,002
Probl pract3 - Probl pract0	-2,448 ^a	,014
Sínt. NasalesT3 - Sínt. NasalesT0	-2,904 ^a	,004
Sínt OcularesT3 - Sínt OcularesT0	-1,584 ^a	,113
EmocT3 - EmocT0	-2,497 ^a	,013
GLOBALT3 - GLOBALT0	-2,920 ^a	,004

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

c. TTO NUMÉRICO = 2

Anexo VII –Resultados estadística comparativa entre grupo Depigoid y Retard en T0 y Año 3 del RQLQ

Mann-Whitney Test

Rangos

	TTO NUMÉRICO	N	Rango promedio	Suma de rangos
ActividadT0	1	38	27,01	1026,50
	2	16	28,66	458,50
	Total	54		
SueñoT0	1	38	27,39	1041,00
	2	16	27,75	444,00
	Total	54		
Sínt. GralesT0	1	38	25,38	964,50
	2	16	32,53	520,50
	Total	54		
Probl pracT0	1	38	28,42	1080,00
	2	16	25,31	405,00
	Total	54		
Sínt. Nasalet0	1	38	28,14	1069,50
	2	16	25,97	415,50
	Total	54		
Sínt OcularesT0	1	38	29,59	1124,50
	2	16	22,53	360,50
	Total	54		
EmocT0	1	38	27,24	1035,00
	2	16	28,13	450,00
	Total	54		
SUMAT0	1	38	27,36	1039,50
	2	16	27,84	445,50
	Total	54		
GLOBALT0	1	38	27,36	1039,50
	2	16	27,84	445,50
	Total	54		

Estadísticos de contraste^a

	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	Sig. asintót. (bilateral)
ActividadT0	285,500	1026,500	-,352	,725
SueñoT0	300,000	1041,000	-,076	,939
Sínt. GralesT0	223,500	964,500	-1,527	,127
Probl pract0	269,000	405,000	-,667	,505
Sínt. NasalesT0	279,500	415,500	-,465	,642
Sínt OcularesT0	224,500	360,500	-1,510	,131
EmocT0	294,000	1035,000	-,191	,849
SUMAT0	298,500	1039,500	-,104	,917
GLOBALT0	298,500	1039,500	-,104	,917

a. Variable de agrupación: TTO NUMÉRICO

Rangos

	TTO NUMÉRICO	N	Rango promedio	Suma de rangos
ActividadT3	1	40	29,01	1160,50
	2	16	27,22	435,50
	Total	56		
sueño T3	1	40	29,78	1191,00
	2	16	25,31	405,00
	Total	56		
Sínt. GralesT3	1	40	28,93	1157,00
	2	16	27,44	439,00
	Total	56		
Probl pract3	1	40	29,54	1181,50
	2	16	25,91	414,50
	Total	56		
Sínt. NasalesT3	1	40	29,50	1180,00
	2	16	26,00	416,00
	Total	56		
Sínt OcularesT3	1	40	30,34	1213,50
	2	16	23,91	382,50
	Total	56		
EmocT3	1	40	29,94	1197,50
	2	16	24,91	398,50
	Total	56		
GLOBALT3	1	40	29,78	1191,00
	2	16	25,31	405,00
	Total	56		

Estadísticos de contraste^a

	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	Sig. asintót. (bilateral)
ActividadT3	299,500	435,500	-,373	,709
sueño T3	269,000	405,000	-,943	,345
Sínt. GralesT3	303,000	439,000	-,310	,757
Probl pract3	278,500	414,500	-,756	,450
Sínt. NasalesT3	280,000	416,000	-,727	,467
Sínt OcularesT3	246,500	382,500	-1,343	,179
EmocT3	262,500	398,500	-1,070	,284
GLOBALT3	269,000	405,000	-,926	,355

a. Variable de agrupación: TTO NUMÉRICO

Anexo VIII-Resultados estadística comparativa en T0 y Año 3 del TPN dentro de cada grupo

Evolución TPN Depigoid

Summary Table for Rows, Columns

Num. Missing	0
DF	4
Chi Square	30,528
Chi Square P-Value	<,0001
G-Squared	30,265
G-Squared P-Value	<,0001
Contingency Coef.	,478
Cramer's V	,385

Observed Frequencies for Rows, Columns

	Column 1	Column 2	Column 3	Totals
Row 1	2	15	18	35
Row 2	4	17	15	36
Row 3	18	10	4	32
Totals	24	42	37	103

Evolución TPN Retard

Summary Table for Rows, Columns

Num. Missing	0
DF	6
Chi Square	23,027
Chi Square P-Value	,0008
G-Squared	•
G-Squared P-Value	•
Contingency Coef.	,514
Cramer's V	,424

