



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

Facultad de Medicina

**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS
BIOSANITARIAS**

**“Relevancia clínica de la profilina en los
pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma
por alergia a pólenes”.**

TESIS DOCTORAL.

Francisco Javier Ruiz Hornillos

Madrid, 2021.

Directores de Tesis:

Ricardo Abengózar Muela

Pilar Berges Gimeno

**“Relevancia clínica de la profilina en los
pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma
por alergia a pólenes”.**

TESIS DOCTORAL.

Francisco Javier Ruiz Hornillos

Madrid, 2021.

Directores de Tesis:

Ricardo Abengózar Muela

Pilar Berges Gimeno

Tutores:

Ricardo Abengózar Muela

Roger Ruiz Mora



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

A las personas más importantes de mi vida, mis raíces y mis flores: mis padres Marisol y Anastasio, cuyo ejemplo de esfuerzo y honradez ha arraigado en mí, les debo todo lo que soy. A Eva y Jimena, mi mujer y mi hija, las dos sonrisas que florecen cada día a mi lado, iluminan y llenan mi vida.

Agradecimientos.

En este apartado quería agradecer a todas las personas e instituciones que han contribuido en mi actividad laboral, investigadora y/o personal a que pueda realizar esta tesis:

A la Fundación de la Sociedad Española de Alergología cuya financiación mediante la aportación de una beca de investigación ha sido fundamental para el proyecto de investigación.

A la Dra. Pilar Berges Gimeno, Directora de tesis, que desde el principio aportó la idea original y dirigió el diseño del proyecto, sus consejos me han guiado en la investigación.

Al Dr. Ricardo Abengózar, Codirector de tesis, con su apoyo entrañable a lo largo de estos años y con sus correcciones ha contribuido a mejorar y pulir esta tesis.

A los laboratorios LETI, que colaboraron en los estudios in vitro, pero sobre todo al Dr. Jerónimo Carnés y Dra. María Ángeles López Mata cuya contribución, implicación personal y consejos a lo largo de todo el proyecto han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Adela M. Gutiérrez Bustillo, y al Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por cederme el captador de pólenes y colaborar en la lectura y cuantificación de los mismos.

Al Dr. Francisco Feo Brito y al servicio de Alergología de Ciudad Real, por cederme el captador de partículas para poder medir la profilina en el ambiente.

Al Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, por apoyarme en la investigación, en especial a Ignacio Mahillo por su ayuda con la estadística.

Al Hospital Universitario Infanta Elena, por facilitarme la realización de investigación.

A mis compañeros de trabajo del Hospital, el Dr. Aythamy Henríquez Santana, la Dra. Sandra Blanco Bermejo, la Dra. Marta Seoane Rodríguez, y antiguo compañero Luis Manso por su contribución en el día a día en el proyecto de investigación. A las enfermeras Beatriz Amaro y Eva Martín Sopeña que colaboraron en la realización de

todas las pruebas diagnósticas. A todo el personal de mantenimiento que me ayudó con la colocación y mantenimiento de los captadores.

A todos los pacientes, sin cuya generosidad en la colaboración de la investigación no se podría haber realizado este estudio.

A todos los médicos de los que a lo largo de los años he aprendido a formarme como alergólogo, no puedo nombrar a todos, una muestra relevante podrían ser: Dra. Patricia Rojas y Dra. Galicia Dávila mis coerres con las que di mis primeros pasos en la especialidad y todavía sigo acudiendo a ellas cuando tengo una duda. Mis residentes mayores Dr. Antonio Moreno, Dra. Gema Mínguez, Dr. Juan María Beitia, Dr. Julio Ruiz y Dr. Agustín Velloso comenzaron enseñándome las primeras nociones y ahora son grandes amigos, en especial Tony que me ha enseñado lo que es la amistad dentro y fuera de la alergología. Dra. Lydia Zapatero, alergóloga cuyo trato y relación con el paciente son mi modelo a seguir. A todos los alergólogos del Hospital Universitario Gregorio Marañón y del resto de servicios de Madrid y de España de los que sigo aprendiendo cada vez que puedo.

A todos mis amigos, de Dosbarrios, de Santiago de Compostela, de "Orense", de mi urbanización, etc. por tantas veces me habéis apoyado cada vez que os he hablado de mi tesis, un complemento importante a mi actividad laboral en mi vida personal.

A mi familia, la raíz en la que me sustento, mis padres, su ejemplo de esfuerzo es la base de mi vida y fuerza para intentar hacer las cosas cada día mejor. Mis hermanos, cuñadas, sobrinos y primos refugio cuando os necesito. A Eva, mi mujer la persona que mejor me conoce, la que me ha soportado a lo largo de todos estos años de tesis y muchos más, el complemento perfecto a mi vida personal y laboral.

Índice.

Resumen.....	10
Abstrac	13
Índice de figuras	16
Índide de Tablas	21
I. Introducción.....	24
I.1 Alergia	25
I.2 Rinitis, conjuntivitis y asma alérgica.....	28
I.3 Alergia al polen.....	36
I.4 Alérgenos del polen.....	41
I.5 Profilina	47
I.5.1 ¿Qué son las profilinas?	47
I.5.2 Profilina y alergia al polen	53
I.5.3 Profilina, alergia a alimentos y alergia al látex.....	60
I.5.4 Relevancia de la profilina.....	65
II. Justificación.	68
III. Hipótesis y objetivos	71
III.1 Hipótesis de trabajo	72
III.2 Objetivos principales del estudio.....	72
III.3 Objetivos secundarios del estudio.....	72
IV. Metodología. Material y métodos.....	73
IV.1 Diseño del estudio.....	74
IV.2 Población del estudio.....	76
IV.2.1 Criterios de inclusión:	76
IV.2.2 Criterios de exclusión:.....	76
IV.2.3 Definición de grupos de estudio.....	76
IV.3 Estudio <i>in vitro</i> :	78
IV.4 Estudios <i>in vivo</i>	79

IV.4.1	Purificación de la profilina de polen de palmera.....	80
IV.4.2	Pruebas cutáneas.	83
IV.4.3	<i>Prueba de provocación conjuntival.</i>	83
IV.4.4	Prueba de provocación bronquial específica	84
IV.5	Estudios aerobiológicos.	88
IV.5.1	Recuento de profilina en el ambiente.	88
IV.5.2	Recuento de pólenes.	90
IV.5.3	Parámetros ambientales y contaminantes atmosféricos.....	94
IV.6	Estudios clínicos. Registro de síntomas.	95
IV.7	Análisis estadístico.	97
IV.8	Consideraciones éticas.....	98
V.	Resultados.....	99
V.1	Características basales de la población.....	100
V.1.1	Datos epidemiológicos	100
V.1.2	Patología Respiratoria.	102
V.1.3	Alergia a alimentos.	108
V.2	Estudio <i>in vitro</i>	110
V.3	Estudios <i>in vivo</i>	123
V.3.1	Pruebas cutáneas	123
V.3.2	Prueba de provocación conjuntival.	131
V.3.3	Prueba de provocación bronquial específica.	134
V.4	Estudios aerobiológicos.	143
V.4.1	Recuento de profilina en el ambiente	143
V.4.2	Recuento de pólenes.	147
1.1.1.1	Relación pólenes con profilina en ambiente	164
V.4.3	Parámetros ambientales y contaminantes atmosféricos.....	172
V.5	Estudios clínicos. Registro de síntomas.	178
V.5.1	Relación síntomas con profilina en ambiente.....	185

VI. Discusión	190
VI.1 Importancia de la secuencia metodológica del estudio.....	193
VI.2 Relevancia de los resultados <i>in vitro</i>	194
VI.3 Relevancia de los resultados <i>in vivo</i>	195
VI.4 Relevancia de los resultados aerobiológicos.....	198
VI.5 Relevancia de los resultados de los estudios clínicos.....	202
VI.6 Relevancia clínica de la profilina.	204
VI.7 Impacto clínico y aplicabilidad de la investigación	208
VI.8 Limitaciones del estudio.....	209
VI.9 Programa de desarrollo de investigación	210
VII. Conclusiones	212
VIII. Bibliografía.	215
IX. ABREVIATURAS.....	234
X. ANEXOS.....	236
X.1 Anexo I Cuaderno de recogida de datos.....	236
X.2 Anexo II Procedimiento cambio de filtro captador <i>Air Sentinel</i> ®	238
X.3 Anexo III Aprobación del estudio por el CEIC del IIS-FJD.	239
X.4 Anexo IV Consentimientos informados	240
X.5 Anexo V: Índice de similitud (Anti plagio).....	252
X.6 Anexo VI: Concesión de beca investigación Fundación SEAIC.....	254
X.7 Anexo VII: Premios y comunicación de resultados.....	255
X.8 Anexo VIII Artículo.....	257

RESUMEN

Introducción

Las profilinas son unas proteínas presentes en la mayoría de las células eucariotas que han demostrado alergenicidad tanto en pólenes como en alimentos. Afecta en torno al 20-30 % de los pacientes con alergia al polen, si bien, el perfil de sensibilización de los pacientes es muy variable, depende fundamentalmente de la distribución geográfica y de otros alérgenos concomitantes.

La sensibilización a profilina se ha relacionado con la polisensibilización a pólenes, debido a que las proteínas de la familia de las profilinas presentan una estructura terciaria similar y por lo tanto una alta reactividad cruzada. Esto, unido a su condición de panalérgeno, ha contribuido a la percepción de la profilina como un factor de confusión en el abordaje de pacientes con alergia respiratoria.

Sin embargo, la relevancia de la profilina no ha sido completamente estudiada. Recientemente, han aparecido estudios que cuestionan la falta de relevancia de la profilina en los pacientes con alergia al polen.

Objetivos

El objetivo de este proyecto es estudiar la relevancia clínica de la profilina e investigar su capacidad de producir síntomas respiratorios en pacientes con alergia al polen. Para ello es necesario conocer cuál es la cantidad de aeroalérgeno de profilina en las distintas estaciones del año en el aire de nuestro entorno, establecer el grado de respuesta alérgica específica a profilina a nivel respiratorio de los pacientes sensibilizados a dicha proteína y determinar la correlación entre la cantidad de aeroalérgeno de profilina en ambiente y los síntomas de los pacientes sensibilizados a la misma.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles, prospectivo, abierto, con una muestra de población de mayores de 14 años con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes. Se incluyeron 85 pacientes, 55 pacientes casos sensibilizados a profilina y 30 controles no sensibilizados. Los casos presentaban una prueba cutánea

positiva con extracto de profilina de palmera (nPho d 2) purificada y los controles fueron aquellos pacientes en los que esta prueba era negativa.

Se realizaron varias intervenciones diagnósticas y seguimiento de pacientes que abarcaron cuatro dimensiones: estudios *in vitro*, *in vivo*, estudios aerobiológicos y clínicos:

- Estudios *in vitro*: se determinó IgE específica a profilina (rPhl p 12 y rBet v 2) y alérgeno purificado (Pho d 2) marcado con biotina. *Immunoblot* con profilina purificada para cada uno de los sueros individuales.
- Estudios *in vivo*: Se realizó prueba de provocación conjuntival con profilina en 15 pacientes (10 casos y 5 controles) y prueba de provocación bronquial a 30 pacientes (20 casos y 10 controles)
- Estudios aerobiológicos: se cuantificó la profilina en ambiente a lo largo de un año mediante captador de partículas *Air Sentinel®*, en ensayo de *ELISA* inhibición y se correlacionó con el polen recogido en captador de polen *Burkard®*.
- Estudios clínicos: los pacientes realizaron un registro diario de síntomas alérgicos respiratorios a lo largo del año en el que se registró la profilina en el ambiente.

Resultados

La presencia de IgE específica sérica frente a distintas profilinas mostró una sensibilidad de la rBet v 2, rPhl p 12 y Pho d 2 de 0,82, 0,74 y 0,69 respectivamente, con una especificidad de 1 en los tres casos. Con una concordancia en términos cualitativos en estos resultados. Además, también se encontró una relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre los resultados del inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) y las tres determinaciones séricas de profilina.

Las pruebas de provocación conjuntival con profilina fueron positivas en el 90 % de los casos y en ninguno de los controles, siendo la mediana de la concentración que alcanzó la positividad de 0,3 $\mu\text{g/mL}$. Las provocaciones bronquiales con profilina fueron positivas en el 95 % de los casos y negativas en todos los controles, siendo la media de la PC20 de 10,55 $\mu\text{g/mL}$ con una DS de 11,87 y rango entre 0,43 $\mu\text{g/mL}$ y 39,36 $\mu\text{g/mL}$.

Se detectó profilina en el ambiente en 133 días, lo que supuso presencia del panalérgeno durante el 36,5 % del año. La profilina presentó un índice anual de 7,641 ng/m³ de aire. El periodo principal de profilina en el ambiente fue del 8 de Marzo al 9 de Agosto, siendo el día pico, en el que se encontró mayor concentración de profilina, el 10 de Junio con 133,6 ng de profilina en el filtro equivalente a 0,56 ng de profilina por m³ de aire. Se observó una relación de la profilina con el polen de *Poaceae* ($\rho=0.24$; $p<0.001$). Si bien hay un decalaje entre el pico de máxima concentración de profilina y el pico de máxima concentración de pólenes de gramíneas de 16 días.

Se observó que la intensidad de los síntomas, a lo largo del año, fue de media 0,56 puntos superior en los casos que en los controles, IC del 95% (0,43-0,70) $p <0,001$. También fueron superiores en los casos los síntomas nasales (0,26 puntos, IC 0,18-0,34) y los síntomas conjuntivales (0,27 puntos, IC 0,23-0,31) $p <0,001$. El riesgo de padecer asma a lo largo del año fue mayor en los casos que en los controles con OR 1,32 IC del 95% (1,19-1,46) ($p <0,001$).

Conclusiones.

Existe profilina en el ambiente a lo largo del año, que es capaz de producir una respuesta alérgica órgano específica, evidenciada en las pruebas de provocación conjuntival y bronquial. Además, los pacientes sensibilizados a este panalérgeno presentaron más intensidad y frecuencia de síntomas respiratorios. Por lo tanto la sensibilización a profilina puede considerarse un marcador de gravedad en pacientes con rinoconjuntivitis y asma por alergia al polen.

ABSTRAC

Introduction

Profilins are proteins that are present in most eukaryotic cells and have demonstrated allergenicity in both pollens and foods. They affect some 20% to 30% of patients with pollen allergy, though the sensitization profile of patients varies widely based on geography and the presence of other concomitant allergens.

Profilin sensitization has been related to pollen polysensitization owing to the fact that proteins of the profilin family have a three-dimensional structure resembling that of pollens, thus conferring high cross-reactivity. Together with the status of profilin as a panallergen, this cross-reactivity has created a perception of profilin as a confounding factor when determining the treatment approach in patients with respiratory allergy.

However, the relevance of profilin has not been fully studied. Recent studies have called into question the perceived lack of relevance of profilin in pollen-allergic patients.

Objectives

This project aims to study the clinical relevance of profilin and its ability to trigger respiratory symptoms in patients with pollen allergy. Doing this requires knowledge of the amount of profilin aeroallergen across the different seasons of the year in our surroundings, establishing the degree of specific respiratory allergic response to profilin in patients sensitized to this protein and determining the correlation between the concentration of profilin aeroallergen in the atmosphere as well as the symptoms presented by sensitized patients.

Methods

An open, prospective, case-control study was performed in a population of patients over 14 years of age with rhinconjunctivitis and/or asthma due to pollen allergy.

Among the 85 patients included, 55 were sensitized to profilin and 30 were nonsensitized controls. Cases had positive skin prick tests to an extract of purified palm profilin (nPho d 2), and controls were those patients with a negative result for this test.

Several diagnostic interventions and follow-up procedures were performed in patients across four dimensions: in vitro, in vivo, aerobiological, and clinical.

- In vitro studies: serum-specific IgE to profilin (rPhl p 12 and rBet v 2) and purified allergen (Pho d 2) marked with biotin. Immunoblotting with purified profilin for each of individual sera.
- In vivo studies: Conjunctival challenge with profilin was performed in 15 patients (10 cases and 5 controls) and 30 patients underwent a bronchial challenge (20 cases and 10 controls).
- Aerobiological studies: The concentration of profilin in the atmosphere was measured over a year with the use of the Air Sentinel® volumetric air sampler, in ELISA inhibition assay and the data obtained were correlated with pollen counts recorded by the Burkard® spore collector.
- Clinical studies: patients recorded daily respiratory-allergy symptoms over the 1-year study period during which environmental profilin was measured.

Results

Presence of serum-specific IgE to different profilins showed a sensitivity of 0.82, 0.74, and 0.69 for rBet v 2, rPhl p 12, and Pho d 2, respectively, with a specificity of 1 in all three cases. Qualitative data for these results were in accordance with quantitative findings. A statistically significant association ($p < 0.001$) was found between the results of immunoblotting with purified profilin (Pho d 2) and the three measurements of profilin in serum.

Conjunctival challenges with profilin were positive in 90% of cases and in none of the controls; the median positive concentration was 0.3 $\mu\text{g/mL}$. Bronchial challenge with profilin was positive in 95% of cases and negative in all controls; mean PC20 concentration was 10.55 $\mu\text{g/mL}$, with a SD of 11.98 and a range of 0.42 $\mu\text{g/mL}$ to 39.36 $\mu\text{g/mL}$.

Profilin was detected in the atmosphere on 133 days, indicating presence of the panallergen 36.5% of the year. The yearly index for airborne profilin was 7.641 ng/m^3 . The main period for presence of environmental profilin was from March 8 to August 9, with peak profilin concentration found on June 10 (133.6 ng in the filter, equivalent to 0.56 ng of profilin per m^3 of air). An association was found between profilin and

Poaceae pollen ($\rho=0.24$; $p<0.001$). However, a 16-day discrepancy was found between the peak profilin concentration and peak concentration of grass pollens.

Throughout the year, symptom intensity was 0.56 higher on average in cases compared to controls (95% CI, 0.43-0.70; $p<0.001$). Individuals included in the case group had more intense nasal symptoms (0.26 points; 95% CI, 0.18-0.34) and conjunctival symptoms (0.27 points, 95% CI, 0.23-0.31; $p<0.001$). Throughout the period studied, the risk of developing asthma was greater in cases than controls (OR, 1.32; 95% CI: 1.19-1.46; $p<0.001$).

Conclusions

Profilin is present in the environment throughout the year, and this allergen is capable of triggering an organ-specific allergic response, as evidenced by the results of conjunctival and bronchial challenge testing. Furthermore, patients sensitized to this panallergen had more intense and more frequent respiratory symptoms. Therefore, profilin sensitization may be considered a marker of severity in patients with rhinconjunctivitis and asthma due to pollen allergy.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1 Fisiopatología de la sensibilización alérgica.....	26
Figura I-2 Mecanismos inmunológicos de la fase efectora de las reacciones alérgicas.	27
Figura I-3 Clasificación de la rinitis alérgica.	29
Figura I-4 Clasificación de la gravedad del asma.....	33
Figura I-5 Clasificación del control del asma.....	34
Figura I-6 Reactividad cruzada de Phl p 12 con otras profilinas de pólenes y alimento	48
Figura I-7 Homología de identidad y secuencia entre distintas proteínas de la familia de las profilina.....	49
Figura I-8 Índice de identidad de secuencia y similitud para valorar el riesgo de reactividad cruzada (A-RISC) de distintas familias de proteínas.....	50
Figura I-9 Valores de índice A-RISC enter las distintas proteínas de la familia de las proteínas.....	51
Figura I-10 A) Porcentaje de identidad de secuencia de los epítomos 1, 7 y 8 en comparación con la secuencia de Phl p 12.2. D) E) F) Epítomos conformacionales de profilinas vegetales	52
Figura I-11 Alineación de las secuencias de las moléculas de profilina homólogas en Phl p 12, Ole e 2, Bet v 2 and Mal d 4.	53
Figura I-12 Prevalencia de sensibilización a profilina (Mal d 4) en la zona sur de España.....	56
Figura I-13 Prevalencia de sensibilización a profilina (Mal d 4) en la zona norte de España.....	57
Figura I-14 Cinética de liberación de Phl p 1, Phl p 5 y Phl p 12 del polen del Phleum	66
Figura IV-1 Cronograma del estudio.....	74
Figura IV-2 Resumen gráfico de la metodología del estudio	75
Figura IV-3 Cronograma: Día de inclusión en el estudio.....	77
Figura IV-4 Cronograma: estudios in vivo.....	80
Figura IV-5 Urea 6 M gradiente de elución de profilina Pho d 2	81
Figura IV-6 Proceso de purificación de Proteína de palmera Pho d 2.....	81
Figura IV-7 SDS e Inmunoblot frente a profilina de palmera Pho d 2	82
Figura IV-8 Espectrometría de Masas con extracto de profilina de palmera Pho d 2....	82
Figura IV-9 Concentraciones de profilina de las prueba de provocación conjuntival.	84
Figura IV-10 Concentraciones de profilina de las prueba de provocación bronquial específica	86

Figura IV-11 Cronograma estudios clínicos y aerobiológicos	88
Figura IV-12 Captador de partículas de alto volumen (Air Sentinel®).....	88
Figura IV-13 Ubicación captador de partículas de alto volumen (Air Sentinel®)	89
Figura IV-14 Captador Burkard® situado en Azotea del Hospital Universitario Infanta Elena	91
Figura IV-15 Partes del captador Burkard® (9).....	91
Figura IV-16 Representación de barridos de lectura de polen..	92
Figura IV-17 Situación captadores Getafe, Valdemoro y Aranjuez	93
Figura IV-18 16 A: Distancia HUIE Captador Getafe B: Distancia HUIE Captador Aranjuez.....	94
Figura IV-19 Distancia del centro de recogida de datos al HUIE.....	95
Figura IV-20 Cronograma: Registro de síntomas	97
Figura V-1 Distribución de la edad en los pacientes del estudio	100
Figura V-2 Distribución de la edad en casos y controles.....	101
Figura V-3 Sexo en casos y controles	102
Figura V-4 Distribución gravedad de rinitis.	103
Figura V-5 Distribución de la clasificación de la rinitis según ARIA	103
Figura V-6 Distribución del tiempo de evolución de la rinitis	104
Figura V-7 Distribución del tiempo de evolución de la rinitis en casos y controles.....	105
Figura V-8 Distribución del tiempo de evolución del asma	106
Figura V-9 Distribución del tiempo de evolución del asma en casos y controles.....	106
Figura V-10 Distribución de la clasificación de gravedad del asma.	107
Figura V-11 Distribución clasificación control del asma.....	108
Figura V-12 Correlación entre rPhl p 12 y rBet v 2 medido por InmunoCAP® en los casos.	113
Figura V-13 IgE específica a Phl p 12 y Bet v 2	114
Figura V-14 Correlación IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina con rPhl p 12 medido por InmunoCAP® en los casos.....	117
Figura V-15 Correlación IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina con rBet v2 medido por InmunoCAP® en los casos.	117
Figura V-16 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 1-13.....	118
Figura V-17 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 14-26.....	119