Observed Frequencies for Rows, Columns

	Column 1	Column 2	Column 3	Totals
Row 1	0	7	7	14
Row 2	2	11	5	18
Row 3	11	4	2	17
Row 4	8	4	3	15
Totals	21	26	17	64

Anexo IX- Resultados estadística comparativa entre ambos grupos del test de provocación nasal (TPN) al inicio y en los años 2002 y 2003

TPN Inicio

Summary Table for Rows, Columns

Num. Missing	0
DF	2
Chi Square	,918
Chi Square P-Value	,6320
G-Squared	•
G-Squared P-Value	•
Contingency Coef.	,136
Cramer's V	,137

Observed Frequencies for Rows, Columns

	Column 1	Column 2	Column 3	Totals
Row 1	2	15	18	35
Row 2	0	7	7	14
Totals	2	22	25	49

TPN 03

Summary Table for Rows, Columns

Num. Missing	0
DF	2
Chi Square	,371
Chi Square P-Value	,8308
G-Squared	,376
G-Squared P-Value	,8285
Contingency Coef.	,087
Cramer's V	,087

Observed Frequencies for Rows, Columns

	Column 1	Column 2	Column 3	Totals
Row 1	18	10	4	32
Row 2	11	4	2	17
Totals	29	14	6	49

TPN 02

Summary Table for Rows, Columns

Num. Missing	0
DF	3
Chi Square	2,563
Chi Square P-Value	,4639
G-Squared	•
G-Squared P-Value	•
Contingency Coef.	,207
Cramer's V	,212

Observed Frequencies for Rows, Columns

	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Totals
Row 1	4	17	15	3	39
Row 2	2	11	5	0	18
Totals	6	28	20	3	57

Anexo X-Valores en Densidades Ópticas de la cantidad de IgE específica de cada uno de los pacientes al inicio y en el tercer año de tratamiento

IDENTIF	GRUPO	T0	Año3	IDENTIF	GRUPO	T0	Año3
1076	DEPIGROID	2,351	0,498	6486	DEPIGROID	2,451	1,783
1174	EHR	2,228	0,695	6534	EHR	0,687	1,769
1263	DEPIGROID	2,871	0,271	6763	DEPIGROID	1,781	0,276
1472	EHR	3,483	0,79	7361	DEPIGROID	0,728	0,066
1525	DEPIGROID	0	0,178	7389	EHR	0,914	0,886
1664	DEPIGROID	1,463	0,437	7557	EHR	1,337	
1672	EHR	2,154		7743	DEPIGROID	2,872	0,357
1816	DEPIGROID	0,413	0,45	8314	DEPIGROID	2,738	0,599
1831	DEPIGROID	0,513	0,101	8353	DEPIGROID	1,911	0,074
1944	DEPIGROID			8534	EHR	0,421	0,858
2407	EHR	0,435	1,782	8736	DEPIGROID	1,71	0,058
2424	DEPIGROID		0,288	8768	EHR	0,631	
2429	EHR	0,238	0,235	9248	DEPIGROID	1,804	
2536	DEPIGROID	2,459	0,018	9668	DEPIGROID	0,836	0,069
2609	DEPIGROID	2,738	0,523				
2620	DEPIGROID	1,172					
2668	EHR	1,328	0,326				
2783	DEPIGROID	2,613	1,062				
3010	DEPIGROID	2,797	0,011				
3025	DEPIGROID	1,938	0,811				
3030	EHR	2,041	1,694				
3161	DEPIGROID	1,373	0,138				
3190	DEPIGROID	2,499	0,257				
3252	EHR	3,02					
3294	EHR	1,83	0,583				
3514	DEPIGROID	2,394	0,173				
3578	DEPIGROID	0,971	0,358				
3643	DEPIGROID	0,232	0,447				
3736	EHR	2,553	0,164				
3827	DEPIGROID	2,828	0,108				
4214	DEPIGROID	0,451	1,165				
4324	DEPIGROID	1,192	1,435				
4438	EHR	0,55	2,375				
4538	DEPIGROID	2,942	2,864				
4783	EHR	1,704	0,497				
4939	DEPIGROID	1,561					
5022	EHR	1,549					
5094	DEPIGROID	2,251	0,783				
5398	DEPIGROID	1,928	0,549				
5712	DEPIGROID	2,711	0,033				
5741	EHR	0,824	0,619				
5770	DEPIGROID	2,78	0,065				
5890	DEPIGROID		0,402				
6027	DEPIGROID		0,596				
6043	EHR	2,216	0,75				