Figura V-18 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 27-39.	119
Figura V-19 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 40-51.	120
Figura V-20 Histograma de sensibilizaciones a inhalantes de casos y controles.	126
Figura V-21 Histogramas de sensibilizaciones a pólenes de casos y controles	128
Figura V-22 Concentración de Profilina Pho d 2 a la que se produjo el resultado positivo en los 9 casos positivos.	132
Figura V-23 Media de puntuación de síntomas en provocación conjuntival con Pho d 2 purificada.	133
Figura V-24 Efectos adversos con prueba de provocación conjuntival con Pho d 2 purificada.	133
Figura V-25 Porcentaje de descenso del FEVI de los casos tras la PPBE con profilina	137
Figura V-26 Nº de casos positivos en cada una de las concentraciones finales de profilina.	137
Figura V-27 Concentraciones de profilina que produjeron un resultado positivo por cada paciente.	138
Figura V-28 PC20 en cada uno de los casos en orden creciente.	139
Figura V-29 Resultado de la PPBE con Profilina en casos y controles.	140
Figura V-30 Síntomas adicionales entre los casos tras la PPBE con profilina.	141
Figura V-31 Frecuencia de síntomas adicionales en los casos tras la PPBE con profilina.	142
Figura V-32 Niveles de profilina por filtro a lo largo de un año (ng/filtro).....	144
Figura V-33 Niveles de profilina en ambiente a lo largo de un año (ng/m ³).....	145
Figura V-34 cantidad de profilina en ambiente por mes a lo largo de un año.	146
Figura V-35 Porcentajes de representación de los pólenes más relevantes en las estaciones de Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	158
Figura V-36 Comparación del IPA y duración rotal del PPP de gramíneas en las estaciones de Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	160
Figura V-37 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de gramíneas.	165
Figura V-38 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen del Olivo.	166
Figura V-39 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de árbol del plátano.	167

Figura V-40 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de Quercus.....	168
Figura V-41 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de Plantago.	169
Figura V-42 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de cupresáceas.	170
Figura V-43 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y la suma de granos de polen.	171
Figura V-44 Pluviosidad anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.....	172
Figura V-45 Humedad Relativa anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.	173
Figura V-46 Temperatura anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.....	173
Figura V-47 Velocidad del viento anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.....	174
Figura V-48 Radiaciones solares a lo largo del año en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.	174
Figura V-49 Concentración de ozono anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.....	175
Figura V-50 Partículas en suspensión de menos de 2,5 micras anuales en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.	175
Figura V-51 Presión barométrica anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.....	176
Figura V-52 Concentración de dióxido de carbono anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.	176
Figura V-53 Concentración de monóxido de nitrógeno anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.	177
Figura V-54 Intensidad total media de todos los síntomas en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	179
Figura V-55 Porcentaje de pacientes con algún síntoma en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	180
Figura V-56 Intensidad total media de los síntomas nasales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	181

Figura V-57 Porcentaje de pacientes con síntomas nasales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	181
Figura V-58 Intensidad total media de los síntomas oculares en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	182
Figura V-59 Porcentaje de pacientes con síntomas oculares en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	182
Figura V-60 Intensidad total media de los síntomas bronquiales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	183
Figura V-61 Porcentaje de pacientes con síntomas bronquiales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.....	183
Figura VI-1 Secuencia metodológica del estudio de relevancia clínica de la profilina.	192
Figura X-1 Software antiplagio: 2% similitud.....	252
Figura X-2 Software antiplagio. Ejemplo 1.....	253
Figura X-3 Software antiplagio. Ejemplo 2	253
Figura X-4 Software antiplagio. Ejemplo 3.....	253

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1 Porcentaje de sensibilización a pólenes de los pacientes con rinoconjuntivitis de la comunidad de Madrid (27).....	38
Tabla I-2 Alérgenos del polen de gramíneas.	43
Tabla I-3 Alérgenos del polen de árboles.....	45
Tabla I-4 Alérgenos las plantas herbáceas.....	47
Tabla I-5 Profilinas descritas en pólenes.....	55
Tabla I-6 Determinación de profilina en extractos de polen.....	60
Tabla I-7 Profilinas descritas en alimentos.....	62
Tabla V-1 Edad media en casos y controles	101
Tabla V-2 Sexo en casos y controles	101
Tabla V-3 Antecedentes familiares de atopia.....	102
Tabla V-4 Clasificación rinitis gravedad y duración	103
Tabla V-5 Clasificación de la rinitis según la guía ARIA.	103
Tabla V-6 Tiempo de evolución de la Rinitis (años)	104
Tabla V-7 Tiempo de evolución del asma	105
Tabla V-8 Clasificación de la gravedad del asma.	107
Tabla V-9 Clasificiación control del asma	108
Tabla V-10 Alergia a alimentos. Clínica casos y controles	109
Tabla V-11 Alimentos implicados en alergia a alimentos	110
Tabla V-12 Valores de rPhl p 12 y rBet v 2 de los casos.....	112
Tabla V-13 IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina	116
Tabla V-14 Correlación inmunoblot con rPhl p 12 , rBet v 2 y Pho d 2,.....	120
Tabla V-15 Correlación cualitativa entre las técnicas de detección de IgE específica a profilina.....	121
Tabla V-16 Resultados de técnicas <i>in vitro</i>	123
Tabla V-17 Resultados pruebas cutáneas a grupos de inhalantes.....	123
Tabla V-18 Resultados pruebas cutáneas a alérgenos.....	125
Tabla V-19 Polisensibilizados a Inhalantes.	125
Tabla V-20 Media y mediana de sensibilizaciones a inhalantes en casos y controles.	125
Tabla V-21 Número de sensibilizaciones a inhalantes en casos y controles.	125
Tabla V-22 Polisensibilización a pólenes en casos y controles.	126
Tabla V-23 Número de sensibilizaciones a pólenes en casos y controles.	127
Tabla V-24 Frecuencia de alergia a alimentos.	128

Tabla V-25 Sensibilización a alimentos en casos y controles.	129
Tabla V-26 Sensibilización a panalérgenos en casos y controles.	130
Tabla V-27 Medidas de validez de alergia a frutas y síndrome de alergia oral.	131
Tabla V-28 Prueba de provocación conjuntival con Profilina Pho d 2 purificada.	131
Tabla V-29 Puntuación en prueba de provocación conjuntival con Pho d 2 purificada.	132
Tabla V-30 PPBE con Profilina de palmera Pho d 2 purificada en casos..	135
Tabla V-31 PPBE con Profilina de palmera Pho d 2 purificada en controles	135
Tabla V-32 FEV1 basal y tras diluyente.	136
Tabla V-33 FEV1 finales y porcentaje de descenso tras PPBE.	136
Tabla V-34 PC20 tras PPBE con profilina.....	139
Tabla V-35 Resultado de la PPBE con Profilina.	140
Tabla V-36 Síntomas adicionales tras la PPBE en cada uno de los pacientes.	142
Tabla V-37 Cantidad de profilina en ambiente por mes a lo largo de un año.....	146
Tabla V-38 Recuentos de pólenes en estación de Valdemoro.	150
Tabla V-39 Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	151
Tabla V-40 Recuentos de pólenes en estación de Aranjuez.	154
Tabla V-41 Recuentos de pólenes en estación de Getafe.	157
Tabla V-42 Tipos polínicos con mayor incidencia atmosférica en Valdemoro, Aranjuez, Getafe. IPA y porcentaje de representación sobre el polen total.	158
Tabla V-43 Tipo polínico <i>Gramineae</i> . Parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	159
Tabla V-44 Tipo polínico <i>Olea</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	161
Tabla V-45 Tipo polínico <i>Quercus</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	161
Tabla V-46 Tipo polínico <i>Platanus</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	162
Tabla V-47 Tipo polínico <i>Cupressaceae/Taxaceae</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.....	162
Tabla V-48 Tipo polínico <i>Acer</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	163
Tabla V-49 Tipo polínico <i>Pinaceae</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	163

Tabla V-50 Tipo polínico <i>Ulmus</i> . Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.	164
Tabla V-51 Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros medioambientales y concentración de profilina en ambiente.	177
Tabla V-52 Coeficientes de regresión lineal de la media de intensidad de síntomas de los casos con respecto a los controles.	184
Tabla V-53 Coeficientes de correlación logística en la comparación de presencia de síntomas en casos y controles.	185
Tabla V-54 Estadística de correlación entre la concentración de profilina en ambiente con la intensidad media de los síntomas y la presencia de síntomas.	186
Tabla V-55 Estadística de correlación entre la profilina como variable cualitativa con la intensidad media de los síntomas y la presencia de síntomas.	187
Tabla V-56 Estadística de correlación entre la profilina como variable cuantitativa/cualitativa con la diferencia en la intensidad media de los síntomas de casos y controles.	188
Tabla V-57 Correlación de las variables medioambientales en la diferencia entre los síntomas nasales totales medios de casos y controles.	189

I. INTRODUCCIÓN

I.2 Alergia

El sistema inmune está preparado para reconocer e intentar eliminar todos los agentes nocivos que se introducen en el cuerpo humano. Estos agentes actúan como antígenos frente a los que se desencadena la respuesta inmunitaria. En ocasiones esta respuesta puede ir dirigida frente a un antígeno inocuo, en estos casos, nuestro propio sistema inmune puede producir una reacción inadecuada y desproporcionada que puede llegar a dañar el propio tejido sin proporcionar ningún beneficio ni protección para el paciente, en estos casos se habla de reacciones de hipersensibilidad(1).

Las reacciones de hipersensibilidad son una respuesta inmune excesiva y / o patógena frente a antígenos extraños o propios(2). Gell y Coombs fueron los primeros en clasificar las reacciones de hipersensibilidad en 4 tipos de acuerdo con la fisiopatología(3) que actualmente siguen vigentes(2).

1. Hipersensibilidad tipo I o hipersensibilidad inmediata, está mediada por anticuerpos IgE. Es la base de las enfermedades alérgicas
2. Hipersensibilidad tipo II, mediada por anticuerpos IgG o IgM mecanismo fundamental de muchas de las enfermedades autoinmunes
3. Hipersensibilidad tipo III, mediada por inmunocomplejos, responsable de enfermedad del suero y fenómeno de Arthus, en función de si la afectación es sistémica o local.
4. Hipersensibilidad tipo IV o hipersensibilidad retardada, mediada por linfocitos T. Mecanismo fundamental en la dermatitis de contacto o en el rechazo agudo de trasplante de órganos.

Los tres primeros tipos de hipersensibilidad son mediadas por inmunidad humoral y el cuarto por inmunidad celular, si bien, existe una diferencia fundamental entre la hipersensibilidad tipo I y las otras dos reacciones medidas por anticuerpos. Las reacciones tipo II y III puede ocurrir en todos los individuos, mientras que en el caso de las reacciones mediadas por IgE se presentan en personas con una susceptibilidad individual (atópicos) expuestos a un antígeno específico(4).

En las reacciones alérgicas medidas por RH tipo I se distinguen dos fases fundamentales(5)

- **Fase de sensibilización:** en esta fase el contacto con el antígeno desencadena una respuesta inmunológica específica frente al mismo, todavía sin repercusión clínica.
- **Fase efectora:** en la que en posteriores contactos con el mismo antígeno al que el paciente ha sido sensibilizado desencadena la liberación en mastocitos y basófilos de mediadores preformados y otros sintetizados *de novo* que producen la sintomatología alérgica.

Los mecanismos inmunológicos que ocurren en la **sensibilización alérgica** se inician con la presentación del antígeno por las células dendríticas a los linfocitos Th2 alérgeno específicos en un proceso parcialmente dependiente de IL-4, en unas condiciones ambientales determinadas. Se produce la activación de los linfocitos B específicos del mismo alérgeno, que con la acción de las IL-4 e IL13 producidas por los linfocitos Th2 producen el cambio de clase de los linfocitos B para que produzcan inmunoglobulinas IgE específicas del alérgeno. Estos anticuerpos IgE específicos se unirán a la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos) a través de los receptor de IgE de alta afinidad FcεRI, lo que produce la sensibilización del paciente(6) (Figura I-1)

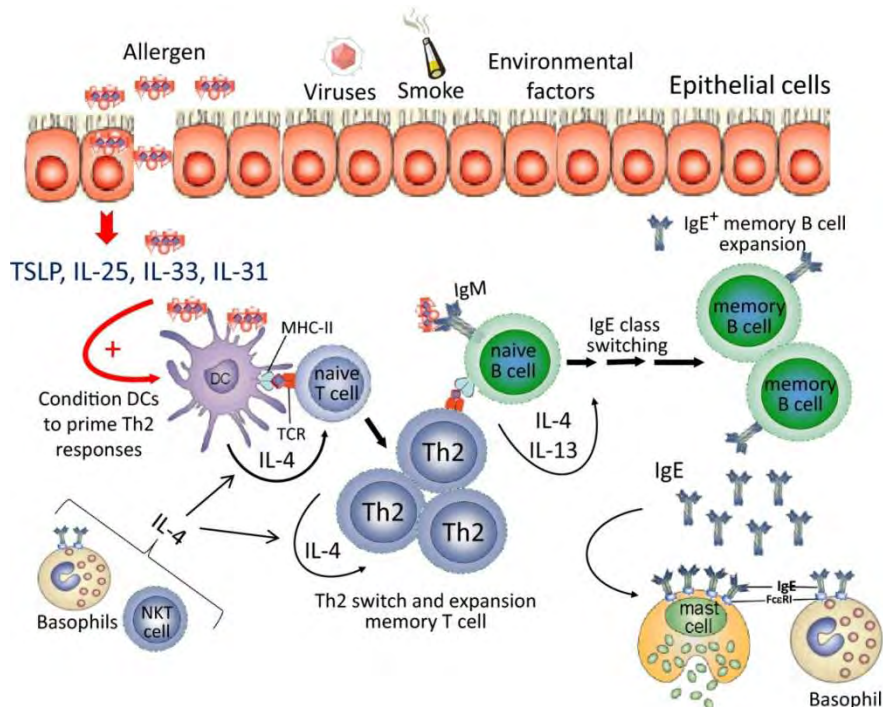


Figura I-1 Fisiopatología de la sensibilización alérgica. Tomada de Palomares Immunol Rev. 2017 (6)

La fase efectora de las reacciones alérgicas se produce en pacientes sensibilizados, que vuelvan a tener contacto con el mismo alérgeno, este se une a las IgE específica de ese alérgeno que ya están presentes en basófilos y mastocitos de estos pacientes sensibilizados, provocándose la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, proteasas, prostaglandinas, leucotrienos y citocinas, responsables de la inflamación aguda y los síntomas de la fase inmediata. La acumulación de estos mediadores, así como, la activación de linfocitos Th2 específicos del alérgeno contribuyen a esta inflamación, además, tal y como se ha comprobado recientemente(7) las células linfoides innatas tipo 2, activadas por citocinas derivadas de las células del endotelio, producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, por lo tanto tienen un papel importante en el mantenimiento niveles de IgE alérgenos específicos, eosinofilia y en el reclutamiento de células inflamatorias que perpetúan la inflamación, producción de moco y el daño tisular, lo que lleva a las manifestaciones clínicas más graves y a la inflamación crónica(6,8) (Figura I-2).

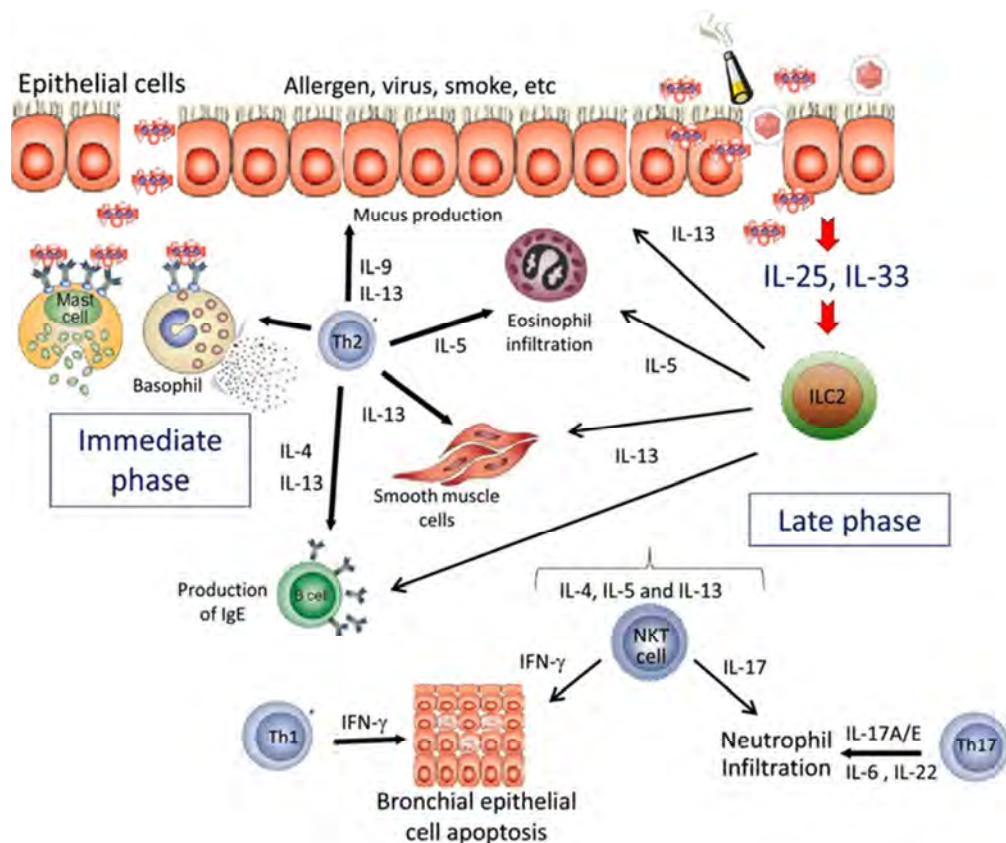


Figura I-2 Mecanismos inmunológicos de la fase efectora de las reacciones alérgicas. Tomada de Palomares Immunol Rev. 2017(6).

Los alérgenos que pueden desencadenar las reacciones alérgicas pueden ser inhalados, como ocurre con los aeroalérgenos, ingeridos vía oral, como alimentos o medicamentos, o inoculados como es el caso de algunos fármacos, venenos de picaduras de insectos, etc.

Las principales enfermedades alérgicas son la rinitis alérgica, el asma alérgica, la alergia alimentaria, la dermatitis atópica y la anafilaxia(9)

Las enfermedades alérgicas son un problema de salud importante en todo el mundo con un deterioro significativo de la calidad de vida de los pacientes(10–12), con un alto impacto socioeconómico(13,14)

La prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado en las últimas décadas, según se ha reflejado en varios estudios epidemiológicos, estimándose que puede llegar a afectar hasta el 30% de la población en todo el mundo(15–20).

I.3 Rinitis, conjuntivitis y asma alérgica.

La **rinitis alérgica** (RA) se encuentra entre las enfermedades más frecuentes a nivel mundial(21). La RA se define como "el conjunto de síntomas mediados inmunológicamente,

de tipo inflamatorio, tras la exposición al alérgeno, y que incluyen prurito, estornudos, obstrucción/congestión nasal y rinorrea/descarga posterior, que pueden revertir espontáneamente o tras medicación"(22).

La prevalencia de rinitis alérgica es variable a lo largo de todo el mundo afectando en torno a un 10-30 % de la población(22,23). Los resultados pueden variar si están basados en el diagnóstico médico encontrándose prevalencia del 15%(24); sin embargo, se estima que la prevalencia se eleva hasta el 30% cuando los síntomas son referidos por los pacientes(25).

La edad en la que se encuentra una mayor prevalencia de rinitis alérgica es de la segunda a la cuarta década de la vida y luego disminuye gradualmente estando la media de edad a los 31,3 años(22,23,26).

En un estudio realizado en España (ALERGOLÓGICA 2015) se observó que la rinoconjuntivitis era el motivo de consulta más frecuente en las consultas de Alergología (52,5 % del total), obteniéndose resultados similares al estudio realizado

10 años antes (55,5% de las consultas) y 23 años antes (57,4%)(27). En este estudio la edad media fue 29,9 años. Los factores de riesgo para desarrollar RA incluyen antecedentes familiares de atopia, sexo masculino, presencia de IgE específica de alérgenos, IgE sérica mayor de 100 UI/ml antes de los 6 años y / o un nivel socioeconómico más alto(28). Aunque estudios recientes han evaluado el vínculo entre la contaminación y el desarrollo de RA, todavía no existe una correlación significativa de manera definitiva.(29)

La clasificación de la rinitis alérgica se realiza, según la guía ARIA(21). En base a la duración y gravedad de la misma. En función de la duración, de forma que será persistente si los síntomas se presentan durante más de cuatro días a la semana y más de cuatro semanas al año, serán una rinitis intermitente si la duración es menor en uno de estos dos casos. La clasificación de la gravedad se realizará según criterios clínicos, basados en la presencia o no de alteraciones del sueño, afectación de las actividades cotidianas, afectación de las tareas escolares o laborales y si lo síntomas son molestos o no. De esta forma se clasifica entre tres estadios de gravedad: leve, moderada y grave(30) (Figura I-3). Esta clasificación ha sido validada en población adulta, infantil y en adultos con y sin tratamiento(31–34).