Anexo XI -Resultados estadística comparativa en T0 y Año 3 dentro de cada grupo de la IgE específica

Wilcoxon Signed Ranks Test

Rangos

Depigoid=1 Retard=2			N	Rango Promedio	Suma de rangos
1	año3nativo - IgE basal2000	Rangos Negativos	29(a)	18,38	533,00
		Rangos Positivos	4(b)	7,00	28,00
		Empates	0(c)		
		Total	33		
2	año3nativo - IgE basal2000	Rangos Negativos	11(a)	6,55	72,00
		Rangos Positivos	2(b)	9,50	19,00
		Empates	0(c)		
		Total	13		

a año3nativo < IgE basal2000

b año3nativo > IgE basal2000

c año3nativo = IgE basal2000

Test Statistics(b)

Depigoid=1 Retard=2		año3nativo - IgE basal2000
1	Z	-4,512(a)
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
2	Z	-1,852(a)
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,064

a Basado en los rangos positivos.

b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Anexo XII-Resultados estadística comparativa entre grupo Depigoid y Retard en T0 y Año 3 de la IgE específica

Mann-Whitney Test

Rangos

depigoid=1	retard=2	N	Rango promedio	Suma de rangos
IgE basal (T0)	1	36	27,93	1005,50
	2	17	25,03	425,50
	Total	53		
año3nativo	1	34	20,97	713,00
	2	14	33,07	463,00
	Total	48		

Test Statistics(a)

	IgE basal2000	Año3
Mann-Whitney U	272,500	118,000
Wilcoxon W	425,500	713,000
Z	-,638	-2,722
Asymp. Sig. (2-tailed)	,523	,006

a Variable de agrupación: dep=1 ret=2

Anexo XIII- Resultados estadística comparativa en T0 y Año 3 dentro de cada grupo de la IgG4 específica

Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

TRATAMIENTO			N	Rango promedio	Suma de rangos
DEPIGROID	IgG4 específica en 3º año de tto - IgG4 específica basal	Rangos negativos	5 ^a	5,70	28,50
		Rangos positivos	29 ^b	19,53	566,50
		Empates	0 ^c		
		Total	34		
EHR	IgG4 específica en 3º año de tto - IgG4 específica basal	Rangos negativos	1 ^a	3,00	3,00
		Rangos positivos	14 ^b	8,36	117,00
		Empates	0 ^c		
		Total	15		

a. IgG4 específica en 3º año de tto < IgG4 específica basal

b. IgG4 específica en 3º año de tto > IgG4 específica basal

c. IgG4 específica en 3º año de tto = IgG4 específica basal

Estadísticos de contraste^b

TRATAMIENTO		IgG4 específica en 3º año de tto - IgG4 específica basal
DEPIGROID	Z	-4,599 ^a
	Sig. asintót. (bilateral)	,000
EHR	Z	-3,237 ^a
	Sig. asintót. (bilateral)	,001

a. Basado en los rangos negativos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Anexo XIV- Resultados estadística comparativa entre grupo Depigoid y Retard en T0 y Año 3 de la IgG4 específica

Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	dep=1 ret=2	N	Rango promedio	Suma de rangos
IgG4 específica basal	1	38	27,62	1049,50
	2	19	31,76	603,50
	Total	57		
IgG4 específica en 3º año de tto	1	34	22,63	769,50
	2	16	31,59	505,50
	Total	50		

Estadísticos de contraste(a)

	IgG4 específica a basal	IgG4 específica en 3º año de tto
U de Mann-Whitney	308,500	174,500
W de Wilcoxon	1049,500	769,500
Z	-,889	-2,028
Sig. asintót. (bilateral)	,374	,043

a Variable de agrupación: dep=1 ret=2

VIII. BIBLIOGRAFIA

-
- 1 Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther*. 2000 Mar;22(3):342-50.
 - 2 Abramson MP, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD001186.
 - 3 Frew AJ. Immunotherapy: how safe is safe? *Clin Exp Allergy* 2006;36:251-3.
 - 4 Grammer LC, Shaughnessy MA, Patterson R. Modified forms of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:397-401.
 - 5 Patterson R, Suszko IM, Zeiss CR, Pruzansky JJ. Development and evaluation of polymerized allergens for immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981;66 Supp 1:293-6.
 - 6 Colás C, Monzón S, Venturini M, Lezaun A. Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of *Salsola Kali* (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:810-816.
 - 7 Subiza E, Subiza FJ, Jerez M. Árboles, hierbas y plantas de interés alergológico en España. En SEAIC ed. *Tratado de alergología e Inmunología Clínica*. Tomo IV. Madrid: Luzan S.A. de ediciones;1986.257-366.
 - 8 Ezeamuzie CI, Thomson MS, Al-Ali S, Dowaisan A, Khan M, Hijazi Z. Asthma in the desert: spectrum of the sensitizing aeroallergens. *Allergy* 2000;55:157-62.
 - 9 R. Barderas, J. García-Sellés, G. Salamanca, C. Colás, D. Barber, R. Rodríguez, M. Villalba. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1111-1119.
 - 10 Weber R, Nelson NH. Pollen allergens and their interrelationships. *Clin Rev Allergy* 1985;3:291-318.
 - 11 Aellen P. *Salsola* pp. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds). *Flora europea*, vol.1:Cambridge University Press;1964:104-107.
 - 12 Crimi N, Palermo B, Pistorio MP, Rizza S, Mistretta A, De Leonardis W, Longhitano N. On the pollen morphology and frequency of allergic sensitization in Sicily of the Genus *Salsola* L. (Chenopodiaceae). *Allergol et Immunopathol* 1988;16:259-262.
 - 13 Castroviejo S, Luceño M, Cheopodiacea. En: Castroviejo S, Linz MC, López-González G, Muñoz F, Paiva J, Villar L (eds). *Flora Ibérica*, vol 2: Platanaceae-Pumbaginaceae. Madrid: Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1990.477-533.

-
- 14 Galán C, Infante F, Ruiz de Clavijo RC, Guerra F, Miguel R, Domínguez E. Allergy to pollen grains from Amaranthaceae and Chenopodiaceae in Córdoba, Spain: Annual and daily variation of pollen concentration. *Ann Allergy* 1989; 63: 435-438.
- 15 Pola J., Zapata C. y Sanz E. Polinosis en el área de Zaragoza. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.* 1998;13: 135-139.
- 16 J Belmonte, JM Roure, C Colás, F Duce, RM García Rodríguez, M Laborda, J Portillo. *Aerobiología de Aragón*. ISBN 84-699. Barcelona: Monografía. Quasar Serveis d'Imatge SL; 2001.
- 17 Lombardero F, Duffort O, Carrerita J. Allergenic significance of chenopod pollen. In: D'Amato G, Spiekma F, Bonini S (Eds). *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1991. 128-131.
- 18 Shafiee A, Yunginger JW, and Gleich GJ. Isolation and characterization of Russian thistle (*Salsola pestifer*) pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1981, 67: 472-481.
- 19 Lombardero M, Duffort O, Sellés JG, Hernández J, Carreira J. Cross-reactivity among Chenopodiaceae and Amaranthaceae. *Ann Allergy* 1985; 54: 430-436.
- 20 Gomez J, Mansfield LE, Frederick RW, Rael ED. Analysis of the individual allergens of Russian thistle pollen by an enzyme-linked immunoblotting technique. *Journal Asthma* 1989;26:243-250.
- 21 De la Hoz B. Rinoconjuntivitis y asma por hipersensibilidad a polen de *Salsola Kali* (Chenopodiaceae): aspectos clínico-inmunológicos y valoración de la inmunoterapia. Madrid: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; 1995.
- 22 Würtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H, Pisen H. Characterization of Chenopodiales (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. *Allergy* 1995;50:489-97.
- 23 Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identificación and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 47-54.
- 24 Florido JF, Quiralte J, Saénz de San Pedro B, Bartolomé B. Cross-reactivity between *Olea europaea* and *Chenopodium album* pollens. *Allergy* 2000; 55(supl. 63): 158.
- 25 Barderas R, Villalba M, Batanero E, Pascual CY, Rodríguez R. Role of profilin and polcalcin in chenopod pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1132-1133.
- 26 Barderas R, Villalba M, Batanero E, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen. Isolation, amino acid sequences and immunological properties. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1192-8.