1. Según duración		
Intermitente	Persistente	
Los síntomas presentes \leq 4 días a la semana o durante \leq 4 semanas consecutivas	Los síntomas están presentes $>$ 4 días a la semana y $>$ 4 semanas consecutivas	
2. Según gravedad		
Leve	Moderada	Grave
Ninguno de los siguientes ítems está presente: <ul style="list-style-type: none"> • Alteración del sueño • Afectación de las actividades cotidianas, de ocio y/o deportivas • Afectación de las tareas escolares o laborales • Los síntomas son molestos 	<ul style="list-style-type: none"> • Uno, • Dos, • o tres de los anteriores ítems están presentes	Los cuatro ítems están presentes

Figura I-3 Clasificación de la rinitis alérgica según la Guía GEMA (30).

Así se combinan la duración y severidad de la rinitis alérgica dando lugar a cuatro categorías con relevancia a la hora de instaurar tratamiento como son: rinitis intermitente leve, intermitente moderada-grave, persistente leve y persistente

moderada-grave. De esta forma la mayoría de las intermitentes son leves (82%) mientras que el 56 % de las persistentes son moderadas/graves(22). En España, en un estudio reciente, la RA fue leve en el 29.9% de los casos, moderada en el 59.7% y severa en el 8.7%(27).

La rinitis alérgica intermitente parece ser más común en el grupo de edad pediátrica, mientras que la rinitis persistente es más frecuente en adultos(35).

La rinitis alérgica presenta una carga económicamente importante. Un estudio realizado en España (proyecto FERIN) estableció que el coste por paciente y año era de 2.326,70 € (costes directos 553,80 €; e indirectos 1.772,90 €)(36). La importancia de los costes está fundamentalmente ligada a los costes indirectos asociados a la pérdida de productividad en el trabajo. Una revisión sistemática de 2018 en la que evaluaban el impacto de la rinitis en la productividad laboral estimó que el 3.6% de los adultos habían faltado al trabajo y el 36% tenía un rendimiento laboral deficiente debido a la rinitis alérgica(37).

La etiología de la rinitis alérgica son los pólenes, ácaros, hongos y epitelios fundamentalmente. En el estudio Alergológica 2015 realizado en España el polen fue el alérgeno más relevante (70.8%), seguido de los ácaros (43,2%), epitelios de animales (21,3%) hongos (7,6%) y otros (3,3%). En este estudio la mayoría de los pacientes estaban sensibilizados a un grupo alergénico (66,6%) siendo el polen en el 42,26%, los ácaros del polvo en el 20,6, los epitelios de animales en el 1,2 % y los hongos en el 0,9%. Sin embargo polisensibilización a varios grupos alergénicos fue bastante relevante de forma que en el 23,3% de los casos afectan a dos grupos alérgenos y el en 10,1% a tres(27).

Los pacientes con rinitis alérgica generalmente también tienen conjuntivitis alérgica(38). La mayoría de las personas con asma tienen rinitis. Los factores que determinan qué enfermedad atópica se desarrollará en una persona individual y las razones por las cuales algunas personas tienen solo rinitis y otras tienen rinitis junto con eczema, conjuntivitis o asma aún no están claras(23).

La presencia de rinitis alérgica (intermitente o persistente) aumenta significativamente la probabilidad de asma, de forma que, hasta el 40% de las personas con rinitis alérgica tienen o tendrán asma(39,40). La capacidad de controlar el

asma en personas con asma y rinitis alérgica se ha relacionado con el control de la rinitis alérgica(41).

Se estima que los síntomas oculares están presentes en el 40–60% de los pacientes alérgicos(42,43) y contribuyen significativamente a la mala calidad de vida(44,45). En la mayoría de los casos la **conjuntivitis alérgica** se asocia a rinitis, de forma que en el estudio Alergológica 2015 solo el 2,4% de los pacientes presentaron conjuntivitis aislada(27), datos similares al estudio realizado 10 años antes(46).

El Grupo de interés para la alergia ocular de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) describe dos entidades la conjuntivitis alérgica estacional y perenne(47). La conjuntivitis alérgica estacional se define como una reacción alérgica mediada por IgE, generalmente asociada con rinitis. Es más frecuente desde la primavera hasta el otoño, cuando los niveles de polen son altos. El síntoma distintivo es el prurito intermitente; sin embargo, lagrimeo, enrojecimiento conjuntival, edema de párpados e hipertrofia papilar de la conjuntiva tarsal son signos comunes pero inespecíficos. Los signos y síntomas surgen y disminuyen dependiendo de la exposición del paciente al alérgeno(48).

La conjuntivitis alérgica perenne es una reacción mediada por IgE a los alérgenos que están presentes durante todo el año como ácaros del polvo, epitelios de animales y hongos de la humedad, o debido a múltiples sensibilizaciones a pólenes. Se caracteriza por los mismos signos y síntomas que conjuntivitis alérgica estacional, sin embargo, la conjuntivitis alérgica perenne es una afección crónica, con síntomas persistentes, con frecuencia leves, que pueden empeorar con una exposición a los alérgenos y exacerbarse en relación con factores irritantes inespecíficos.

En el documento de consenso sobre conjuntivitis alérgica elaborado por el comité de rinoconjuntivitis de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC)(49), de acuerdo con el documento previo de la Academia Europea de Alergia e Inmunología clínica (EAACI)(47) establecen una clasificación en base a la duración e intensidad de los síntomas, de forma paralela a como se establece en la rinitis en la guía ARIA(21) clasificando la conjuntivitis alérgica en Intermitente/persistente y en leve, moderada y grave.

La sospecha clínica de conjuntivitis alérgicas según este grupo de consenso(49) se establece cuando el paciente presenta dos síntomas como prurito e hiperemia

conjuntival bilateral junto con al menos 3 de los siguientes criterios: que la clínica ocular se relacione con la exposición a alérgeno ambiental sospechoso; que se asocie a otras patologías alérgicas como rinitis, asma o dermatitis atópica; que presente respuesta a tratamiento farmacológico tópico tales como antihistamínicos, estabilizadores de membrana, fármacos de múltiple acción; ausencia de papilas gigantes en conjuntiva tarsal superior y ausencia de afectación corneal(50–52).

Estudios recientes sugieren que la alta prevalencia de las formas graves de conjuntivitis alérgica, se asociaron significativamente con los niveles de contaminantes del aire tales como NO₂ y PM10(53).

La guía GEMA define el **asma** como “una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiperrespuesta bronquial (HRB) y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente”(30).

Como el resto de las enfermedades alérgicas la prevalencia del **asma alérgica** ha aumentado en los últimos años, de forma que algunos estudios muestran un aumento desde 5% en 1996 a 7.3% en 2016 en la prevalencia del asma alérgica, mientras que en el mismo periodo el asma no alérgica permanece en niveles prácticamente estables (3.4-3.8%)(54,55).

Según el último Informe mundial sobre el asma, casi 340 millones de personas en todo el mundo han sido diagnosticadas de asma(56). La prevalencia del asma varía sustancialmente en todo el mundo, y se ha demostrado que varía de un país a otro hasta un factor de 21(57,58). La prevalencia tiende a ser mayor en los países desarrollados, con la mayor prevalencia de asma en Australia (21%), Suecia (20%), el Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte (18%), los Países Bajos (15%) y Brasil (13%); La menor prevalencia de asma se ha observado en Vietnam (0,8%) y China (0,2%)(58). También se han observado variaciones dentro del país(59,60). Un mayor grado de urbanización, asociado con una mayor exposición a factores de riesgo (por ejemplo, contaminación o estrés prenatal), se ha relacionado con un mayor riesgo de asma(61,62). En España también se han encontrado estas diferencias geográficas posiblemente en función con desarrollo industrial y presencia de contaminantes ambientales(63–65). Se han observado prevalencias de asma diferentes desde 4,7 %

en Albacete, 3,5 % en Barcelona, 1,1 % en Galdakano, 1 % en Huelva y 1,7 % en Oviedo(22,66).

En Alergológica 2015 el asma fue la segunda patología más valorada en las consultas de Alergología de España, suponiendo el 21,2% de las consultas(27), siendo la duración media de la enfermedad en el momento que acudieron a consulta en torno a los 2 años ($\pm 24,7$ meses)

Los pacientes con asma presentan fundamentalmente cuatro signos y síntomas característicos: sibilancias, disnea, tos y opresión torácica. Estos síntomas son generalmente de predominio vespertino y presentes de forma variable, de forma que es frecuente encontrar variaciones estacionales, motivados por desencadenantes alérgenos, así como, otras exacerbaciones en relación con desencadenantes como infecciones víricas, humo del tabaco, ejercicio, emociones, etc.(22).

Las principales guías de manejo del asma GINA(67) y GEMA(30)proporcionan dos sistemas de clasificación del asma basados respectivamente en la gravedad (intermitente, persistente leve, persistente moderada o persistente severa) y en el nivel de control del asma (controlado, parcialmente controlado o no controlado).

La gravedad del asma según la guía GEMA 5.0 se realiza cuando el paciente se encuentra en tratamiento, de forma que en función de los escalones de tratamiento necesarios para conseguir el control se va a encontrar en los distintos niveles de gravedad(30) (Figura I-4).

Clasificación de la gravedad del asma cuando está bien controlada con tratamiento				
Gravedad	Intermitente	Persistente		
		Leve	Moderada	Grave
Necesidades mínima de tratamiento para mantener el control	Escalón 1	Escalón 2	Escalón 3 o escalón 4	Escalón 5 o escalón 6

Figura I-4 Clasificación de la gravedad del asma en adulto según guía GEMA (30).

El grado de control se evalúa en función de si las manifestaciones del asma están presentes o se ven reducidas al máximo por las intervenciones terapéuticas(30) (Figura I-5).

	Bien controlada (<i>Todos los siguientes</i>)	Parcialmente controlada (<i>Cualquier medida en cualquier semana</i>)	Mal controlada
Síntomas diurnos	Ninguno o ≤ 2 días al mes	> 2 días a la semana	Si ≥ 3 características de asma parcialmente controlada
Limitación de actividades	Ninguna	Cualquiera	
Síntomas nocturnos/ despertares	Ninguno	Cualquiera	
Necesidad medicación de alivio (rescate) (agonista β_2 adrenérgico de acción corta)	Ninguna o ≤ 2 días al mes	> 2 días a la semana	
Función pulmonar			
FEV ₁	> 80 % del valor teórico o z-score $(-1,64)$	< 80 % del valor teórico z-score $(-1,64)$	
PEF	> 80 % del mejor valor personal	< 80 % del mejor valor personal	
Exacerbaciones	Ninguna	≥ 1 /año	≥ 1 en cualquier semana

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; PEF: flujo espiratorio máximo

Figura I-5 Clasificación del control del asma según guía GEMA (30)

Según Alergológica 2015 el 38,3% de los pacientes con asma que acudieron a la consulta de alergología de España, presentaba asma intermitente y el 57,5% persistente (28,1% persistente leve, 27,9% persistente moderada y 1,5% persistente grave)(27). En cuanto al control del asma un 35% de los pacientes presentó buen control del asma, un 31% control parcial y un 10% refería mal control, un 28% no completó este apartado.

Varios estudios como el estudio REACT realizado en estados Unidos determina que la mayoría de los pacientes con asma moderada severa (54%) presentaba una falta de control a pesar de un tratamiento adecuado(68), lo que supone un grave problema ya que el asma no controlada puede aumentar la morbilidad y el gasto en

recursos médicos (69). Por lo que es importante comprender los factores de riesgo para el asma no controlada.

Algunos estudios recientes sugieren que la edad avanzada (> 55 años), la sensibilización a dos o más alérgenos, la comorbilidad de rinitis alérgica, la adherencia al tratamiento y la duración del asma son los factores más importantes que contribuyen a la probabilidad de falta de control del asma(54).

La atopia es un factor de riesgo importante de asma en adultos(70), de forma que se ha encontrado una correlación positiva de la gravedad del asma tanto con el tamaño de la pápula del *prick* a algunos alérgenos(71) como con el número de *prick* test positivos (72) aunque otros estudios previos no encontraron esta correlación(73).

Por otro lado, los alérgenos responsables también son importantes en función del lugar, por ejemplo en un estudio realizado recientemente en Turquía se observó que los ácaros del polvo eran los aeroalérgenos más frecuentes encontrados en las pruebas cutáneas en pacientes con rinitis alérgica y asma, mientras que el polen era el alérgeno más común en pacientes que solo tenían rinitis alérgica(74). Además, en este estudio la sensibilización al polen gramíneas y olivo fue mayor en asma leve que en el moderada y severa.

En los pacientes con diagnóstico de asma en el estudio de Alergológica, el 82,2% era asma alérgica. Los pólenes fueron el alérgeno más relevante con 65,6%, seguidos de los ácaros 46,5%, 21,3% epitelios de animales, 10,1% hongos de la humedad y 0,6% otros(27). Se encontraron diferencias geográficas en cuanto a los patrones de sensibilización, de forma que en las zonas de costa es más frecuente la sensibilización a los ácaros, mientras que en las regiones del interior peninsular predomina la sensibilización a los pólenes. Algunos alérgenos fueron más prevalentes en unas comunidades que en otras, así los epitelios de animales se observaron con más frecuencia en Madrid, Canarias y La Rioja, los hongos en Castilla La Mancha, Murcia, Valencia y Extremadura.

Varios estudios han encontrado que la contaminación del aire agrava el asma e incluso puede desencadenar su aparición(75,76). Los contaminantes del aire probablemente causan lesiones oxidativas en las vías respiratorias, lo que provoca inflamación, remodelación y un mayor riesgo de sensibilización(77).

I.4 Alergia al polen

Los pólenes fueron los primeros antígenos que se describen como implicados en la patología alérgica respiratoria, demostrando capacidad de inducir alergia a nivel de las vías respiratorias(78,79). Actualmente, a nivel mundial, la alergia al polen es responsable de rinitis, conjuntivitis y asma alérgicas en un gran número de pacientes, con picos de incidencia a lo largo del año, que suponen un importante problema de salud pública (80). En España a la alergia a los pólenes representan la primera causa de rinitis alérgica y asma extrínseca(27).

Los pólenes de la atmósfera son cuantitativa y cualitativamente distintos en función del clima, la geografía y la vegetación.

Los pólenes de gramíneas son una de las causas más frecuentes alergia respiratoria en todo el mundo(81), debido a su amplia distribución, componen el 20% de la superficie vegetal del planeta(78). Junto a las gramíneas otros pólenes se han descrito como causa importante de rinitis y asma alérgica en Estados Unidos, Japón y Europa, como son el polen de abedul, ambrosía, parietaria, etc. (82). En Europa la distribución de taxones de polen de interés alergológico en el ambiente se ha relacionado con cinco áreas vegetales(83):

- Ártico: abedul
- Central: roble, abedul y gramíneas
- Oriental: gramíneas, artemisa, y ambrosía
- Montañas: gramíneas (con una estación de polinización retrasada tres o cuatro semanas en comparación con las áreas al nivel del mar).
- Mediterráneo: parietaria, olivos, gramíneas y también cipreses.

La zona mediterránea tiene una vegetación característica con plantas del género *Urticaceae* (*Parietaria* spp. y *Urtica* spp.), *Oleaceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae* (*Graminaceae*), *Compositae* (*Asteraceae*) y muchas otras especies alergénicas, con importantes variaciones en cada región y país, de forma que en esta zona la vegetación, muestra características diferentes no solo en comparación con el norte y centro de Europa, sino también dentro de su propio territorio norte o sur, y también en función del ámbito sea urbano o rural(84,85).

Gran parte de España presenta un clima continental con bajos niveles de humedad lo que ocasiona que el polen de gramíneas tenga mayor presencia en la atmósfera, y por lo tanto mayor relevancia en la patología alérgica de este país(78).

Los datos sobre la presencia de pólenes alergénicos en el aire permiten diseñar calendarios de polen con el período de floración aproximado de las plantas en determinadas áreas. De esta manera, aunque la producción y la dispersión de polen de un año a otro dependen de los patrones del clima de pretemporada y de las condiciones que prevalecen en el momento de la polinización, generalmente es posible pronosticar las posibilidades de encontrar altas concentraciones de polen alérgico atmosférico en diferentes áreas(83,86).

Los pólenes con mayor relevancia clínica en España son los procedentes de las cupresáceas en enero a marzo, el polen del plátano de sombra, en marzo-abril, el abedul en abril (sobre todo en macizo galaico), las gramíneas y el olivo de abril a junio, la parietaria de abril a julio y salsola de julio a septiembre. En función de la región geográfica dentro de España, también se encuentran diferencias, de forma que las gramíneas son la primera causa de polinosis en el norte y el centro de la península, el olivo predomina en el sur y la parietaria en las zonas costeras mediterráneas(82).

La alergia al polen es causante del 70.8% de las rinoconjuntivitis vistas en la consulta de alergología, dato que ha aumentado desde el 51.9% en los últimos 10 años. La prevalencia de sensibilización a polen entre los pacientes aumentó en un 50% entre 2005 y 2015, de un 43,8 a un 65,6%, frente a un 10% de aumento entre los años 1992 y 2005(27). Entre los pólenes, las gramíneas fueron en Alergológica 2015 el taxón más importante (73,7%), seguido del polen de olivo (52,1%). No obstante, el porcentaje de pacientes sensibilizados a pólenes de gramíneas, olivo y cupresáceas aumentó considerablemente en comparación con las anteriores ediciones de Alergológica.

En la Comunidad de Madrid también se reflejó un aumento en los porcentajes de sensibilización a los pólenes más frecuentes entre los pacientes con rinoconjuntivitis, según se refleja en la tabla I-1 (27).

	2015	2005
<i>Gramíneas</i>	87,10%	61,90%
<i>Olea europeae</i>	58,90%	45,60%
<i>Platanus acerofila</i>	23,90%	22,10%
<i>Cupressus</i>	40,50%	34,40%
<i>Chenopodium album</i>	9,20%	11,20%

Tabla I-1 Porcentaje de sensibilización a pólenes de los pacientes con rinoconjuntivitis de la comunidad de Madrid (27)

Poaceae (gramíneas)

El polen de gramíneas es la principal causa de polinosis en Europa y en muchas otras partes del mundo debido a la gran alergenicidad que presentan y a su extensa distribución geográfica(83).

La familia de las gramíneas comprende más de 600 géneros y más de 10.000 especies, de las cuales más de 400 plantas herbáceas polinizadas por el viento se encuentran en Europa. Una de las subfamilias más importantes desde el punto de vista alergológico es la *Pooideae* cuyos géneros presentan con más frecuencia polinosis, como son *Phleum*, *Lolium*, *Dactylis*, *Trisetum*, *Festuca*, *Poa*, *Anthoxanthum*, *Holcus*, *Alopecurus* y *Agrostis*. Otra subfamilia importante es la *Chloridoideae*, cuyo principal género es el *Cynodon* (82,83). La reactividad cruzada entre las gramíneas de la familia *pooideae* es muy elevada, por lo que la determinación de IgE específica frente a alguna de ellas es suficiente para el diagnóstico de alergia a gramíneas, en cambio la reactividad cruzada de estas con el *Cynodon* es más reducida por lo que en áreas prevalentes es necesario incluir la determinación de IgE específica frente *Cynodon* aparte(87).

El periodo principal de polinización del polen de gramíneas es bastante amplio y varía en función del área geográfica, si bien, el periodo de polinosis es más corto, ya que correspondería a los días en que los recuentos superan las cifras de umbral de reactivación, de forma que, en el norte, centro y este de Europa, comienza a principios

de mayo y termina a fines de julio. En el área mediterránea, la floración generalmente comienza y termina 1 mes antes(86). En España son los meses de mayo a junio los de más polinización de gramíneas en la mayoría de las localizaciones, siendo el mes de Mayo el de mayor media mensual de polen de gramíneas y mayor intensidad de síntomas de polinosis(82,83).

En cuanto al umbral de reactividad del polen de gramíneas, hay varios estudios que han investigado la concentración de polen con capacidad para producir síntomas en pacientes sensibilizados, y puede ir de 10 a 50 granos / m³ como observaron en este estudio realizado en Londres(83,88). De forma que 10 granos /m³ puede producir síntomas en el 10 % de los pacientes mientras que en otros estudios 37 y 50 granos/m³ en el 100% de los pacientes sensibilizados en Bilbao(89) y Londres(90) respectivamente. En otro estudio 30 granos de pólenes por m³ se correlacionaron significativamente con los síntomas nasales al comienzo de la temporada de polen de gramíneas(91).

Oleaceae.

El principal representante de esta familia es el polen del olivo (*Olea europea*) aunque también tienen otros géneros como los aligustres (*ligustrum lucidum*), fresnos (*Fraxinus excelsior*) o jazmines (*Jasminum officinale*)(82).

El polen del olivo es una de las causas más importantes de enfermedad respiratoria alérgica en la región mediterránea, en países como Turquía, Grecia, Italia y España Pero también en América del Sur, Australia y Sudáfrica (83,92,93).

En España, es la segunda causa principal de polinosis, precedida por polen de gramíneas. Sin embargo, en las regiones del sur de España, el polen de olivo es la principal causa de sensibilización alérgica (84% de las personas sensibilizadas en Jaén y 87% en Ciudad Real)(94).

La principal temporada de polen de olivo en España es de abril a junio. El umbral de reactivación ha sido estudiado en varias ocasiones, estimándose en 400 granos/m³ en un estudio en Jaén(95) y en 153 granos/m³ en otro llevado a cabo en Ciudad Real, aunque este nivel puede variar a lo largo de la estación polínica descendiendo hasta los 34 granos/m³ al final de la estación(82,94).

Platanaceae

El plátano de sombra (*Platanus acerifolia*) es un árbol caducifolio, plantado en zonas urbanas de todo el mundo debido a su resistencia a las enfermedades y a la contaminación del aire. Aunque es muy común en las ciudades de América del Norte y Europa, su potencial como alérgeno se clasifica de manera diferente de un país a otro. La polinización suele ser explosiva y se produce al inicio de la primavera, es decir, marzo/abril o abril/mayo, dependiendo de las condiciones climáticas. Los recuentos de polen varían mucho de unas zonas a otras, de forma que puede suponer entre un 15 y un 46% del recuento total de polen(96,97).