-
- 27 J Carnés, E. Fernández-Caldas, A. Marina, C. Alonso, C. Lahoz, C. Colás, A. Lezaun. Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k1. *Allergy* 2003;58:1152-1156.
- 28 Lamson RW. Evidence of biologic relationship among species of Chenopodiales. *Proc Soc Exp Biol Med* 1931;28:502-504.
- 29 Sellers D.D., Adamson W.B. A study of the apparent atopic similarity of certain chenopodiales pollens. *J Allergy* 1932;3:166-171.
- 30 Weber RW, Mansfield LE, Nelson HA. Cross-reactivity among of the Amaranth and Chenopod families. *J Allergy Clin Immunol* 1978;61:172.
- 31 Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profiling: rChe a 2 as a good marker for profiling sensitization. *Biol Chem* 2004;385:731-7.
- 32 M.Villalba, R.Rodríguez, R.Barderas, S. Abián, D.Barber, C.Colás et al. Perfiles de sensibilización a polen de *Salsola* y de *Chenopodium*. En: Asociación Aragonesa de Alergia (Alergoaragón). Reunión anual de la Asociación Aragonesa de Alergología: "Debates sobre alergología". Zaragoza:Alergoaragón;2004.93-101.
- 33 Williams CMM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:847-859.
- 34 Howarth P.H, Salagean D, Dokic D. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. *Allergy* 2000;55 (Supl.64):7-16.
- 35 Huang C, Sali A, Stevens RL. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation. *J Clin Immunol* 1998;18:169-183.
- 36 Wardlaw AJ. Molecular regulation of eosinophil trafficking: a multi-step paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:917-926.
- 37 Galli SJ, Lantz CS. Allergy. En: Paul WE. (ed). *Fundamental Immunology*. Filadelfia, PA: Lippincott-Raven; 1999.1137-1384.
- 38 Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, et al. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1995;8:127-149.
- 39 Global strategy for asthma management and prevention. WHO/NHLBI workshop report. Lung and Blood Institute: National Institutes of Health, National Heart, Publication Number 95-3659 1995.
- 40 Quanjer Ph H, Tammeling G.J, Cotes J.E, Pedersen O.F, Peslin R, Yernault J.C. Luna. Volumen and Forced Ventilatory Flows. Report Working Party. Standarization of Lung Function Test. European Community for Steel and Coal. *Eur Respir J* 1993;6 (suppl.16):5-40.

-
- 41 Quackenboss J.J, Lebowitz M.D, Krzyzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates:relationship to symptoms and respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:323-330.
- 42 Sterk P.J, Fabbri L.M, Quanjer Ph. H, Cockcroft D.W, O'Byrne P.M, Anderson S.D, Junniper E.F, Malo J.L. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party. Standardization of Lung Test. European Community for Steel and Coal. *Eur Respir J* 1993;6 (suppl.16):58-83.
- 43 Spector S.L. Allergen inhalation challenges. En: Spector S.L. editor. *Provocation testing in clinical practice*. New York: Marcel Dekker;1995, p.325-68.
- 44 Global strategy for asthma management and prevention. Revised 2002. <http://www.ginasthma.com> 2002.
- 45 Global Initiative for Asthma. Revised 2006. <http://www.ginasthma.com> 2006.
- 46 International Consensus Report on the Diagnosis and Management of Rhinitis. *Allergy* 1994;49 (suppl. 19):1-34.
- 47 Baucha V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004;24:758-64.
- 48 Bousquet J, Demarteau N, Mullol J, et al. Costs associated with persistent allergic rhinitis are reduced by levocetirizine. *Allergy* 2005;60:788-94.
- 49 Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. ARIA Workshop Report. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:147-336.
- 50 Bousquet J et al. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis: ARIA update. *Allergy* 2006;61:1086-1096.
- 51 Solomon W.R. Nasal provocative testing. En: Spector S.L.editor. *Provocation testing in clinical practice*. New York: Marcel Dekker;1995, p.646-692.
- 52 Van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica G.W, Durham S.R, et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. *Allergy* 2000;55:116-134.
- 53 La rinitis alérgica y su impacto sobre el asma (ARIA Workshop Report). En: *Alergología e Inmunología Clínica* 2003;18, supl1:29-31.
- 54 Health effects of outdoor air pollution. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:3-50.
- 55 Bousquet J, Lockey R.F, Mailing H.J. WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998;53(suppl.44):1-42.

-
- 56 Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(6):1025-34
- 57 Till SJ, Durham SR. Immunological responses to allergen immunotherapy. *Clin Allergy Immunol* 2004; 18:85-104.
- 58 Dieguez I, Sanz M.L, Oehling A. Influence of immunotherapy on histamine release and other immunological parameters of immediate hypersensitivity in pollinosis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993;3:64-71.
- 59 Ferrer M, Sanz M.L, Prieto I, Vila L, Oehling A. Effect of immunotherapy on allergen-specific production of sulphidoleukotriene and histamine. *Invest Allergol Clin Immunol* 1998;8:277-280.
- 60 Durham S.R, Till S. J. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:157-164.
- 61 Durham S.R, Ying S, Varney V.A, Jacobson M.R, Sudderick R.M, Mackay I.S, Kay A.B, Hamid Q.A. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97:1356-65.
- 62 Gehlhar K, Schlaas M, Becker W, Bufe A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clinical Exp Allergy* 1999;29:497-506.
- 63 Jutel M, akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205-1214.
- 64 Oehling A.K, Sanz M.L, Resano A. Importance of IgG4 determination in vitro immunotherapy follow-up of inhalant allergens. *Invest Allergol Clin Immunol* 1998;6:333-339.
- 65 Reisman R.E. Should routine measurements of serum venom-specific IgG be an standard of practice in patients receiving venom immunotherapy? *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:282-284.
- 66 Secrist H, Chelen C.J, Wen Y, Marshall J.D, Umetsu D.T. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993;178:2123-2130.
- 67 Majori M, Caminata A, Coorradi M, Brianti E, Scarpa S, Pesci A. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:341-347.

-
- 68 European Academy of Allergy and Clinical Immunology (E.A.A.C.I.) Subcomité on skin tests. Position Paper. *Allergy* 1993;48 (Suppl.14):48-82.
- 69 The use of standardized allergen extracts. Position Statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (A.A.A.A.I.). *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-586.
- 70 Position paper: immunotherapy. (EAACI) The European Academy of Allergology and clinical immunology. *Allergy* 1993;48 (suppl.14):7-35.
- 71 Niederberger V, Valenta R. Molecular approaches for new vaccines against allergy. *Expert Rev Vaccines* 2006;5:103-10.
- 72 Kraft D, Ferreira F, Vrtala S et al. The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:171-6.
- 73 Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:608-13.
- 74 Harold S, Nelson MD. Allergen immunotherapy: Where is it now? *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:769-77.
- 75 Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Bousquet PJ, Lockey RF, Malling HJ, et al. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007;62:317-24.
- 76 Golden D.B.K., Kwiterovich K.A, Kagey-Sobotka A, Valentine M.D, Lichtenstein L.M. Discontinuing venous immunotherapy: outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:579-587.
- 77 Jacobsen L, Nüchel Petersen B, Wihl J.A, Lowenstein H, Pisen H. Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. IV. Results from a long-term (6 year) follow-up. *Allergy* 1997;52:914-920.
- 78 Naclerio R.M, Proud D, Molán B, Balcer S, Freidhoff L, Kagey-Sobotka A et al. A double-blind study of the discontinuation of ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:293-300.
- 79 Durham S.R, Walker S.M, Varga E, Jacobson M.R, O'Brien F, Noble W, et al. Long term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999;341:468-475.
- 80 Cools M, Van Bever H.P, Weyler J.J, Stevens W.J. Long-term effect of specific immunotherapy, administered during childhood, in asthmatic patients allergic to either house dust-mites or to both house dust-mite and grass pollen. *Allergy* 2000;55:69-73.

-
- 81 Möller C, Dreborg S, Ferdousi H.A, Halcken S, Host A, Jacobsen L, et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-Study). *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:251-256.
- 82 Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, Isola S, Puccinelli P, Parmiani S, et al. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin Exp Allergy*. 2001 Aug;31(8):1295-302.
- 83 Pajno GB, Barberio G, de Luca Fr. Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 2001 Sep;31(9):1392-7.
- 84 Aaronson DW, Gandhi TK. Incorrect allergy injections: allergists' experiences and recommendations for prevention. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1117-21.
- 85 Bernstein DI, Wanner M, Boris L, Liss GM, and the Immunotherapy Comité of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1129-36.
- 86 Winther L, Arnved J, Mailing HJ, Nolte H and Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy. A prospective multi-centre study. *Allergy* 2006;36:254-260.
- 87 Moreno C, Fernández-Távora L, Acero S, Alonso MD, Barahona MJ, Blanco R et al. *Journal Invest Allergol Clin Immunol* 2003;13:221-227.
- 88 A.I Tabar, S. Echechipía, B.E García, J.M Olaguibel, M.T Lizaso, Gómez B, et al. Double-blind comparative study of cluster and conventional immunotherapy schedules with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:109-118.
- 89 J.Garde, A.Ferrer, V.Jover, JA Pagan, C.Andreu, A.Abellan et al. Tolerance of a *Salsola kali* extract standardized in biological units administered by subcutaneous route. Multicentred study. *Allergol Immunopathol* 2005;33:100-104.
- 90 J.N.Francis and S.R.Durham. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2004;4:543-548.
- 91 Sledge RF. Treatment of hay-fever with alud-precipitated pollen. *US Naval Med Bull* 1938;36:18.
- 92 Zoss AR, Koch CA, Hirose R. Alum-ragweed precipitate: preparation and clinical investigation: preliminary report. *J Allergy Clin Immunol* 1939;8:29.
- 93 Marsh DG, Norman PS, Roebber M, Lichtenstein LM. Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III. Preparation of ragweed pollen allergoids by aldehyde modification in two steps. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:449-59.