La prevalencia de sensibilización en la Europa mediterránea oscila entre el 3% y el 52% siendo esta última el porcentaje de sensibilizados en un estudio realizado en Madrid(98). El porcentaje de pacientes monosensibilizados a este polen suele ser bajos siendo más frecuentes los pacientes polisensibilizados en posible relación con la reactividad cruzada entre sus alérgenos y otros pólenes.(99,100).

Cupressaceae

La alergia al polen de ciprés es una polinosis de invierno que puede ser causada por varias especies de *Cupressaceae* alrededor de la cuenca mediterránea, en América del Norte y Asia(101,102).

Los taxones más importantes de la familia *Cupressaceae* pertenecen a cinco géneros diferentes: *Cupressus*, *Hesperocyparis*, *Juniperus*, *Cryptomeria* y *Chamaecyparis*, además comparten taxón con el género *Taxus* (*Taxaceae*).

El periodo de polinización puede ser prolongado en función de las plantas que haya en la zona, de forma que *Juniperus oxycedrus* poliniza en octubre, *Cupressus sempervirens* en enero y febrero, *Hesperocyparis arizonica* (*Cupressus arizonica*) en febrero y marzo, y *Juniperus communis* en abril(82).

La prevalencia de sensibilización es variable en función del área geográfica y la población estudiada, de forma que puede ir del 9 al 65% de los pacientes polínicos de la consulta de alergología. Estudios transversales realizados en diferentes intervalos de tiempo han demostrado un aumento importante en el porcentaje de alergia al ciprés en el área mediterránea. La rinitis es el síntoma más frecuente, mientras que la

conjuntivitis es la más molesta en algunos estudios, además se ha identificado un posible fenotipo de pacientes alérgicos a ciprés que asocia tos seca.(103).

Amaranthaceae

La familia *Amaranthaceae* presenta como principales géneros *Chenopodium*, *Salsola* y *Amaranthus* implicados en la producción de polinosis en varias partes del mundo, como el sur de Europa, la parte oeste de los Estados Unidos y determinadas zonas de Oriente Medio(104).Estos pólenes han demostrado capacidad para producir síntomas en pacientes sensibilizados incluso a bajas concentraciones de polen, de forma que en un estudio multicéntrico realizado en España, observaron que si bien las Amarantáceas representaban solo el 1,6% de todo el polen recogido, la prevalencia media de sensibilizaciones en pacientes con polinosis fueron más altas (31%)(105).

En España los pólenes más representativos por su frecuencia de sensibilización son la *Salsola kali* y el *Chenopodium album*. El aumento en la prevalencia de alergia a salsola se ha relacionado con la desertificación que ha experimentado el sur de la Península Ibérica en posible relación con la utilización de las aguas para el riego con la consecuente escasez de las aguas subterráneas a lo que ha podido contribuir el calentamiento global. El aumento ha sido tan importante hasta el punto de que en un estudio realizado en España salsola fue la causa más frecuente de alergia estacional en las zonas semiáridas del sureste(106).

El periodo de polinización de las amaranthaceas puede ir de marzo a octubre, si bien, el periodo en el que se encuentran los picos superiores a 40-50 granos/m³ es en agosto- septiembre. Se estima que el umbral de reactividad frente a polen de salsola se sitúa en torno a los 10-15 granos/m³(82).

I.5 Alérgenos del polen

El diagnóstico molecular ha supuesto un gran avance en Alergología, ya que nos permite identificar cual es la proteína responsable de la reacción alérgica en los pacientes sensibilizados. De esta forma, la implicación etiológica de una determinada *fente de alérgenos* como pueden ser los pólenes, inicialmente se realizaba con "extractos de alérgenos", que representaban la mezcla cruda y no fraccionada de proteínas, polisacáridos y lípidos alergénicos y no alergénicos que se obtienen de la

misma (granos de polen). Pero actualmente somos capaces de identificar la molécula alérgica, componente alergénico o alérgeno, que sería "la molécula (proteína o glicoproteína) derivada de una fuente de alérgenos determinada que se identifica mediante anticuerpos IgE".(107).

Los alérgenos de los pólenes presentan unas características comunes, que tienen que ver con su capacidad de penetrar en las vías respiratorias e inducir una respuesta alérgica, de esta forma suelen ser moléculas muy solubles en medios acuosos, que suelen extraerse fácilmente de la fuente natural, con un tamaño relativamente pequeño (5-90 kDa) que presentan diversas funciones bioquímicas, enzimas, proteínas de defensa, estructurales, transportadoras, reguladoras, etc.(108).

Son muchos los alérgenos que se han descrito en los distintos pólenes. Los alérgenos mayores o principales se definen en función de la prevalencia de sensibilización, de forma que serían aquellos alérgenos que cuya sensibilización está presente en más del 50 % de los pacientes con alergia a ese fuente alérgica(107), por otra parte, los alérgenos cuya prevalencia de sensibilización se encuentra por debajo del 50 % se consideran alérgenos menores. En la Tabla I-2 se pueden observar los alérgenos del polen de gramíneas. En la tabla I-3 los alérgenos del polen de los árboles y e en la tabla I-4 los de las plantas herbáceas

Alérgeno	Frecuencia de sensibilización. (%)	PM (kDa)	Función
Grupo 1 (p. ej., Lol p 1)	>90	30	β -Expansina; tiene homología con alérgenos de los grupos 2 y 3
Grupo 2 (p. ej., Lol p 2)	>60	11	Presenta homología con la mitad C-terminal de los alérgenos del grupo 1 y con los alérgenos del grupo 3
Grupo 3 (p. ej., Lol p 3)	70	11	Presenta homología con los alérgenos de los grupos 1 y 2
Grupo 4 (p. ej., Lol p 4)	50-88	57	Enzima del puente de berberina
Grupo 5 (p. ej., Lol p 5)	>90	29-31	Nucleasa monocatenaria con actividad similar a topoisomerasa
Grupo 6 (p. ej., Phl p 6)	76	11	Presenta homología con los alérgenos del grupo 5; asociada con partículas P
Grupo 7 (p. ej., Phl p 7)	>10	6	Polcalcina; presenta homología con Bet v 4, Ole e 3, Aln g 4, Jun o 2

Grupo 10 (p. ej., Lol p 10)	?	12	Citocromo <i>c</i>
Grupo 11 (p. ej., Lol p 11)	65	16	Función desconocida; presenta homología con el alérgeno de Ole e 1 y con el inhibidor de tripsina de la soja
Grupo 12 (p. ej., Phl p 12)	14-93	14	Profilina
Grupo 13 (p. ej., Phl p 13)	50	55-60	Poligalacturonasa
Grupo 15 (p. ej., Phl p 15)	?	9	Función desconocida
Grupo 22 (p. ej., Phl p 22)	?	?	Enolasa
Grupo 23 (p. ej., Phl p 23)	?	9	Función desconocida
Cyn d CP	63	23	Cisteína proteasa; presente en el sorgo de Alepo y en la hierba timotea; presenta homología con enzimas del maíz y del arroz
Cyn d EXY	75	30	Endoxilanasas; presenta homología con enzimas del maíz y del arroz

Tabla I-2 Alérgenos del polen de gramíneas. Tomada de O'Hehir 2017 (108)

Alérgeno	Frecuencia de sensibilización (%)	PM (kDa)	Función
Angiospermas			
Fagales			
Abedul, aliso, carpe, roble, castaño, avellano			
Grupo 1 (p. ej. Bet v1)	>95	17	Transportador de esteroides vegetales; presenta homología con las proteínas relacionadas con la patogenicidad (p. ej., PR-10)
Grupo 2 (p. ej., Bet v 2)	5-37	15	Profilina
Grupo 3 (p. ej., Bet v 3)	<10	24	Polcalcina
Grupo 4 (p. ej., Bet v 4)	20	9	Polcalcina; presenta homología con Aln g 4, Ole e 3, Syr v 3
Grupo 6 (p. ej., Bet v 6)	32	35	Isoflavona reductasa
Grupo 7 (p. ej., Bet v 7)	21	18	Ciclofilina
Grupo 8 (p. ej., Bet v 8)	66	65	Pectina metilesterasa
Grupo 10 (p. ej., Bet v 10)	?	70	Proteína de unión a luminol

Bet v GST	13	27	Glutati3n- S-transferasa
Lamiales			
Olivo, lila, aligustre, fresno			
Grupo 1 (p. ej., Ole e 1)	>90	20	Presenta una homología limitada con el inhibidor de tripsina de la soja y Lol p 11
Grupo 2 (p. ej., Ole e 2)	61-91	15	Profilina
Grupo 3 (p. ej., Ole e 3)	20- >50	9	Polcalcina
Grupo 5 (p. ej., Ole e 5)	35	16	Cu/Zn super3xido dismutasa
Grupo 6 (p. ej., Ole e 6)	5-20	10	Proteína rica en cisteína
Grupo 7 (p. ej., Ole e 7)	>60	10	Proteínas de transferencia de lípidos
Grupo 8 (p. ej., Ole e 8)	8	21	Polcalcina
Grupo 9 (p. ej., Ole e 9)	65	45	1,3-β-Glucanasa,
Grupo 10 (p. ej., Ole e 10)	55	11	Presenta homología con el dominio C-terminal de Ole e 9, el módulo de unión a carbohidratos CBM 43
Grupo 11 (p. ej., Ole e 11)	56-76	39	Pectina metilesterasa
Grupo 12 (p. ej., Ole e 12)			Isoflavona reductasa
Hamamelidales			
Plátano de paseo o plátano de sombra (<i>Platanus acerifolia</i>)			
Pla a 1	84	18	Inhibidor de invertasa
Pla a 2	83	43	Poligalacturonasa
Pla a 3	51	10	Proteína de transferencia de lípidos inespecífica
Pla a 8	90	15	Profilina
Gimnospermas (coníferas)			
Cupressaceae			
Cedro japonés (<i>Cryptomeria japonica</i>)			
Cry j 1	>85	41-45	Pectato liasa; presenta homología con la pectato liasa bacteriana y Amb a 1 y 2
Cry j 2	76	45	Poligalacturonasa
Cry j 3	27	27	Presenta homología con la taumantina, osmotina y el inhibidor de amilasa/tripsina; relacionada con PR-5
Cry j AP	58	52	Aspartato proteasa
Cry j quitinasa	100	34	Quitinasa
Cry j LPT	37	10	Proteína de transferencia de lípidos inespecífica

Cry j CPA9	89	?	Serina proteasa similar a subtilisina vegetal
Cry j IFR	76	34	Isoflavona reductasa; presenta homología con Bet v 5
Especies de enebro (p. ej., <i>Juniperus ashei</i> , <i>Juniperus rigida</i> , <i>Juniperus virginiana</i> , <i>Juniperus oxycedrus</i> , <i>Juniperus communis</i>)			
Grupo 1 (p. ej., Jun a 1)	71	43	Pectato liasa
Grupo 2 (p. ej., Jun a 2)	100	43	Polimetilgalacturonasa
Grupo 3 (p. ej., Jun a 3)	33	30	Presenta homología con la taumantina, osmotina y el inhibidor de amilasa/tripsina; relacionada con PR-5
Grupo 4 (p. ej., Jun o 4)	15	29	Polcalcina
Ciprés (p. ej., <i>Cupressus sempervirens</i> , <i>Cupressus arizonica</i> , <i>Chamaecyparis obtusa</i>)			
Grupo 1 (p. ej., Cup s 1)	50-81	38-42	Pectato liasa
Grupo 2 (p. ej., Cha o 2)	83	45	Poligalacturonasa
Grupo 3 (p. ej., Cup a 3)	63	34	Presenta homología con la taumantina, osmotina y el inhibidor de amilasa/tripsina; relacionada con PR-5
Grupo 8 (p. ej., Cup s 8)	?	14	Profilina

Tabla I-3 Alérgenos del polen de árboles. Tomada de O'Hehir 2017(108)

Alérgeno	Frecuencia de sensibilización (%)	PM (kDa)	Función
Asteraceae			
Ambrosía corta (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>, <i>Ambrosia elatior</i>, <i>Ambrosia psilostachya</i>, <i>Ambrosia trifida</i>)			
Grupo 1 (p. ej., Amb a 1)*	>90	38	Pectato liasa, se escinde en dos cadenas por la proteasa de tipo tripsina del polen
Grupo 3 (p. ej., Amb a 3)	51	11	Plastocianina, proteína que contiene cobre
Grupo 4 (p. ej., Amb a 4)	20-39	30	Proteína tipo defensina con un dominio C-terminal rico en prolina; presenta homología con Art v 1
Grupo 5 (p. ej., Amb a 5)	10-15	5	Proteína básica secretada
Grupo 6 (p. ej., Amb a 6)	21	11	Proteínas de transferencia de lípidos inespecífica
Grupo 7 (p. ej., Amb a 7)	15-20	12	Plastocianina, posible isoalérgeno de Amb a 3
Grupo 8 (p. ej., Amb a 8)	25-56	14	Profilina

Amb a 8)			
Grupo 9 (p. ej., Amb a 9)	10-15	10	Polcalcina, proteína de unión con dos manos EF
Grupo 10 (p. ej., Amb a 10)	9-26	10	Polcalcina, proteína de unión con tres manos EF
Grupo 11	53	37	Cisteína proteasa
Artemisa (<i>Artemisia vulgaris</i>)			
Art v 1	95	28	Dominio similar a defensina vegetal y dominio rico en hidroxiprolina/prolina; presenta homología con Amb a 4, PR-12
Art v 2	33	20	Proteína PR-1 relacionada con la patogenicidad
Art v 3	25-56	12	Proteínas de transferencia de lípidos inespecífica
Art v 4	36	14	Profilina
Art v 5	10	10	Polcalcina
Art v 6	89	44	Pectato liasa; presenta homología con Amb a 1
Escoba amarga (<i>Parthenium hysterophorus</i>)			
Par h 1	>90	31	β -Extensina
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>) (polinización entomófila)			
Hel a 1	65	34	Función desconocida
Hel a 2	31	14	Profilina
Urticaceae			
Parietaria (<i>Parietaria judaica/officinalis</i>)			
Grupo 1 (p. ej., Par o 1)	95	15	Proteína de transferencia de lípidos inespecífica, la isoforma Par j 1.0101, posee actividad de unión a LPS
Grupo 2 (p. ej., Par o 2)	82	10-14	Proteína de transferencia de lípidos inespecífica
Grupo 3 (p. ej., Par j 3)	100	14	Profilina
Grupo 4 (p. ej., Par j 4)	6	9	Polcalcina, proteína de unión a calcio con dos manos EF
Bra n PG	28	43	Poligalacturonasa
Euphorbiaceae			
<i>Mercurialis annua</i>			
Mer a 1	59	14	Profilina
Chenopodiaceae			
<i>Chenopodium album</i>			
Che a 1	77	17	Inhibidor de tripsina; presenta homología con Ole e 1
Che a 2	50-60	14	Profilina
Che a 3	46	10	Polcalcina
Amaranthaceae			
<i>Salsola kali</i>			
Sal k 1	65	38	Pectina metilesterasa
Sal k 2	?	36	Homóloga de proteína cinasa

Sal k 3	67	45	Metionina sintasa
Sal k 4	46	14,4	Profilina
Sal k 5	34-64	18,2	Proteína similar a Ole e 1

Tabla I-4 Alérgenos las plantas herbáceas. Tomada de O'Hehir 2017(108)

I.6 Profilina

I.6.1 ¿Qué son las profilinas?

Las profilinas son unas proteínas que se describieron por primera vez en 1976, son relativamente pequeñas con un tamaño de entre 12 y 15 kDa, están presentes en la mayoría de las células eucariotas. Su función principal es la regulación de la dinámica del citoesqueleto de la actina necesaria en varios procesos de motilidad celular(109). Las profilinas son capaces de unir actina y poly (L-prolina) formando unos complejos profilamentosos que dan nombre a la molécula de profilina(110,111) . Las profilinas también cumplen una función en la trasmisión de señales intracelulares, ya que pueden interactuar con fosfolípidos de membrana, como fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato(112,113).

Se pueden encontrar profilinas en mamíferos, plantas, ácaros(115) otros eucariotas, e incluso en virus(114). Dentro de las plantas existen profilinas en pólenes de gramíneas, árboles y arbustos; también existen profilinas en alimentos, como frutas, legumbres, nueces, semillas y otros vegetales; y en productos como el látex(116).

Fue en 1991 cuando se identificó por primera vez a una profilina como causante de patología alérgica, se trataba de la profilina del abedul Bet v 2(117). Un año después el mismo grupo de investigadores estudiaron la reactividad que había entre pacientes sensibilizados a pólenes de abedul, gramíneas y artemisia, observando que el alérgeno responsable de la reactividad cruzada era la profilina, definiendo por primera vez el concepto de panalérgeno (118).

Desde entonces son muchas las proteínas de la familia de las profilinas, que han demostrado alergenidad, tanto en pólenes como en alimentos, látex, etc. Actualmente en *Allergome Database* hay descritas 212 proteínas de la familia de la profilina diferentes (incluidas las isoformas), lo que supone un 2,81% de todos los alérgenos descritos en la plataforma (7533). Observándose una alta reactividad cruzada entre ellas (Figura I-6).

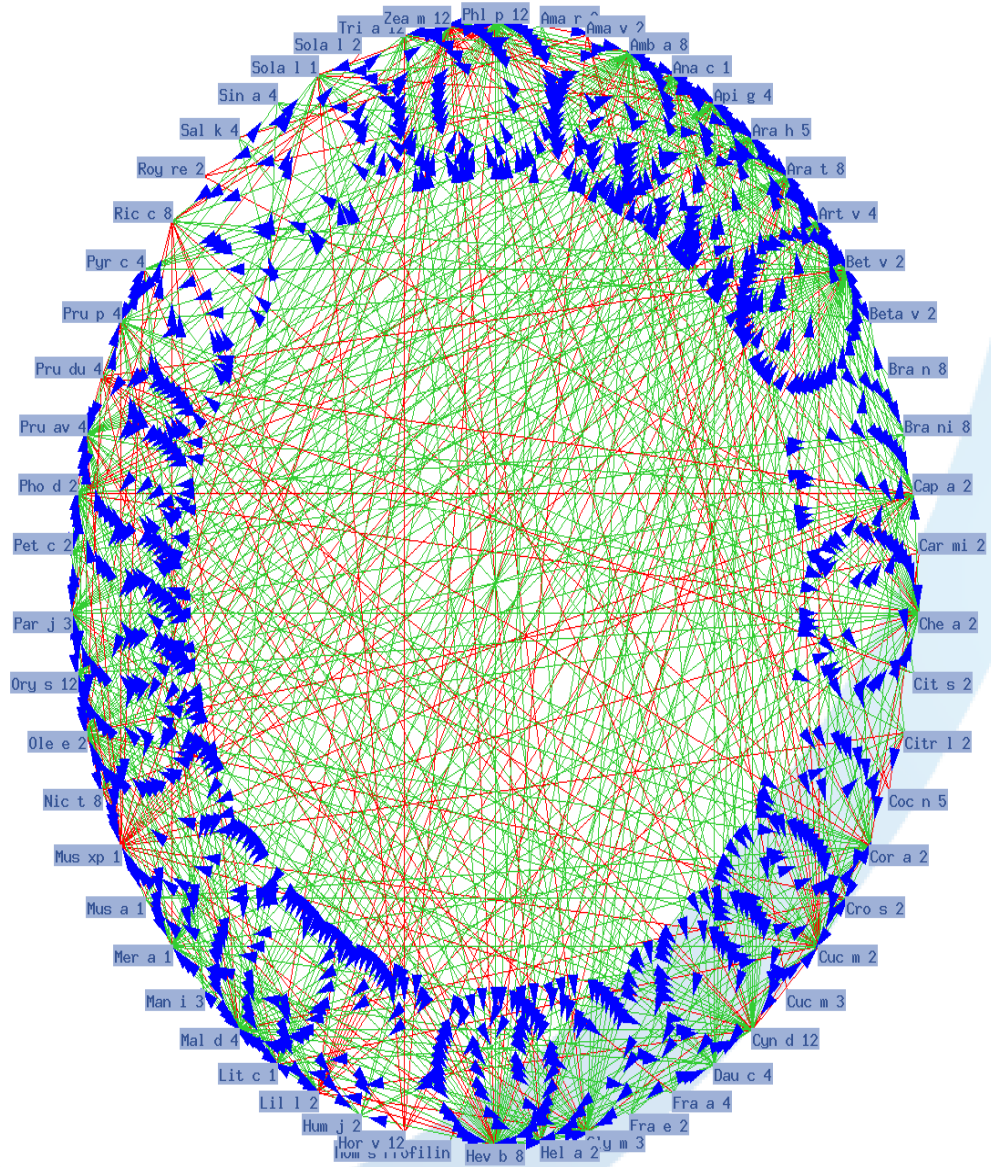


Figura I-6 Reactividad cruzada de Phl p12 con otras profilinas de pólenes y alimentos. Imagen tomada de Allergome: www.allergome.org.

La familia de las profilinas comparte secuencias de aminoácidos altamente conservadas que, en la mayoría de los casos, tienen más del 75% de identidad, incluso entre fuentes distantes(119), y un porcentaje de similitud del 84% con un rango de 43–99%(120) (Figura I-7).