-
- 94 Bousquet J, Maasch HJ, Hejjaoui A, et al. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. III. Efficacy and safety of unfractionated and high-molecular-weight preparations in rhinoconjunctivitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:546-56.
- 95 Grammer LC, Shaughnessy MA, Patterson R. Modified forms of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:397-401.
- 96 Corrado OJ, Pastorello E, Ollier S, et al. A double-blind study of hyposensitization with an alginate conjugated extract of *D. pteronyssinus* (Conjuvac) in patients with perennial rhinitis. I. Clinical aspects. *Allergy* 1989;44:108-15..
- 97 M. Casanovas, R. Martín, C. Jiménez, R. Caballero and E. Fernández-Caldas. Safety of immunotherapy with therapeutic vaccines containing depigmented and polymerized allergen extracts. *Clin Exp Allergy* 2007;37:434-440.
- 98 Monzón S. Eficacia y seguridad de la inmunoterapia con un alérgico de polen de *Salsola kali*: Estudio doble ciego controlado con placebo. Zaragoza:Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza;2004.
- 99 International patent Application PCT. Number of Publication WO 94/06821., inventor inventors.1994
- 100 Sachs DH, Winn HJ. The use of glutaraldehyde as a coupling agent for ribonuclease and bovine serum albumin. *Immunochemistry* 1970;7:581-5.
- 101 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 102 Casanovas M, Bel I, Marañón F, Berrens L. Estimation of IgE antibodies to the common allergens by reverse enzyme immunoassay. Comparison with the radioallergosorbent test. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1991;1:247-52.
- 103 Boluda L, Gallego MT, Gonzalez Romano ML, Cambra O, Berrens L. Evaluation of the potency of allergenic extracts by inhibition of IgG-antibody binding. *Biologicals* 1994;22:171-7.
- 104 Farid NA. Fluorescamine use in high-performance liquid chromatographic determination of aminocaproic acid in serum. *J Pharm Sci* 1979;68:249-52.
- 105 Lacroix C, Levert P, Laine G, Goulle JP.[Microassay of epsilon-aminocaproic acid by liquid chromatography]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1984;42:371-3.
- 106 Jäger S. Recommendations for methodology for routinely performed monitoring of airborne pollen. Practical Workshop II: Collection and identification of pollens. In: "Syllabus" of Postgraduate courses and practical workshop (XVI EAACI 95, Madrid). Toront (Valencia): Basomba A, Sastre J. 1995:329-330.

-
- 107 Dreborg S, Agrell B, Foucard T, Kjellman N-IM, Koivikko A, Nilson S. A double-blind, multicenter Immunotherapy trial in children using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation I. Clinical results. *Allergy* 1986;41:131-140.
- 108 Juniper EF, Guyatt GH, Andersson B, Ferrie PJ. Comparison of powder and aerosolized budesonide in perennial rhinitis: validation of rhinitis quality of life questionnaire. *Ann Allergy* 1993;70:225-230.
- 109 Juniper EF, Guyatt GH, Griffith LE, Ferrie PJ. Interpretation of rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire data. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:844-5.
- 110 Juniper EF, Guyatt GH, Willan A, Griffith LE. Determining a minimal important change in a disease-specific quality of life questionnaire. *J Clin Epidemiol* 1994;47:81-7.
- 111 Osterballe O, Week B. A new lancet for skin prick testing. *Allergy* 1979;27:439-469.
- 112 Nordic-Council-on-Medicines. Registration of allergen preparations. Nordic guidelines. Prepared by the Nordic Council on Medicines in cooperation with the Drug Regulatory Authorities in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. NLN Publication No. 23 1989;Edn. January:1-36.
- 113 Clement PAR. Comité report on standardization on rhinomanometry. *Rhinology* 1984;22:151-155.
- 114 Malm L, Gerth Van Wuk R, Bachert C. Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow and airflow resistance. International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society. *Rhinology* 2000;38:1-6.
- 115 Casanovas M, Bel I, Marañón F, Berrens L. Estimation of IgE antibodies to the common allergens by reverse enzyme immunoassay. Comparison with the radioallergosorbent test. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 1991;1(4):247-52.
- 116 Rafizadeh B. Demonstration of the blocking antibodies after immunotherapy with Russian thistle. In: Csaba B, Leövey A, Szemere P, editors. Proceedings of the XIII Congress EAACI; 1986 May 4-10; Budapest, Hungary. Debrecen: Alföldi Ny; 1986.
- 117 Mailing H.J. Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy* 1998;53:461-72.
- 118 García-Sellés J, Pascual A, Funes E et al. Clinical efficacy and safety of a depigmented and glutaraldehyde polymerized therapeutic vaccine of *Parietaria judaica*. *Allergol Immiunopathol* 2003;31:63-9.
- 119 García-Robaina JC, Sánchez I, de la Torre F, Fernández-Caldas E, Casanovas M. Successful management of mite-allergic asthma with modified extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in a double-blind, placebo-controlled study.

-
- 120 García Ortega P, Merelo A, Marrugat J, Richard. Decrease of skin and bronchial sensitization following short-intensive scheduled immunotherapy in mite-allergic asthma. *Chest* 1993;103:183-7.
- 121 Bousquet J, Maasch H, Martinot B, Hejjaoui A, Wahl R, Michel FB. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;82:439-46.
- 122 Muñoz D, Bernaola G, Audicana M, Fernández E, Fernández de Corres L. Inmunoterapia rápida en pacientes polínicos. Evolución clínica y variación de parámetros in vivo e in Vitro. *Rev esp Alergol Inmunol Clin* 1991;6 (supp.1):57-61.
- 123 Bousquet J, Maasch H, Martinot B, Hejjaoui A, Wahl R, Michel F.B. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:439-46.
- 124 Fernández-Távora L, García D. Inmunoterapia cluster con extractos de pólenes: estudios de tolerancia, cambios inmunológicos y eficacia clínica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1991;6 (supl. 1):68-74.
- 125 Aalberse RC, van-der-Gaag R, van-Leewen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 1983;130:722-6.
- 126 Platts-Mills TAE, von Maur RK, Ishizaka K, Norman PA. IgA and IgG anti-rag-weed antibodies in nasal secretions. *J Clin Invest* 1976;57:1041-1050.
- 127 Lahoz C. Mecanismos de acción de la vacunación alérgica específica. *Alergol Inmunol Clin* 1999;14:133-143.
- 128 Casanovas M, Sastre J, Fernández-Nieto M, Lluch M, Carnés J and Fernández-Caldas E. Double-blind study of tolerability and antibody production of unmodified and chemically modified allergen vaccines of *Phleum pratense*. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1377-1383.
- 129 Casanovas M, Fernández-Caldas E, Alamar R, Basomba A. Comparative study of tolerance between unmodified and high doses of chemically modified allergen vaccines of *D. pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;15:30-36.
- 130 Guerra F, Daza JC, Almeda E. Immunotherapy with a depigmented, polymerized vaccine of *Olea europaea* pollen allergens significantly reduces specific bronchial and skin test reactivity in sensitized patients after one year of treatment. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2003;13:108-17.

-
- 131 Casanovas M, Gómez MJ, Cimarra M, Martínez-Cócera C, Fernández-Caldas E. Immunotherapy with a standardized depigmented and glutaraldehyde-polymerized extract of *Phleum pratense*: safety and efficacy. *Allergy* 2001;56 (Suppl.68):92.
- 132 Álvarez-Cuesta E, Aragonese-Gilsanz E, Martín-García C, Berges-Gimeno P, González-Mancebo E, Cuesta-Herranz J. Immunotherapy with depigmented glutaraldehyde-polymerized extracts: changes in quality of life. *Clin Exp Allergy* 2005;35:572-78.
- 133 Ameal A, Vega-Chicote JM, Fernández S, Miranda A, Carmona MJ, Rondón MC, et al. Double-blind and placebo-controlled study to assess efficacy and safety of a modified allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic asthma. *Allergy* 2005;60:1178-1183.
- 134 Ibero M, Castillo MJ. Significant Improvement of Specific Bronchial Hyperreactivity in asthmatic children after 4 months of treatment with a modified extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:194-202.
- 135 Branco Ferreira M, Spínola Santos A, Pereira Santos M.C., Palma Carlos M.L, Pereira Barbosa M.A. and Palma Carlos A.G. Efficacy and safety of specific immunotherapy with a modified mite extract. *Allergol et Immunopathol* 2005;33:80-5.
- 136 Ferrer A, García-Sellés J. Significant improvement in symptoms, skin test, and specific bronchial reactivity after 6 months of treatment with a depigmented, polymerized extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003;13:244-251.
- 137 Casanovas M, Martín R, Jiménez C, Caballero R, Fernández-Caldas E. Safety of an Ultra-Rush immunotherapy build-up Schedule with therapeutic vaccines containing depigmented and polymerized allergen extracts. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:153-158.