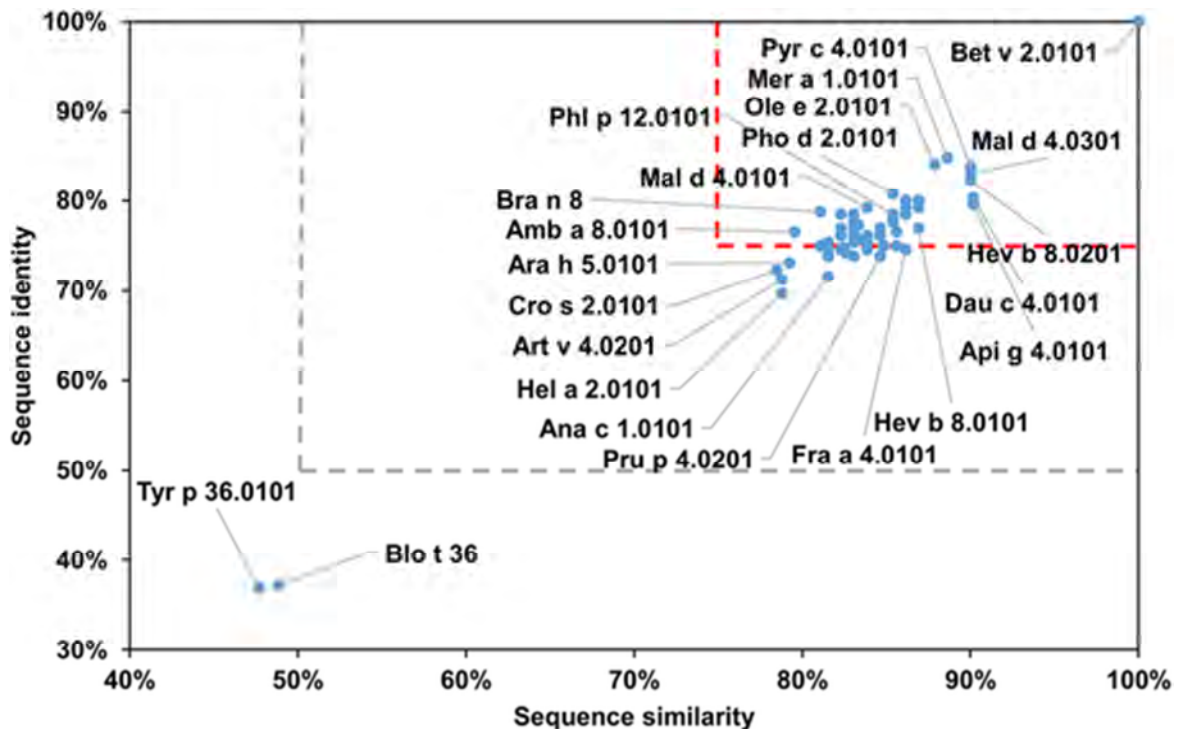


Figura I-7 Homología de identidad y secuencia entre distintas proteínas de la familia de las profilina. Tomada de Chruszcz y col Plos One 2018(120)

En un estudio realizado por Chruszcz y col, (120) propusieron introducir un nuevo índice de riesgo de reactividad cruzada, este índice describe la homología entre dos alérgenos que pertenecen a la misma familia de proteínas y se utiliza para predecir la probabilidad de reactividad cruzada entre ellos, lo denominan por su acrónimo en inglés A-RISC (alérgenos - Identidad relativa, similitud y reactividad cruzada), con lo que describen cuatro categorías de riesgo de reactividad cruzada: alto, medio-alto, medio-bajo y bajo. Los valores del índice A-RISC para las profilinas tienen una media de 0.80 con un rango de 0.73–99, de forma que es el más elevado dentro de las familias de proteínas (Figura I-8).

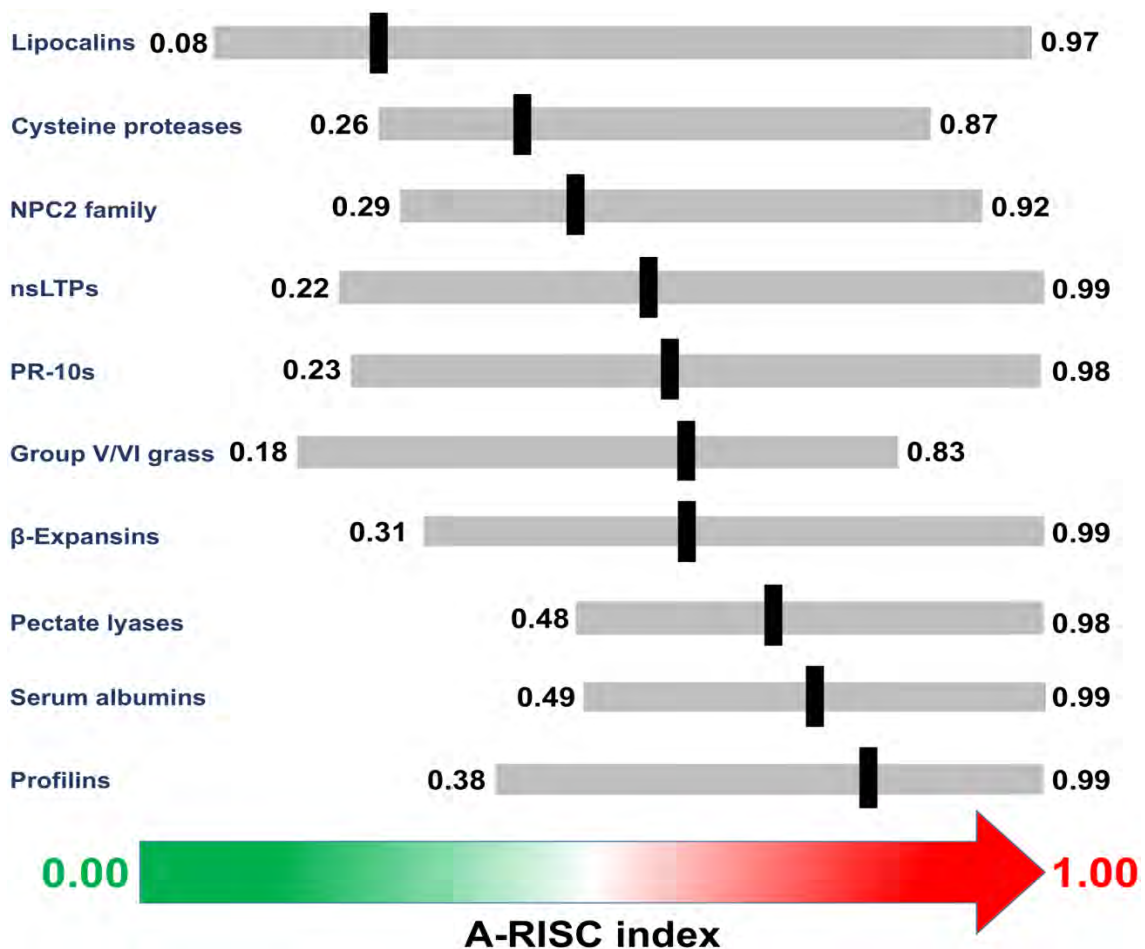


Figura I-8 Índice de identidad de secuencia y similitud para valorar el riesgo de reactividad cruzada (A-RiSC) de distintas familias de proteínas. Tomada de Chruszcz y col Plos One 2018(120)

El índice A-RISC fue de la categoría alta entre todas las profilinas vegetales, de forma que el riesgo de reactividad cruzada de la profilina de las gramíneas Phl p 12 presentó un índice de 0,84 con la profilina del Olivo (Ole e 2) de 0,83 con la profilina de palmera *Phoenix dactylifera* (Pho d 2) de 0,82 con *Salsola kali* (Sal k 4), 0,84 con *Chenopodium album* (Che a 2), 0,83 con *Parietaria judaica* (Par j 3) 0,82 con *Betula verrucosa* (Bet v 2) y 0,86 con *Cynodon dactylon* (Cyn d 12) (Figura I-9).

También se encontró una alta reactividad cruzada del Phl p 12 con la profilina de distintos alimentos como con la profilina de melón (Cuc m 2) que presentó un índice A-RISC de 0,80, con la sandía (Cit la 2) 0,81, con la manzana (Mal d 4) 0,80 o con el melocotón (Pru p 4) 0,82.

Las profilinas de los ácaros, Tyr p 36 y Blo t 36, sí tienen alta reactividad entre sí (0,97) pero presentan un bajo índice de reactividad con el resto de profilinas (Figura I-9).

I- Introducción

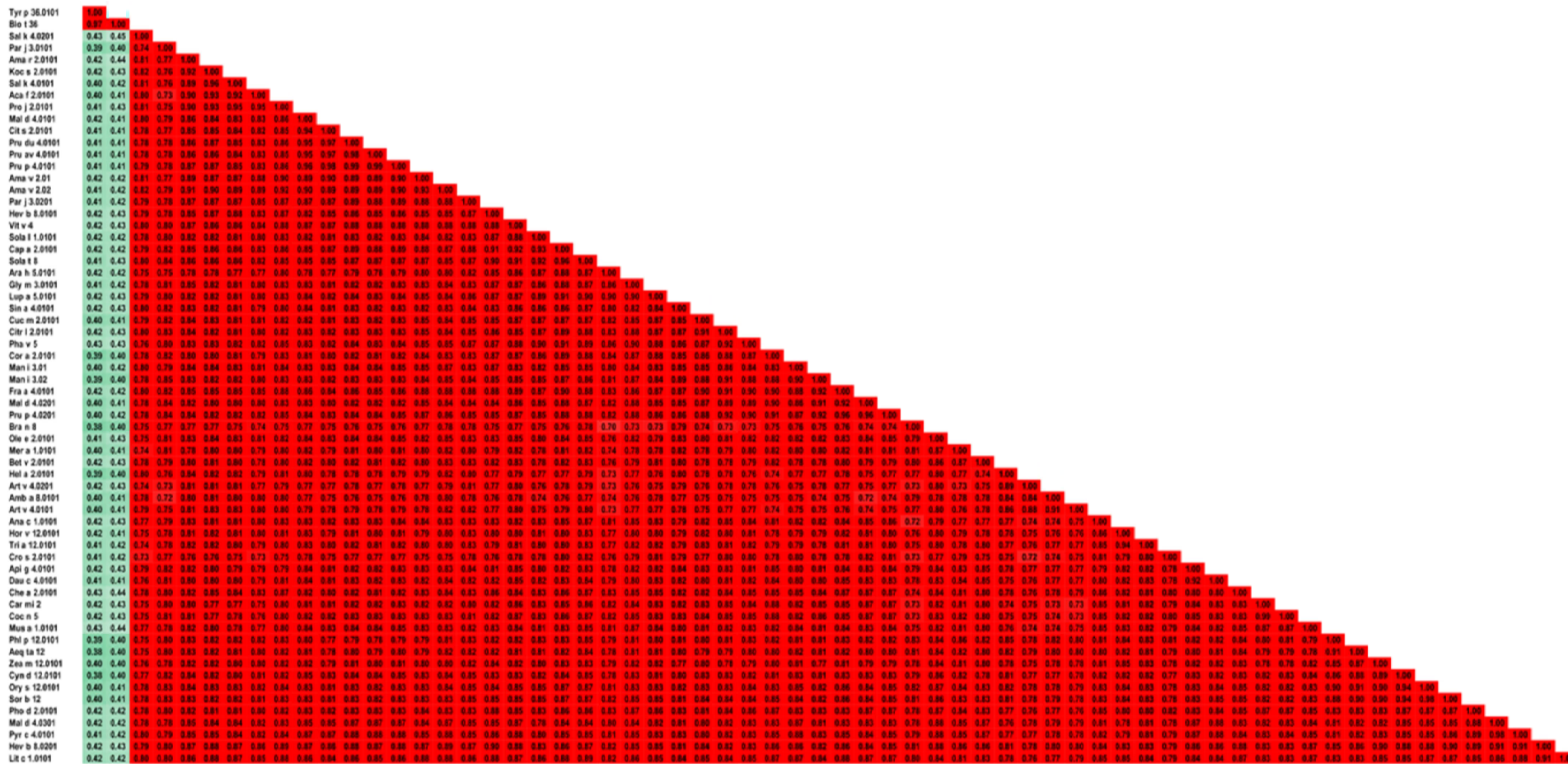


Figura I-9 Valores de índice A-RISC entre las distintas proteínas de la familia de las proteínas. Tomada de Chruszcz y col Plos One 2018(116)

Esta reactividad cruzada es consistente con estudios en los que se han encontrado varios epítomos utilizando distintos abordajes.

En un estudio realizado por Radauer y col.(121), se compararon modelos estructurales de *Phleum*, abedul, artemisia, apio, pimienta, y látex. Predijeron posibles epítomos conformacionales que consistían en secuencias contiguas de al menos 20% de residuos expuestos a la superficie. Se identificaron 11 epítomos potenciales superpuestos de los cuales el epítomo 7 y la parte central del epítomo 1 pueden clasificarse como conservados (Figs. I-10.d, I-10.e y I-10.f), por lo tanto, proponen que la IgE específica para estos epítomos es responsable del alto grado de reactividad cruzada entre las profilinas (Figura I-10.A).

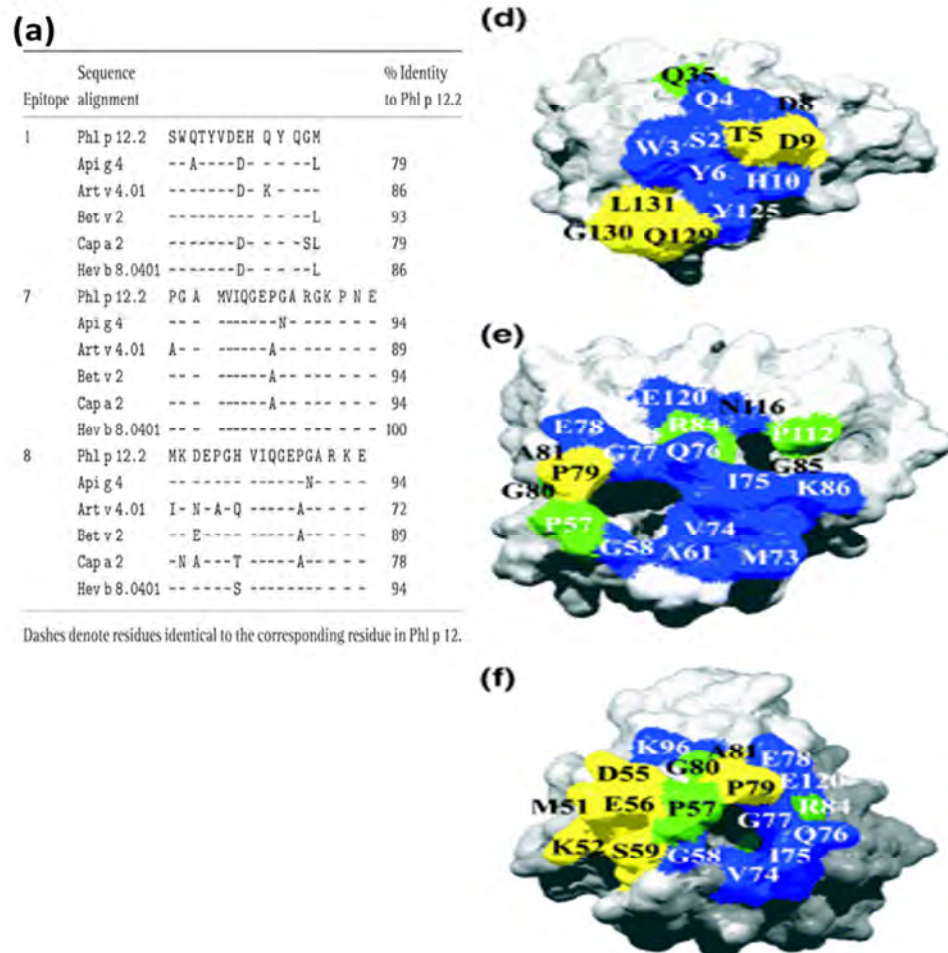


Figura I-10 A) Porcentaje de identidad de secuencia de los epítomos 1, 7 y 8 en comparación con la secuencia de Phl p 12.2. D) E) F) Epítomos conformacionales de profilinas vegetales Epítomo 1 (d), Epítomo 7 (e) y Epítomo 8 (f) predichos para Hev b 8, coloreada por frecuencia de residuos: azul, residuos idénticos en todas las secuencias de profilina analizadas (variabilidad = 1); residuos verdes conservados (variabilidad <3); amarillo, residuos variables (variabilidad > 3). Imagen tomada de Radauer y col. CLin Exp Allergy 2006(121)

En otro estudio más reciente(122), basado en patrones de reconocimiento de epítomos de células T, en pacientes alérgicos a gramíneas en el que estudiaron varias profilinas: Phl p 12, Ole e 2, Bet v 2 and Mal d 4. Encontraron identidad de secuencia completa entre Phl p 12 y Ole e 2 en la región Phl p 12 92-121, y parcial en la región 22-51 en este caso con 5 desajustes ampliamente dispersos entre Phl p 12 y Ole e 2 (Figura I-11). Además encontraron que células T de ratones inmunizados con Phl p 12 y Bet v 2 mostraban que la reactividad cruzada a las profilinas estaba influenciada por determinantes genéticos, muy probablemente el haplotipo MHC II, con lo extrapolan a humanos y sugieren que algunos pacientes podrían estar genéticamente predispuestos a desarrollar respuestas de células T con reactividad cruzada a la profilina, mediante una presentación preferencial de péptidos conservados por sus moléculas de HLA y, por lo tanto, ser más propensos a convertirse en multisensibilizados a diferentes especies de profilinas.

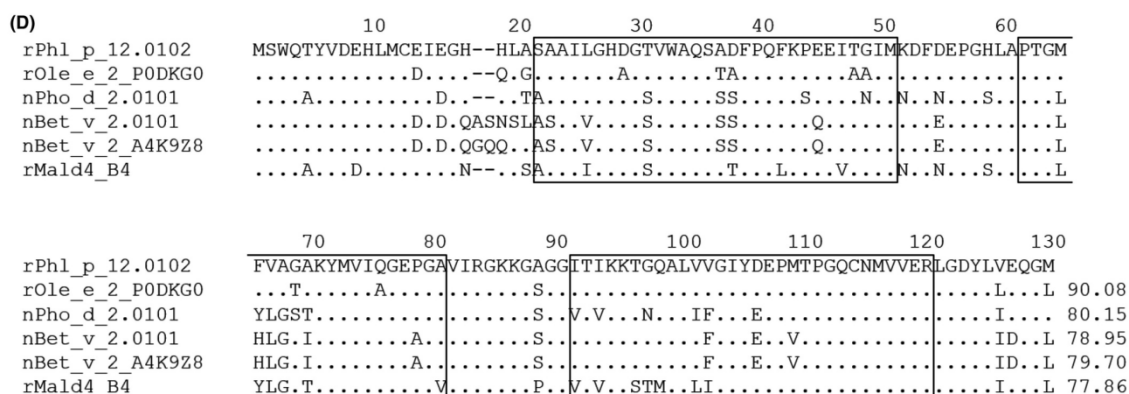


Figura I-11 Alineación de las secuencias de las moléculas de profilina homólogas en Phl p 12, Ole e 2, Bet v 2 and Mal d 4. Las posiciones de secuencia se indican para rPhl p 12.0102. Las 3 regiones identificadas como inmunodominantes están encuadradas

I.6.2 Profilina y alergia al polen

La sensibilización a las profilinas probablemente se induce por la vía inhalatoria a través del polen. Son muchos los pólenes en los que se ha identificado una profilina entre sus proteínas. En la Tabla I-5 están algunas de las más relevantes.

Fuente	Denominación	Alérgeno	Peso Molecular (SDS-PAGE)
Abedul	<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 2	15 kDa
Acacia	<i>Acacia farnesiana</i>	Aca f 2	14.3 kDa
Aligustre	<i>Ligustrum vulgare</i>	Lig v 2	
Ambrosía	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 8	14 kDa
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Ory s 12	14 kDa
Artemisia	<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 4	14 kDa
Avena	<i>Avena sativa</i>	Ave s 12	
Azafrán	<i>Crocus sativus</i>	Cro s 2	14 kDa
Bledo	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Ama r 2	14 kDa
Carrizo	<i>Phragmites australis</i>	Phr a 12	
Centeno	<i>Secale cereale</i>	Sec c 12	
Chenopodium	<i>Chenopodium album</i>	Che a 2	14 kDa
Ciprés	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cup s 8	
Cynodon	<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 12	14.5 kDa
Dactylis	<i>Dactylis glomerata</i>	Dac g 12	
Fresno	<i>Fraxinus excelsior</i>	Fra e 2	
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 2	14.7 kDa
Kochia	<i>Kochia scoparia</i>	Koc s 2	~14.5 kDa
Lolium	<i>Lolium perenne</i>	Lol p 12	
Maíz	<i>Zea mays</i>	Zea m 12	14 kDa
Mercurial	<i>Mercurialis annua</i>	Mer a 1	14.1 kDa; 15.8 kDa
Mezquite	<i>Prosopis juliflora</i>	Pro j 2	14.3 kDa
Olivo	<i>Olea europaea</i>	Ole e 2	15 kDa
Parietaria	<i>Parietaria judaica</i>	Par j 3	
Phleum	<i>Phleum pratense</i>	Phl p 12	14 kDa

Plantago	<i>Plantago lanceolata</i>	Pla l 2	15 kDa
Plátano de sombra	<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 8	
Poa	<i>Poa pratensis</i>	Poa p 12	
Remolacha	<i>Beta vulgaris</i>	Beta v 2	14 kDa
Salsola	<i>Salsola kali</i>	Sal k 4	14.4 kDa
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Tri a 12	

Tabla I-5 Profilinas descritas en pólenes. Información obtenida de www.allergen.org y www.allergome.org

La prevalencia de sensibilización a profilina en los pacientes con alergia al polen puede variar en función de la vegetación de cada región y en función del perfil de pacientes estudiados e incluso del método diagnóstico empleado. En un estudio realizado en Sevilla (España) la prevalencia de sensibilización a profilina entre los alérgicos al polen fue del 23,5% cuando se realizaba por prueba cutánea en *prick* con Pho d 2 y del 17,9% y 15 % cuando se observa la IgE sérica frente a Pho d 2 o Mal d 4 respectivamente en los mismos pacientes.(123). En otro estudio realizado en Madrid la prevalencia de sensibilización fue del 15 %(124). Alcanzándose hasta un 40% de sensibilizados a profilina en un estudio realizado en Toledo (125). En otro estudio realizado en Hungría en 826 pacientes alérgicos al polen en los que se realizó un estudio de con *microarrays*, encontraron una prevalencia de sensibilización a profilina de 12,4%(126). En otras zonas se ha encontrado una prevalencia de sensibilización a profilina más baja como por ejemplo en el realizado en Grecia en el que solo el 11 % de los pacientes presentó una sensibilización a profilina(127).

El polen de gramíneas podría ser la principal vía de sensibilización en el sur de Europa, según estudios realizados en España (106) e Italia(128), y el polen de abedul en el centro y norte de Europa(129).

En el caso de la **profilina de abedul**, Bet v 2 se comporta como un alérgeno menor con una sensibilización a profilina en aproximadamente el 20% de los pacientes alérgicos al polen de abedul en diferentes estudios que han estudiado tanto la IgE sérica como en prueba cutánea(118,130,131). Encontrándose en un estudio un gradiente norte-sur en distintos países de Europa con una sensibilización a profilina de 5–7% de pacientes alérgicos al polen de abedul de la zona de Escandinavia a un 20–38% de sensibilización en países del centro y sur de Europa(132).

La relación de la sensibilización a **profilina** con los pacientes alérgicos al **polen de gramíneas** se observa en un estudio realizado en el sur de España en el que se encontró una prevalencia de sensibilización a profilina del 15 % de los 891 pacientes alérgicos al polen, aunque fue en torno al 10 % en la costa mediterránea y cerca del 50% en la zona más occidental, tal y como se refleja en la Figura I-12 Encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre los alérgicos al polen de gramíneas y los sensibilizados a profilina asociándose con la sensibilización a los principales alérgenos de gramíneas (Phl p 1: OR = 3.16, IC 95%: 1.71–5.83; Phl p 5: OR = 6.19, IC 95%: 3.86–9.91)(106).

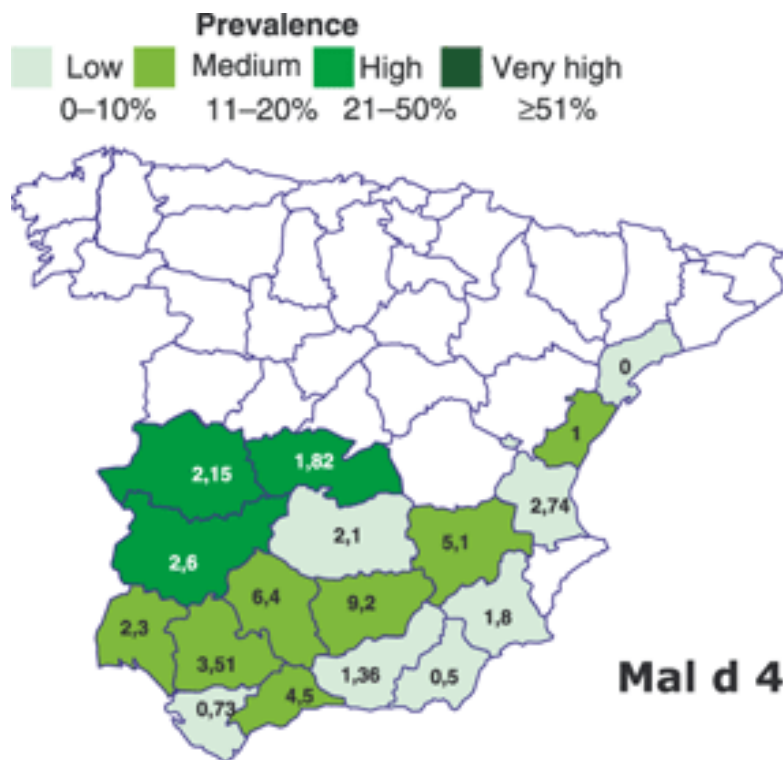


Figura I-12 Prevalencia de sensibilización a profilina (Mal d 4) en la zona sur de España. Tomada de Barber y col. Allergy 2008 (105).

Este estudio fue completado con otro realizado por el mismo grupo de investigación en el norte de España (133) donde encontraron una prevalencia de sensibilización a profilina del 18,8% aumentado el riesgo de sensibilización a profilina en los pacientes alérgicos a gramíneas, asociándose en este caso nuevamente con Phl p 5 con una OR de 5(Figura I-14).



Figura I-13 Prevalencia de sensibilización a profilina (Mal d 4) en la zona norte de España. Tomada de Barber y col. Clin Exp Allergy 2009(133)

Estos datos fueron corroborados por otro estudio realizado en España unos años más tarde, en el que la sensibilización a profilina se asoció de forma estadísticamente significativa con sensibilización a Phl p 5 de forma que pacientes sensibilizados a este alérgeno presentan un riesgo 8 veces mayor de sensibilización a profilina que a otros alérgenos, incluidos algunos de los más frecuentes, como Phl p 1 u Ole e 1(123).

En cualquier caso, la prevalencia de sensibilización a profilina entre los pacientes alérgicos al polen de gramíneas hace que se comporte como un alérgeno menor, ya que se encuentra entre el 8 y el 30 % según los estudio, como por ejemplo en realizado en Alemania en el que la prevalencia de sensibilización a profilina en los alérgicos al polen de gramíneas fue del 8,9 %(134), 14,5 % en un estudio realizado en niños en Italia (135) 18,5% en un estudio realizado en Guadalajara (España) (136) 24,5 en un estudio realizado en Suecia(137) o el 30% en Austria(118).

El **Ole e 2, la profilina del polen del olivo** también se ha considerado un alérgeno menor, según estudios previos en los que se determinó por *immunoblotting* una prevalencia de sensibilización del 24 % en los pacientes alérgicos al polen del

Olivo(138). Aunque algunos autores sugieren que el método de análisis también puede variar los resultados, ya que los epítomos conformacionales se pueden alterar con agentes desnaturalizantes, de forma que cuando se utiliza la técnica de ELISA, la prevalencia de sensibilización al Ole e 2 asciende hasta el 50 %(139). La prevalencia fue aún más alta en un estudio realizado en Jaén, zona donde se alcanzan concentraciones de polen de olivo en primavera, donde de 146 pacientes alérgicos al polen de olivo el 69,9 % (102 pacientes) presentaron IgE específica a profilina Ole e 2. Además se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la sensibilización a Ole e 2 y la presencia de asma en los pacientes con una $p=0.04$ (OR: 2.2, IC: 0.9–5.1)(140).

También se ha descrito la alergenicidad de la profilina de otros pólenes en la mayoría de los casos como **alérgeno menor**, como en el caso del polen del plátano de sombra en el que se observó una prevalencia de sensibilización del 45 %(99), en pacientes alérgicos al polen de artemisia con una prevalencia de sensibilización a profilina del 33%(118) o en alérgicos polen del girasol en los que la prevalencia de sensibilización a profilina Hel a 2 se situó en el 30,5%(141).

Por lo tanto, en la mayoría de los alérgicos al polen, la profilina se comporta como un alérgeno menor, pero hay que tener en cuenta que hay varios estudios en los que la profilina ha sido el alérgeno menor más común en los pacientes con alergia al polen, presentando una sensibilización a profilina por encima del 70% de los pacientes con sensibilizaciones a alérgenos menores, siendo el alérgeno más frecuente de los alérgenos menores (142). El mismo resultado se obtuvo en el estudio realizado en Alemania en el que de los pacientes que se sensibilizaron a alérgenos menores , el 82% se sensibilizó a profilina(143).

Por otra parte, en algunos casos la prevalencia de sensibilización a profilina se sitúa por encima del 50%, comportándose como un **alérgeno mayor**, como es el caso de *Chenopodium album*(144), *Mercurialis annua*(145). *Phoenix dactylifera*(146),y *Crocus sativus*(147) como se detalla a continuación.

Che a 2 también se comportó como alérgeno mayor en dos estudios, de forma que en un estudio realizado en Madrid, esta profilina presentó una prevalencia de sensibilización del el 55% en 104 pacientes con rinoconjuntivitis por alergia a *Chenopodium album*(144). Posteriormente los datos fueron corroborados en otros estudio esta vez realizado en Irán, en 32 pacientes alérgicos al polen de *Chenopodium*,

en el que se encontró una prevalencia del 81 % de sensibilización a Che a 2, siendo en este caso el alérgeno más prevalente por encima del Che a 1 y Che a 3, que presentaron una prevalencia del 72 y 46 % respectivamente(148). En un estudio realizado en España en 195 pacientes alérgicos a *Mercurialis annua*, realizaron el estudio molecular en los pacientes que más IgE específica presentaban (RAST mayor o igual a clase 3) encontrando una prevalencia de sensibilización de 59 y 51 % a dos proteínas con pesos moleculares de 15.8 y 14.1 kD identificadas como profilinas(145). Poco después el mismo grupo caracteriza el alérgeno de profilina Mer a 1(149).

La profilina del polen de palmera, Pho d 2, también se presentó como alérgeno mayor en un estudio realizado en el Arabia Saudí en el que 16 de 24 pacientes (66%) presentaron sensibilización a profilina.(146)

La profilina del polen de azafrán, *Crocus sativus* (Cro s 2) se estudió en personas involucradas en el procesamiento de estambres de flores de azafrán, tanto trabajadores, como personas que vivían en el entorno de las plantaciones en Ciudad Real, de forma que 13 pacientes que presentaban patología nasocular o bronquial en relación con el polen de azafrán, todos presentaban IgE específica a profilina en el *SDS-PAGE Inmunoblott*(147).

La cantidad relativa de proteínas de profilina es diferente en cada uno de los pólenes, de forma que el polen de gramíneas presenta una proporción relativamente alta en comparación con otras especies de polen, aun así la cantidad de profilina en el polen del *Lolium* estaba por debajo del 1% de la cantidad total de proteína (0,92%) y supuso un 6,15% respecto de la cantidad del alérgeno mayor (Tabla I-6)(150).

Extracto de polen	Cantidad de Profilina Pho d 2 (µg)	Cantidad total de Proteína (mg)	Contenido relativo de profilina con respecto a la cantidad total de proteína en cada	Cantidad de Alérgeno Mayor (µg)	Contenido relativo de profilina con respecto a la cantidad alérgeno mayor en cada extracto
-------------------	------------------------------------	---------------------------------	--	---------------------------------	--

			extracto		
<i>Lolium perenne</i>	75 µg	8,17	0.92	1220 µg (Lol p 5)	6,15
<i>Phleum pratense</i>	46,1 µg	6,62	0.70	736 µg (Phl p 5)	6,26
<i>Olea europaea</i>	4,9 µg	4,9	0.10	2473 µg (Ole e 1)	0,2
<i>Betula verrucosa</i>	1,1 µg	2,27	0.05	410 µg (Bet v 1)	0,27
<i>Chenopodium album</i>	2,5 µg	6,64	0.04	No medido	
<i>Salsola kali</i>	4,8 µg	13	0.04	No medido	
<i>Plantago lanceolata</i>	1,8 µg	7,67	0.02	33 µg (Pla l 1)	5,45

Tabla I-6 Determinación de profilina en extractos de polen. Modificada de Ruiz-García y col JACI 2011 (150)

I.6.3 Profilina, alergia a alimentos y alergia al látex

La ubicuidad de la profilina en el reino vegetal, hace que esté presente en muchos alimentos. En la tabla I-7 se recogen algunas de las profilinas de alimentos más importantes.

Fuente	Denominación	Alérgeno	Peso Molecular (SDS-PAGE)
Almendra	<i>Prunus dulcis</i>	Pru du 4	14 kDa

Altramuz	<i>Lupinus albus</i>	Lup a 5	15 kDa
Apio	<i>Apium graveolens</i>	Api g 4	14 kDa
Avellana	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 2	14 kDa
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>	Sola m 1	17 kDa
Brocoli	<i>Brassica oleracea</i>	Bra o 8	
Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 5	15 kDa
Calabacín	<i>Cucurbita pepo</i>	Cuc p 2	
Calabaza	<i>Cucurbita maxima</i>	Cuc ma 2	
Caqui	<i>Diospyros kaki</i>	Dio k 4	
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	Hor v 12	14 kDa
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	All c 4	
Cereza	<i>Prunus avium</i>	Pru av 4	15 kDa
Ciruela	<i>Prunus domestica</i>	Pru d 4	
Coco	<i>Cocos nucifera</i>	Coc n 5	
Espárrago	<i>Asparagaceae</i>	Aspa o 4	
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>	Spi o 2	
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	Fra a 4	13 kDa
Guisantes	<i>Pisum sativum</i>	Pis s 5	
Higo	<i>Ficus carica</i>	Fic c 4	
Kiwi verde	<i>Actinidia deliciosa</i>	Act d 9	14 kDa
Lichi	<i>Litchi chinensis</i>	Lit c 1	15 kDa
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Man i 3	
Manzana	<i>Malus domestica</i>	Mal d 4	N.A.
Melocotón	<i>Prunus persica</i>	Pru p 4	14 kDa
Melón	<i>Cucumis melo</i>	Cuc m 2	14 kDa
Mostaza	<i>Sinapis alba</i>	Sin a 4	13/14 kDa
Mostaza negra	<i>Brassica nigra</i>	Bra ni 8	
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Cit s 2	14 kDa

Nuez	<i>Juglans regia</i>	Jug r 7	13 kDa
Palmera	<i>Phoenix dactylifera</i>	Pho d 2	14 kDa
Patata	<i>Solanum tuberosum</i>	Sola t 8	
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	Cuc s 2	
Pera	<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 4	14 kDa
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i>	Pet c 2	
Pimiento	<i>Capsicum annuum</i>	Cap a 2	14 kDa
Piña	<i>Ananas comosus</i>	Ana c 1	15 kDa
Plátano	<i>Musa acuminata</i>	Mus a 1	15 kDa
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	Citr l 2	14 kDa
Soja	<i>Glycine max</i>	Gly m 3	14 kDa
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sola l 1	14 kDa
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Tri a 12	14 kDa
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	Dau c 4	14 kDa
Uva	<i>Vitis vinifera</i>	Vit v 4	

Tabla I-7 Profilinas descritas en alimentos. Información obtenida de www.allergen.org y www.allergome.org

La profilina en la alergia a alimentos se comporta como un alérgeno mayor en algunos casos como es el caso de Cuc m 2, la profilina de melón, se ha caracterizado como un alérgeno importante que se reconoce en más del 70% de los pacientes(151,152). Del mismo modo, los pacientes con alergia a la naranja se sensibilizan principalmente a Cit s 2, su profilina, de forma que hasta el 87% de los pacientes con alergia a naranja presentaron IgE específica frente a profilina(153,154). También se ha encontrado que otra profilina está asociada con la alergia a la sandía que un estudio realizado en España se observó que el 53% de los pacientes alérgicos a esta fruta reconocía la profilina (155), posteriormente se caracterizó el alérgeno Citr l 2(156).

Según la similitud estructural, la profilina del melón (Cuc m 2) puede tener mayor reactividad cruzada con las profilinas de sandía (Citr l 2), de la fresa (Fra a 4), melocotón (Pru p 4), pimienta (Tapa a 2), altramuz (Lup a 5) y tomate (Sola l)(157).

Recientemente se ha descrito Sola m 1 como alérgeno mayor de la berenjena, de forma que el 100% de los pacientes con alergia a berenjena presentaban IgE específica frente a este alérgeno en un estudio realizado en 36 pacientes alérgicos a berenjena, presentando un más del 80% de homología de secuencia con Bet v 2 así como un alta reactividad cruzada con otros alimentos como arroz, trigo, pimienta, cacahuete y zanahoria(158).

Generalmente la alergia a profilina produce síntomas clínicos como prurito y edema de la mucosa oral en cuestión de minutos tras la ingestión de alimentos que contienen profilina. Los alimentos más frecuentemente implicados son melón, sandía, tomate, plátano, piña y naranja(122). Se ha sugerido que las profilinas provocan solo síntomas, como el síndrome de alergia oral debido al hecho de que la saliva humana no afecta a la profilina pero sí pierde su capacidad de unión a IgE cuando entra en contacto con fluidos gástricos(159).

La relevancia clínica de la profilina en síndrome de alergia oral ha sido demostrada por pruebas de provocación(150,160).

Más recientemente se ha involucrado a la profilina en el término acuñado como síndrome de alergia alimentaria del polen o su acrónimo en inglés PFAS, para denominar a la reacción alérgica producida por frutas y otros alimentos vegetales vinculadas a sensibilización alérgica a alérgenos inhalantes, fundamentalmente del polen. El PFAS a diferencia del síndrome de alergia oral puede producir síntomas fuera de la cavidad bucal, oído y nariz, para afectar a la piel, tracto gastrointestinal y respiratorio e incluso producir anafilaxia(161,162).

La sensibilización a las profilinas de los alimentos se observa casi exclusivamente en pacientes con IgE específica frente a profilinas del polen. La profilina de polen de gramíneas se ha postulado como la principal vía de sensibilización de profilina en la mayoría de los pacientes alérgicos a la profilina con síndrome de alergia oral(106). Sin embargo, otros pólenes, tales como artemisa(106), ambrosía(163) o abedul(164) pueden actuar como pólenes sensibilizantes, dependiendo de las diferencias geográficas en la exposición al polen.

Aunque también se han descrito reacciones alérgicas graves mediadas con profilina, que se han relacionado con zonas en las que los niveles del polen de gramíneas son más elevados como es la zona de Extremadura, en la zona occidental de España. Alvarado y col.(165) realizaron pruebas de provocación oral con profilina purificada, y encontraron que muchos pacientes mostraban reacciones anafilácticas a dosis bajas de profilina. Llegaron a la conclusión de que las profilinas son alérgenos alimentarios completos en poblaciones de pacientes alérgicos a los alimentos expuestos a altos niveles de polen de gramíneas. Por otra parte también se ha comunicado una reacción anafiláctica por alergia al lichi, en el que la proteína responsable era una profilina y observaron que una gran cantidad de profilina podría exceder la capacidad de la digestión de proteínas gástricas y, por lo tanto, conducir a una absorción significativa del nivel de profilina, provocando la anafilaxia(166).

Si bien en un estudio realizado en Italia la sensibilización a la profilina se ha asociado con reacciones alérgicas a alimentos menos graves que las producidas en pacientes sensibilizados a LTP y a proteínas de almacenamiento, de forma que en pacientes con cosensibilización a profilina y LTP presentaron una menor prevalencia de reacciones sistémicas por alergia a alimentos en comparación con pacientes sensibilizados a LTP no co-sensibilizados a profilinas (44.3% vs 59.6%; $P < .0001$). Del mismo modo, pacientes co-sensibilizados a profilina y proteínas de almacenamiento mostraron una prevalencia más baja que los sensibilizados exclusivamente a proteínas de almacenamiento (39.1% vs 51.5%; $P < .0001$) siendo los alimentos principalmente implicados en el caso de las albúminas 2S de cacahuete (Ara h 2 y Ara h 6), nuez de Brasil (Ber e 1) y sésamo (Ses i 1)(128).

Uno de los alérgenos del látex también es una profilina (Hev b 8) con alta reactividad cruzada con otras profilinas del polen, de forma que en torno al 10 % de los pacientes sensibilizados a gramíneas pueden presentar sensibilización a látex, siendo en la mayoría de los casos clínicamente irrelevante, por lo que se puede afirmar que en pacientes con sensibilización al polen de gramíneas, la mono-sensibilización Hev b 8 tiene poca o ninguna relevancia clínica y es causada por la sensibilización cruzada de la profilina de este polen (Phl p 12)(167). En algunos estudios cifran los falsos positivos en la detección de IgE específica a látex por *Immucap* en el 19 % de los pacientes con alergia a pólenes, siendo la profilina y la bromelina los contribuyentes a esta sensibilización clínicamente irrelevante(168).

I.6.4 Relevancia de la profilina

Aunque la **polisensibilización** a pólenes se ha asociado con sensibilización a profilina, una forma precisa de detectar la sensibilización a la profilina sería la realización de la prueba cutánea con extracto de profilina purificado. Ya que incluso extractos de pólenes o alimentos que tienen identificados profilina entre sus proteínas, finalmente, no contienen profilina en los extractos comerciales para pruebas cutáneas. Esto se objetivó en un estudio en el que se analizó la presencia de profilina en distintos extractos comerciales se observó que existía profilina en los extractos, de *Phleum*, *Parietaria* y avellana. También se detectó, pero en menor cantidad en el extracto de *Olea*. En cambio no se detectó profilina en ningún extracto de melocotón, aunque la profilina Pru p 4 es una proteína descrita de melocotón, no se detectó ni en el extracto completo ni con el extracto de la pulpa ni con el de la piel, incluso con varios proveedores(169).

En otro estudio se observó que pacientes sensibilizados a profilina presentan un mayor número de pruebas cutáneas positivas a pólenes, presentando, por tanto, mayor polisensibilización, aunque en muchos casos esta sensibilización no se correspondía con sensibilización a los alérgenos principales de estos pólenes por lo que la sensibilización a profilina fue considerada con un factor de confusión en este estudio(123). Esto hace que la profilina pueda actuar como un **factor de confusión**, de forma que la correlación entre las pruebas cutáneas en *prick* con pólenes y el diagnóstico por componentes a alérgenos mayores de esos pólenes fue mayor en pacientes que no estaban sensibilizados a profilina(170).

Lund y col(122). plantean la posibilidad de que la cantidad y la velocidad de liberación de alérgenos de los pólenes pueden influir en la alergenicidad, por lo que realizaron un estudio en el que medían las cantidades liberadas de Phl p 1, Phl p 5 y Phl p 12 del polen a lo largo del tiempo, observando que las cantidades molares y la cinética de liberación de Phl p 1 y Phl p 12 fueron comparables entre ellas, aunque claramente inferiores a Phl p 5 (Figura I-14), por lo que concluyen que debido a la diferencia de prevalencia de sensibilización entre Phl p 1(alérgeno mayor) y Phl p 12 (alérgeno menor) la cantidad y la liberación temporal de proteínas de los pólenes no predicen completamente la alergenicidad de las proteínas del polen de gramíneas(122).

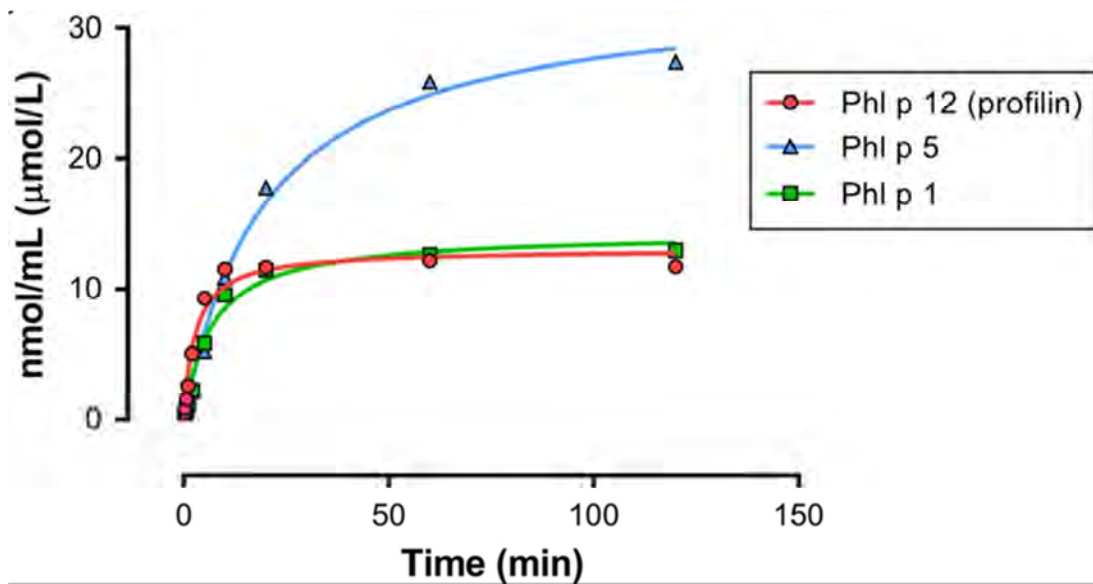


Figura I-14 Cinética de liberación de Phl p 1, Phl p 5 y Phl p 12 del polen del Phleum. Tomado de Lund y col.(122).

Ruiz-García y col. (150) estudiaron la capacidad de polen de profilina para inducir una respuesta a nivel nasal y bronquial, de forma que realizaron una provocación con extracto de Pho d 2 (máximo Pho d 2, 100 $\mu\text{g/ml}$), utilizando una máscara facial en 23 pacientes sensibilizados a profilina y en 5 controles. Diecisiete pacientes (77%) tuvieron resultados positivos en la **prueba de provocación bronquial específica con Pho d 2**, el valor medio de PC20 fue $4,52 \pm 2,46 \mu\text{g / ml}$. Ocho de estos 17 pacientes también tuvieron un resultado positivo en la provocación nasal, siendo la disminución media de área transversal mínima en la rinomanometría de $41,8\% \pm 10,1\%$. Dos pacientes (9%) tuvieron resultados positivos de solamente en la provocación nasal.

En otro estudio Núñez y col. (160) realizaron **pruebas de provocación conjuntival con profilina de palmera (nPho d 2)** en 17 pacientes sensibilizados a profilina y en 14 pacientes alérgicos al polen no sensibilizados, de forma que la prueba de provocación conjuntival fue positiva en el 65 % de los sensibilizados a profilina y en ninguno de los no sensibilizados, encontrando significación estadística ($\chi^2 = 10.39$, $p < 0.005$).

Por otro lado, hay estudios que atribuyen a la profilina un papel menos relevante, de forma que un estudio trasversal realizado en Italia la sensibilización

profilina se asoció a menor presencia de asma en pacientes sensibilizados a parietaria y a gramíneas(128). Hay autores que sugieren que la sensibilización exclusiva profilina no tiene **relevancia clínica** en la rinoconjuntivitis alérgica de los pacientes con alergia al polen y que la sintomatología clínica es desencadenada casi exclusivamente por alérgenos mayores(142).

De esta forma, la relevancia de esta sensibilización ha sido cuestionada, atribuyendo a la profilina un factor de confusión en la alergia al polen, de forma que podría tratarse de un co-reconocimiento, o reactividad cruzada(129,131,171).

Pero son varios los autores que recientemente están cuestionando la falta de relevancia de la profilina atribuida hasta el momento(172,173). En este sentido, estudios recientes han mostrado que una sensibilización temprana a profilina podría ser un marcador precoz de predisposición a enfermedad alérgica más severa(174). La presencia de IgE específica a profilina se ha asociado a mayor riesgo de sensibilización a múltiples pólenes y presencia de alergia alimentaria(116). Además pacientes sensibilizados a profilina mostraron mayor riesgo de reacciones alérgicas a inmunoterapia específica, sobre todo urticaria tardías(175). También se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la sensibilización a profilina Ole e 2 y la presencia de asma en los pacientes con una $p=0.04$ (OR: 2.2, IC: 0.9–5.1)(140).

Por todo lo expuesto anteriormente es necesario un estudio para evaluar la relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y asma alérgica de nuestro medio.

II. JUSTIFICACIÓN.

Para realizar un abordaje integral de la relevancia de la profilina es necesario un estudio en cuatro dimensiones: *in vitro*, *in vivo*, aerobiológica, y clínica.

En primer lugar es necesario corroborar que la profilina se comporta como un aeroalérgeno, es decir, si puede ser reconocida por el sistema inmune de pacientes alérgicos al polen y presentan anticuerpos IgE específicos frente a la profilina. Para lo que será necesario el **estudio *in vitro***, con determinación de IgE específica frente a distintas profilinas.

Pero, la presencia de IgE específica frente a una fuente alérgica no siempre es clínicamente relevante, de hecho la concentración de IgE específica de alérgeno no está estrechamente relacionada con la respuesta clínica tal y como se observó en un estudio realizado con pruebas de provocación nasal y conjuntival con polen de gramíneas en el que no se pudo establecer una relación dosis-respuesta(176). De esta forma, tal y como sugieren algunos autores, las determinaciones serológicas no son diagnósticas de alérgica, los anticuerpos IgE son necesarios, pero no suficientes para la manifestación de síntomas alérgicos, ya que pueden existir múltiples variables asociadas con el medio ambiente (p. heterogeneidad de alérgenos y niveles de exposición) con el paciente (heterogeneidad de respuesta inmune) que puedan influir en la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos en un paciente alérgico, por lo que la determinación de IgE específica en sangre, por sí sola no es suficiente para predecir enfermedad alérgica sintomática(177). Por lo que son necesarios estudios *in vivo*.

De esta forma los **estudios *in vivo*** son necesarios para conocer si ese aeroalérgeno es capaz de producir una respuesta clínica en pacientes sensibilizados. Para ello se realizarán tanto pruebas cutáneas como provocaciones conjuntivales y bronquiales con profilina.

Aunque de poco sirve conocer la alergenidad de una proteína si no se demuestra que el paciente puede estar expuesto a ella, por lo que el siguiente paso sería en **estudio aerobiológico**, con el que estudia si en el ambiente hay profilina procedente de los pólenes. Los alérgenos de los pólenes se pueden detectar en la atmosfera independientemente de los pólenes, aunque su procedencia principal son estos, también pueden desprenderse de fragmentos de plantas, orbículas o anteras(82). De esta forma el contenido antigénico de estos alérgenos en la atmosfera pueden variar mucho y estar influenciadas por las condiciones climáticas, por lo que es

importante detectar y cuantificación de aeroalérgenos para poder estudiar su capacidad de causar polinosis(178).

Por último, para correlacionar todo lo anterior son los **estudios clínicos**, para conocer si en la vida real los pacientes sensibilizados a profilina presentan peculiaridades clínicas en relación con su exposición en el ambiente, para lo que se realizará un seguimiento de los síntomas de estos pacientes a lo largo de un año, cerrando así el círculo de la relevancia de la profilina.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.2 Hipótesis de trabajo

- Existe una cantidad importante de profilina procedente del polen en el aire de nuestro entorno.
- La profilina es una proteína capaz de producir una respuesta respiratoria específica en pacientes sensibilizados a la misma.
- La profilina del ambiente tiene una repercusión en los síntomas que desarrolla el paciente en su hábitat natural.

III.3 Objetivos principales del estudio.

1. Conocer cuál es la cantidad de aeroalérgeno de profilina en las distintas estaciones del año en el aire de nuestro entorno.
2. Conocer la capacidad de la profilina para producir una respuesta alérgica específica a nivel bronquial y conjuntival.
3. Estudiar la intensidad de los síntomas respiratorios y gravedad clínica de los pacientes sensibilizados a profilina.

III.4 Objetivos secundarios del estudio.

1. Estudiar los perfiles de sensibilización a pólenes de los pacientes sensibilizados a profilina en nuestra área.
2. Estudiar los perfiles de sensibilización a frutas de los pacientes sensibilizados a profilina en nuestra área.
3. Establecer la correlación diagnóstica de las pruebas cutáneas con profilina y la determinación de IgE específica serológica a profilina.
4. Realizar un estudio de la aerobiología de nuestra área.
5. Correlacionar la cantidad de profilina en ambiente con los pólenes presentes en el mismo.
6. Estudiar la correlación entre el nivel de sensibilización a profilina y la repercusión clínica.
7. Determinar la correlación entre la cantidad de aeroalérgeno de profilina en ambiente y los síntomas de los pacientes sensibilizados a la misma.
8. Estudiar la influencia de los parámetros meteorológicos y contaminantes atmosféricos en la exposición ambiental de profilina

IV. METODOLOGÍA. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2 Diseño del estudio.

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles, prospectivo, abierto, en el que se realizaron varias intervenciones diagnósticas y seguimiento de pacientes que abarcaron cuatro dimensiones: estudios *in vitro*, *in vivo*, estudios aerobiológicos y clínicos:

El período de reclutamiento se llevó a cabo durante los primeros seis meses del estudio. El día de la inclusión en el estudio, se les realizaron a los pacientes la extracción sanguínea y las pruebas cutáneas. En las semanas posteriores se le realizaron las pruebas de provocación conjuntival y las pruebas de provocación bronquiales a un subgrupo de pacientes, siempre fuera del periodo en el que se realizó el seguimiento clínico, para que las pruebas diagnósticas no interfirieran con los resultados obtenidos en el diario de síntomas.

El periodo de seguimiento clínico y aerobiológico fue de un año. Durante este tiempo los pacientes hicieron un registro diario de síntomas y consumo de medicación (seguimiento clínico). De forma simultánea, se midieron los niveles de profilina y la cuantificación de pólenes en el ambiente (seguimiento aerobiológico). Durante todo este periodo cada paciente siguió el tratamiento recomendado por su alergólogo, conforme a las guías clínicas existentes y al criterio médico.

En los tres meses siguientes a la finalización del periodo de seguimiento clínico y aerobiológico se realizaron las pruebas diagnósticas que no se pudieron realizar con anterioridad, siempre fuera del periodo de seguimiento para que no interfirieran con los síntomas de los pacientes

Cronograma del estudio.

En la Figura IV-1 recoge el cronograma del estudio.

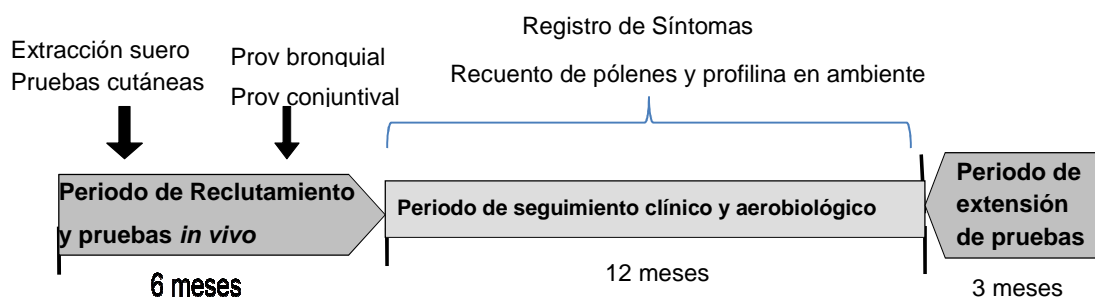


Figura IV-1 Cronograma del estudio

- Periodo de reclutamiento y pruebas *in vivo*: 6 meses
- Periodo de seguimiento clínico y aerobiológico: 12 meses.
- Periodo de extensión de pruebas: 3 meses:
- Duración prevista del estudio: 21 meses desde el inicio del estudio

Intervenciones diagnósticas.

- Se extrajo una muestra de sangre para estudio inmunológico *In vitro*.
- Los pacientes cumplimentaron un diario de síntomas y consumo de medicación
- Se realizó una prueba de provocación conjuntival con extracto de profilina en un subgrupo de pacientes
- Se realizó una prueba de provocación bronquial con extracto de profilina con un subgrupo de pacientes.

Extracto de Estudio:

El extracto utilizado para el estudio fue la profilina de *Phoenix dactylifera* (Pho d 2, 50 µg/mL) altamente purificada preparada por Laboratorios LETI Pharma S.L.U. como se explicará a continuación.

En la Figura IV-2 se puede ver de forma gráfica el resumen de la metodología del estudio.

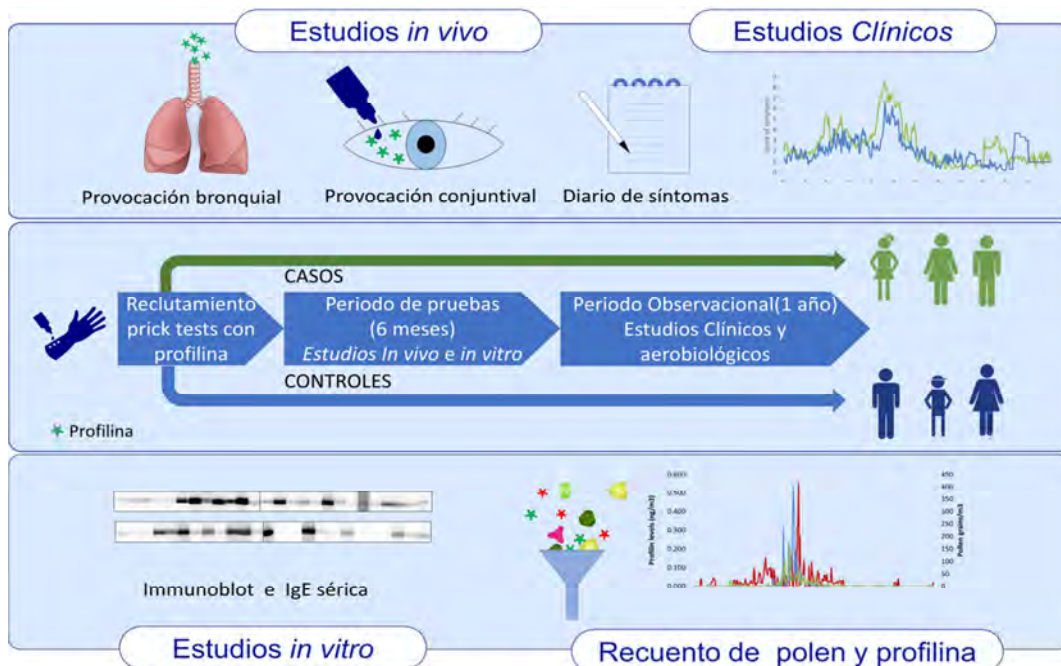


Figura IV-2 Resumen gráfico de la metodología del estudio

IV.3 Población del estudio.

El estudio se llevó a cabo con pacientes que acudieron a consulta de Alergología del Hospital Universitario Infanta Elena por primera vez con patología respiratoria, rinitis, rinoconjuntivitis y/o asma, con una edad comprendida entre 14 y 49 años.

IV.3.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes que acudieron a consulta de Alergología del Hospital Universitario Infanta Elena por primera vez con patología respiratoria.
- Con edades comprendidas entre 14 y 49 años.
- Que hubieran sido diagnosticados de rinitis y/o conjuntivitis y/o asma alérgica por sensibilización a pólenes.
- Que se hubiera objetivado sensibilización alérgica IgE mediada a algún polen, bien mediante prueba cutánea o detección de IgE sérica específica.
- Que nunca hubieran recibido Inmunoterapia.
- Que firmaran el consentimiento informado.

IV.3.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes que acudieron por primera vez a consulta de Alergia por un motivo diferente a los especificados previamente.
- Pacientes menores de 14 años o mayores de 49
- Pacientes con asma bronquial severa, dermatitis atópica severa, urticaria crónica, dermografismo cutáneo severo o cualquier otra patología respiratoria severa que limitara la realización de pruebas diagnósticas y evaluación de los resultados de las mismas.
- Mujeres gestantes
- Pacientes en tratamiento con betabloqueantes.
- Pacientes que no eran capaces de otorgar su consentimiento
- Pacientes que no firmaran el consentimiento informado

IV.3.3 Definición de grupos de estudio.

Definición de caso:

- Pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y que presentaron una prueba cutánea en *prick* positiva a profilina. Se consideró positiva un diámetro de la pápula >3 mm de diámetro o un área de la pápula superior a 7 mm².

Definición de control:

- Pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y que tuvieron prueba cutánea en *prick* negativa a profilina

Los pacientes elegibles otorgaron su consentimiento informado para participar en el estudio, previa a la realización de cualquier procedimiento específico del mismo.

Tamaño muestral:

El cálculo del tamaño muestral del estudio, se estableció con el objetivo de buscar diferencias estadísticamente significativas (ES) entre las intensidades medias de los síntomas respiratorios, para pacientes sensibilizados y pacientes no sensibilizados a la profilina, que es uno de los objetivos principales del estudio. Por lo que para conseguir una potencia superior al 80% para detectar una diferencia de 0.25 puntos, asumiendo una desviación típica de 0.35 puntos era necesario reclutar un mínimo de 50 casos y 30 controles.

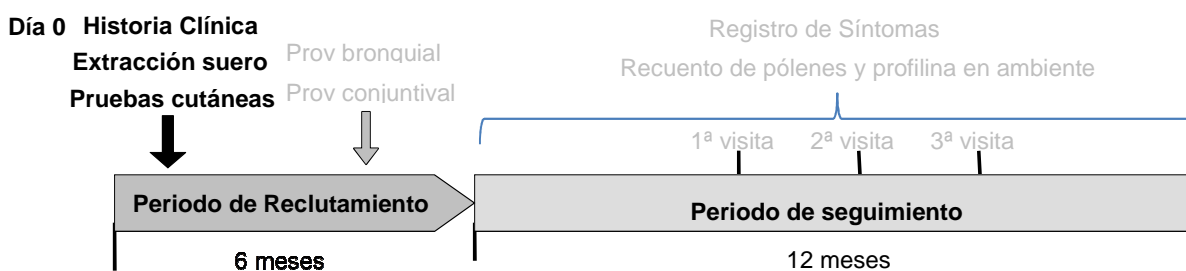
Día de inclusión en el estudio (día 0)

Figura IV-3 Cronograma: Día de inclusión en el estudio

Una vez que se comprobó que cumplían los criterios de inclusión y que no había ningún criterio de exclusión se recogieron los datos de la historia clínica realizada en

consulta, según cuaderno de recogida de datos (Anexo I) se realiza la extracción de suero y las pruebas cutáneas (Figura IV-3).

IV.4 Estudio *in vitro*:

Se realizó extracción sanguínea de aproximadamente 10 ml de suero para estudio inmunológico *in vitro*.

Los estudios *in vitro* consistieron en la determinación de la IgE específica a profilina presente en los sueros de los pacientes.

Para ello se utilizaron las dos profilinas disponibles en *InmunoCAP®* (*Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Swedwen*) que son la profilina recombinante de polen de *Phleum* (rPhl p 12) y de polen de abedul (rBet v 2).

Se incluyó en el estudio la profilina nativa purificada Pho d 2. Dado que no se dispone de *InmunoCAP®* comercial de Pho d 2, la profilina purificada se marcó con biotina y se utilizó en CAP de estreptavidina. El marcaje con biotina se realizó con *Biotin Protein Labeling Kit®* (Roche Diagnostics), con modificaciones a las instrucciones del fabricante al tratarse de una proteína purificada. Se marcaron en total 1,2 mg de profilina. Se dividieron en 4 alícuotas de 0,3 mg de profilina cada una. A cada una de estas alícuotas se les añadieron 8,5 µl de biotina. La cantidad de biotina que añadir se calculó según el peso molecular de la profilina (14 kDa) y la relación biotina/proteína de 1:5. Se completó el volumen con PBS 0.01M hasta 1 ml. La mezcla se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se pasó por la columna de *Sephadex G-25®*, que forma parte del *kit*, para eliminar la biotina que no se haya unido a la proteína. La proteína marcada se recogió en alícuotas de 10 gotas cada una, pasando PBS 0,01M por la columna. La presencia de proteína en cada una de las alícuotas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm con un equipo *Nanodrop 2000®* (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*). Las fracciones que contuvieron una mayor cantidad de proteína se juntaron, el resto se desecharon.

Para el ensayo de *InmunoCAP®*, 50 µl de la proteína marcada se añadieron a inmunocaps de estreptavidina, según las instrucciones del fabricante, una vez unidas las proteínas al CAP, se siguió el procedimiento normal de *InmunoCAP®*, con resultados en rango de 0,1 a 100 kUA/l, considerándose positivo a partir de 0,35 kUA/l. Cada uno de los sueros se analizaron frente a los rPhl p 12 y rBet v 2 por *InmunoCAP®* y frente a Pho d 2 marcada con biotina.

También se realizaron ensayos de *immunoblot* con los sueros de los pacientes individuales y con profilina purificada (Pho d 2) en fase sólida(179).

En primer lugar la profilina se sometió a una electroforesis (*SDS-PAGE*) mediante el sistema *MiniProtean*[®] (*Bio-Rad*). El gel separador se preparó mezclando 2ml de Tris 1,5 M pH 8,88, 4ml de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 80µl de SDS al 10%, 1,88ml de agua destilada, 40µl de persulfato amónico al 10% y 4µl de Temed, todos los reactivos utilizados fueron de Bio-Rad. Una vez polimerizado este gel se preparó el gel concentrador, mezclando 1,525 ml de agua destilada, 0,625 ml de Tris 0,5M pH 6,8, 25µl de SDS al 10%, 0,333ml de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 12,5µl de persulfato amónico al 10% y 2,5µl de Temed.

Se cargaron 3 µg de profilina por carril (30 µg en total en peine continuo). Estas muestras se mezclaron con el tampón de carga que contiene: agua destilada 50%; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 12,5%; Glicerol 10%; SDS 2%; 2-β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,05%. Las muestras junto con el tampón de carga se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Posteriormente se cargaron en el gel y se sometieron a una electroforesis a 180 V hasta que el marcador de azul de bromofenol alcanzó el final del gel. Como tampón para la electroforesis se utilizó 10x Tris/Glycine/SDS (*Bio-Rad*).

Después de realizar la electroforesis de tipo SDS-PAGE, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) (*Bio-Rad*[®]) con un equipo *Trans-Blot turbo* (*Bio-Rad*[®]). Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. La membrana se incubó durante toda la noche con cada uno de los sueros individuales diluidos 1:1 (vol/vol) en 0,01 M PBS-0,1% Tween. Tras lavar la membrana con 0,01 M PBS-0,1% Tween, se incubó durante 2 horas con el anticuerpo monoclonal anti-human IgE-peroxidasa (*Southern Biotech, Birmingham, AL, USA*) a una dilución 1:20.000 en 0,01 M PBS). Finalmente se desarrolló con el reactivo *Immunostar* (*Bio-Rad*) que consiste en mezclar 10 ml de reactivo *Immuno-Star* con 0,5 ml de reactivo potenciador y añadirlo a la membrana durante 5 minutos. La reacción se registró mediante quimioluminiscencia con un equipo *Chemidoc* (*Bio-Rad*).

IV.5 Estudios *in vivo*

Para detectar si la sensibilización a profilina es clínicamente significativa, consideramos oportuno la realización de pruebas *in vivo*, ya que los estudios *in vitro* nos ayudan a definir cuál es el alérgeno causante de la sensibilización(180), pero para

saber si este alérgeno puede ser capaz de producir síntomas es necesario realizar una historia clínica detallada y, en el caso de la alergia respiratoria a pruebas *in vivo* para garantizar el diagnóstico correcto. Consideramos que en este caso el riesgo para los pacientes era controlado si se seguían los protocolos adecuados y se realizaba por personal capacitado y en las condiciones de seguridad adecuadas(181,182). Por ello, se realizaron, en un subgrupo de pacientes, pruebas de provocación conjuntival y pruebas de provocación bronquial. Ambas, se realizaron en el periodo de inclusión, en el plazo de uno a dos meses desde la inclusión del paciente en el estudio. En algunos casos, por motivo de agenda o de disponibilidad de los pacientes no se pudieron realizar las pruebas de provocación antes del inicio del periodo de seguimiento, en estos casos se realizaron una vez finalizado el mismo, siempre fuera del periodo de seguimiento para que no interfiera con el registro de síntomas (Figura IV-4). El subgrupo al que se le realizaron las pruebas de provocación bronquial y conjuntival se constituyó con los primeros pacientes que dieron su consentimiento para realizar las mismas y fue factible la realización de la prueba en los periodos previstos.

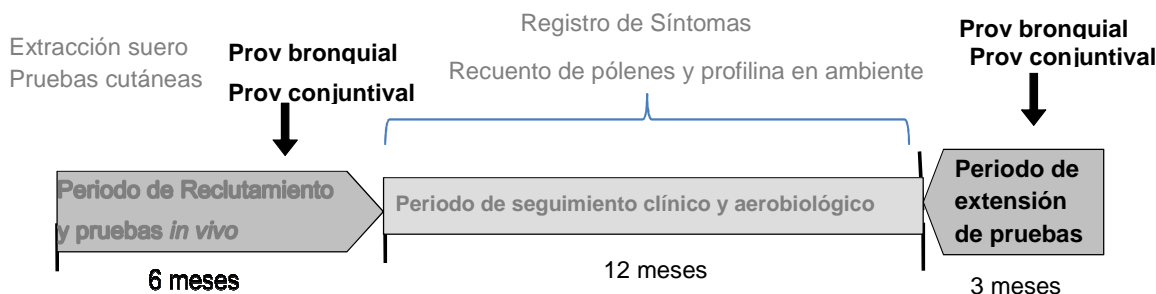


Figura IV-4 Cronograma: estudios in vivo

IV.5.1 Purificación de la profilina de polen de palmera

En primer lugar se realizó la preparación del extracto para realizar las pruebas *in vivo*.

Se utilizó un extracto de profilina de polen de palmera (Pho d 2) que fue purificado tal y como se realizó previamente con profilina de plantago(179).

A partir del liofilizado de polen de palmera se llevó a cabo una cromatografía de afinidad con columnas de poly-L-prolina acoplada en una resina de *Sepharosa CNBr-*

activated. La elución de la proteína se alcanzó mediante un gradiente escalonado de tampón suplementado con urea (Figura IV-5).

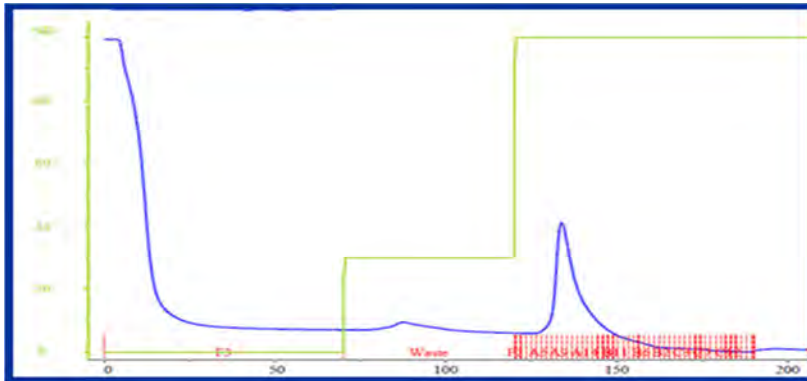


Figura IV-5 Urea 6 M gradiente de elución de profilina Pho d2

Tras comprobar la presencia de la proteína mediante SDS, fue necesario reanaturalizarla mediante la eliminación sucesiva de la urea, así como estabilizarla con glicerol (Figura IV-6).



Figura IV-6 Proceso de purificación de Proteína de palmera Pho d2

Una vez obtenido el extracto, para comprobar el grado de purificación se realizaron dos técnicas: en primer lugar se realizó un SDS y posteriormente un *Immunoblot* con el suero policlonal de conejo anti-Betula alba, en ambos casos aparece

una única banda y que, por lo tanto, se puede deducir que el grado de purificación es muy alto (Figura IV-7).

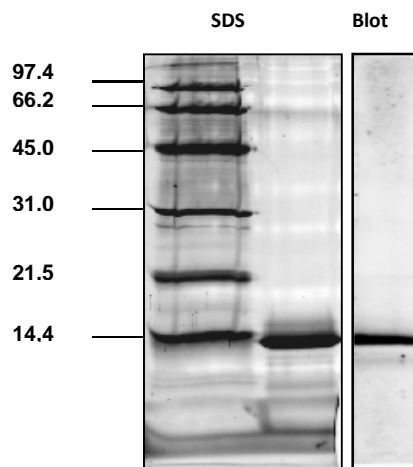


Figura IV-7 SDS e Inmunoblot frente a profilina de palmera Pho d2

Por otro lado se realizó un ensayo de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Con esta técnica se digiere la proteína con tripsina y los péptidos que salen se identifican mediante espectrometría masas y así es posible establecer una correlación con la proteína a la que pertenecen tras una búsqueda de la secuencia en las bases de datos. En este caso, los péptidos que se identificaron fueron los que están en rojo en la figura y cubren el 50% de la secuencia (Figura IV-8). Según estos resultados, no encontramos ningún péptido que no sea de profilina, por lo que podemos decir que está pura.

```

1 MSWQAYVDEH LMCEIDGHHL TAAAILGHDG SVWAQSSSFP QFKSEEITNI
51 MNDFNEPGL APTGLYLGST KYMVIQGEFG AVIRGKKKSG GVTVKKTNQA
101 LIFGIYEEPM TPGQCNMVVE RLG DY LIEQG M

```

Figura IV-8 Espectrometría de Masas con extracto de profilina de palmera Pho d2

Con estas dos técnicas, podemos decir que el grado de purificación de esta proteína está por encima del 95 %.

IV.5.2 Pruebas cutáneas.

Se recogió el tamaño de la pápula de las pruebas cutáneas en *prick* realizadas de rutina en el servicio de Alergología del Hospital Universitario Infanta Elena a los pacientes con patología respiratoria. Las pruebas cutáneas que se realizaron, son modificadas a partir de la batería recomendada por la Guía Española de Manejo de Asma(30) y el grupo de trabajo de la EACI (183): Pólenes de árboles (*Olea europea* y *Platanus acerifolia*), pólenes de gramíneas (gramíneas mezcla, *Phleum pratense* y *Cynodon dactylon*), pólenes de malezas (*Salsola kali*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*), ácaros del polvo (*Dermatofagoides pteronyssinus*, *Dermatofagoides farinae*, *Lepidoglyphus destructor*) hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*) y epitelios (gato y perro) y de los panalérgeno (LTP, profilina y polcalcina). Los extractos utilizados fueron los fabricados por laboratorios LETI, pólenes, hongos y epitelios de animales a 30 HEP/ml y ácaros a 100 HEP/ml.

También se recogió el resultado de las pruebas cutáneas realizadas con frutas, utilizando extractos de laboratorios LETI: melocotón (piel 400 µg proteína/ml y pulpa 200µg proteína/ml) manzana (150 µg proteína/ml), ciruela (200 µg proteína/ml), naranja (15 µg proteína/ml), melón (275 µg proteína/ml), kiwi (350 µg proteína/ml), plátano (500 µg proteína/ml), aguacate (430 µg proteína/ml), e higo (120 µg proteína/ml). También se recogió el resultado de la prueba cutánea con extracto de látex (90 µg proteína/ml; Laboratorios LETI).

El método y valoración del tamaño de la pápula se efectuó mediante la técnica de papulometría computarizada (*PC Draft software®; Microspot, Maidstone, UK*), los resultados serán expresados en mm². Se consideró prueba positiva cuando tenían un área superior a 7 mm².

IV.5.3 Prueba de provocación conjuntival.

Se realizaron las pruebas de provocación conjuntival con profilina de palmera Pho d 2 purificada en un subgrupo de pacientes, entre aquellos que tenían diagnóstico de rinoconjuntivitis por alergia al polen y dieron su consentimiento para la misma.

Las provocaciones conjuntivales se realizaron según técnica habitual(184); se realizaron 5 concentraciones de forma creciente desde 0,003 µg/mL a 3 µg/mL

disueltos en solución salina (0,85% NaCl, tampón fosfato 7 mM), (Figura IV-9) en el fondo de saco conjuntival de un ojo y diluyente en el ojo contralateral. De forma que, se inició con la concentración menor del extracto y se continuo en intervalos de 15 minutos con las siguientes concentraciones. La prueba se detuvo cuando se obtuvo una respuesta positiva o finalizó cuando se administró la concentración mayor del alérgeno.

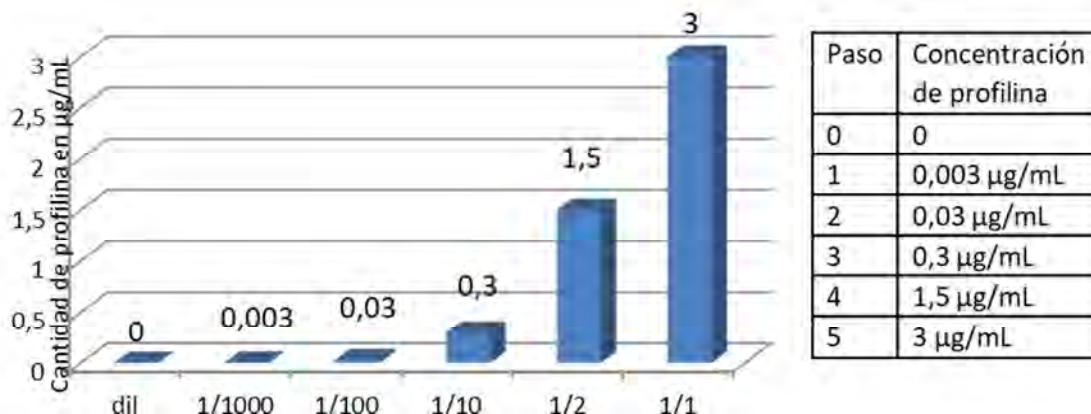


Figura IV-9 Concentraciones de profilina de las prueba de provocación conjuntival.

Todas las pruebas fueron realizadas por una misma enfermera con experiencia en el servicio de Alergología y en la realización de esta técnica, para que hubiera la mínima variación posible en el procedimiento, siempre supervisada por un médico especialista en Alergología.

La evaluación de los resultados se llevó a cabo según las recomendaciones para pruebas de provocación conjuntival del grupo de alergia ocular de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica(181). De forma que se evaluaron el picor en una escala de 1 a 4, enrojecimiento conjuntival en una escala de 1 a 3, lagrimeo en una escala de 1 a 3 y quemosis en una escala de 1 a 3. Se consideró una respuesta positiva cuando se obtuvo una puntuación total mayor o igual a 5 puntos.

IV.5.4 Prueba de provocación bronquial específica

La prueba de provocación bronquial específica (PPBE) es una técnica semicuantitativa que consiste en la inhalación de concentraciones crecientes de un antígeno en aerosol, controlando la función pulmonar.

La PPBE permite evaluar la respuesta al alérgeno en el órgano diana y así hacer un diagnóstico etiológico, estableciendo una relación causa efecto entre el alérgeno y la clínica respiratoria del paciente, aportando una curva dosis respuesta entre la dosis suministrada del alérgeno y la respuesta bronquial(185,186)

Se realizó la PPBE con profilina de palmera Pho d 2 purificada en un subgrupo de pacientes que presentaban diagnóstico de asma bronquial y que dieron su consentimiento para ello.

Se siguió un procedimiento normalizado, de forma que se vigiló que los pacientes no presentaran las contraindicaciones dadas en el manual de procedimientos SEPAR(182). De forma que las contraindicaciones absolutas de la prueba de provocación bronquial con alérgenos son:

- Embarazo.
- Descenso del FEV1 ≥ 10 % del valor basal con la inhalación del diluyente.
- Asma exacerbada.
- FEV1 basal ≤ 70 % del teórico o ≤ 1500 ml.
- Infecciones respiratorias intercurrentes.
- Cardiopatía isquémica u otras enfermedades sistémicas graves.

Se indicó a los pacientes que abandonaran la medicación que pudiera interferir con el resultado antes de realizar la prueba según las recomendaciones SEPAR(182)

- Agonistas β_2 de acción corta se suspendieron al menos con 8 horas de anterioridad
- Agonistas β_2 de acción prolongada, se suspendieron al menos con 12 horas de anterioridad.
- Anticolinérgicos de corta duración se suspendieron al menos con 6 horas de anterioridad.
- Anticolinérgicos de larga duración, se suspendieron al menos con 48 horas de anterioridad
- Teofilinas, se suspendieron al menos con 24 horas de anterioridad
- Cromonas: se suspendieron al menos con 12 horas de anterioridad

Existen distintas metodologías publicadas para la realización de las PPBE(187–189) así como sistemas de nebulización por dosímetro o generación continua de aerosol(187,190) . En este caso se decidió realizarlo por generación continua del aerosol

por ser la técnica con la que más experiencia se tenía en la unidad de Alergología del HUIE.

Las PPBE por método de respiración a volumen corriente, el aerosol se genera de manera continua mediante un nebulizador y se inhala a través de una mascarilla o una pieza bucal durante un tiempo preestablecido. La dosis liberada se calculó en base a un flujo de 0,13 mL/min (191,192)

El extracto utilizado para la realización de la prueba de provocación bronquial específica fue la profilina de palmera purificada (Pho d 2) como se ha descrito previamente, diluido en tampón fosfato salino estéril, PBS.

Aunque en algunos estudios se realiza determinación de la solución inicial de la solución antigénica, mediante titulación cutánea a punto final con pruebas intraepidérmicas de lectura inmediata con el extracto a estudio, se decidió realizar el mismo protocolo a todos los pacientes, empezando con la misma concentración para evitar variación en las concentraciones y en los resultados. De forma que se comenzó con una concentración de 0,15 µg/mL en concentraciones doblemente crecientes hasta 20 µg/mL según técnica previamente descrita(190,193) (Figura IV-10).

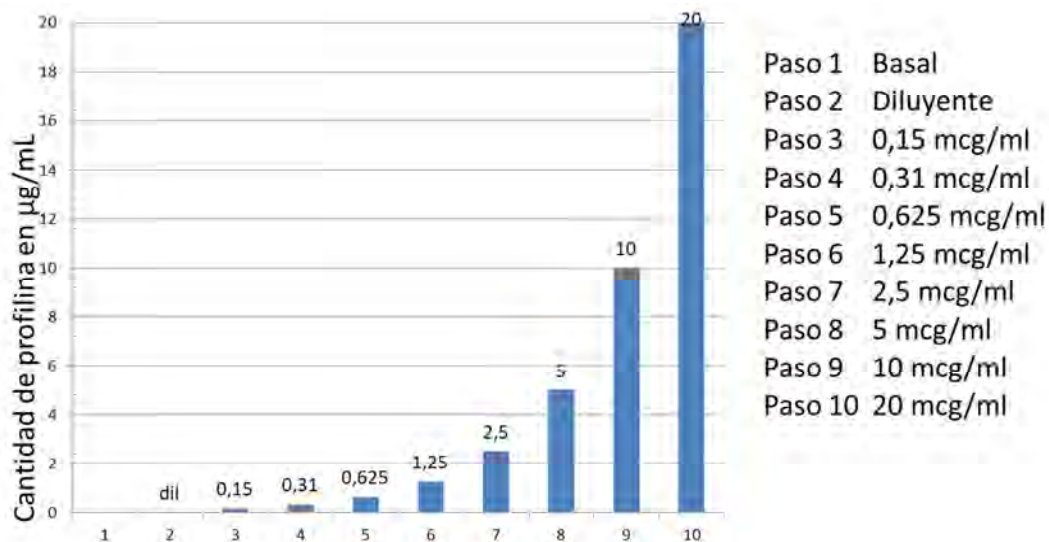


Figura IV-10 Concentraciones de profilina de las prueba de provocación bronquial específica

El procedimiento, por tanto, se inició según protocolo en diez pasos, con una espirometría basal, otras tras inhalar diluyente y luego con cada una de las concentraciones progresivamente crecientes, hasta obtener una caída del FEV1 mayor del 20% (Figura 9). En cada etapa de la prueba se colocaron 3 ml de la concentración correspondiente en el nebulizador, que fue inhalada de forma continua por el paciente mientras respiraba a volumen corriente durante 2 min. 30-90s después de la inhalación se realizó una espirometría (no más de 3 maniobras durante los 3 min. siguientes)(182).

Todas las PPBE se realizaron por la misma enfermera para la variación en la técnica fuera la mínima posible. Ésta era una enfermera cualificada y presentaba experiencia en el servicio de Alergología y en la realización de esta técnica, siempre con la supervisión de un médico especialista en Alergología.

Posteriormente se realizó una monitorización del *peak flow* horaria durante 24 horas (excepto en horas de sueño), para evaluar la respuesta tardía.

Para la medida e interpretación de los resultados de las PPBE se utilizó la PC20 (concentración del extracto que induce un deterioro del FEV1 del 20%), para calcularla se recurrió a la fórmula:

$$PC20 = (20 - R1) \times (C2 - C1) / (R2 - R1)$$

Dónde:

- R1 Es el porcentaje de caída del FEV1 inmediatamente anterior a la caída $\geq 20\%$, (o lo que es lo mismo porcentaje de deterioro del FEV1 observada en C1)
- R2 es el porcentaje de deterioro de FEV1 $\geq 20\%$, (porcentaje de deterioro del FEV1 observada en C2)
- C1 la concentración acumulada de extracto que produce un deterioro inmediatamente anterior al superior al 20% (es decir la concentración acumulada en R1)
- C2 la concentración acumulada del extracto que induce la caída del FEV1 mayor o igual al 20%. (es decir concentración acumulada en R2)

IV.6 Estudios aerobiológicos.

Durante el periodo de seguimiento clínico y aerobiológico correspondiente a 12 meses, se realizó simultáneamente un recuento de cantidad de profilina en ambiente, un recuento de pólenes y un registro de síntomas por parte de los pacientes con el fin de poder establecer una correlación entre estas variables en la vida real y en condiciones de práctica clínica habitual (Figura IV-11).

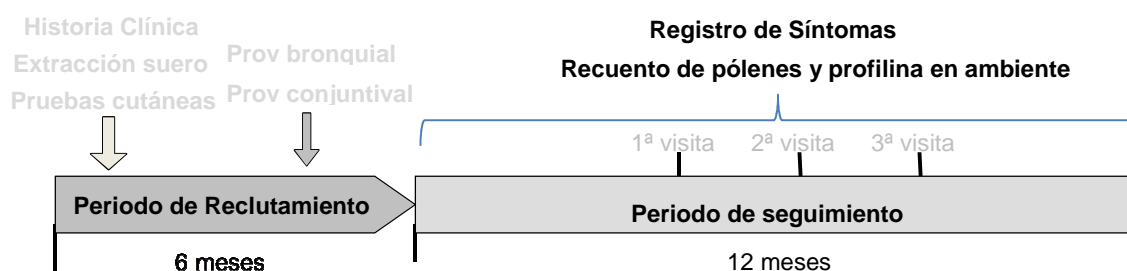


Figura IV-11 Cronograma estudios clínicos y aerobiológicos

IV.6.1 Recuento de profilina en el ambiente.

La forma de establecer la cantidad de profilina que hay en el ambiente a lo largo de todo el año fue mediante un captador de partículas de alto volumen (*Air Sentinel®*, *Quan-Tec-Air Inc., Rochester, Minnesota, USA*) adaptado al exterior(194,195) (Figura IV-12) para la recogida de aeroalérgenos. Este captador fue cedido por el servicio de Alergología del Hospital del Hospital General Universitario de Ciudad Real.



Figura IV-12 Captador de partículas de alto volumen (Air Sentinel®)

El captador se colocó en el HUIE situado en Valdemoro (Madrid, España) cuyas coordenadas son 40°11'53"N 3°41'50"O. El captador se situó en la azotea del hospital a 8.26 metros de altura sobre el nivel de la calle (Figura IV-13).



Figura IV-13 Ubicación captador de partículas de alto volumen (Air Sentinel®)

Este captador sigue un método que muestrea el aire por succión, de forma que aspira volúmenes constantes y conocidos de aire y los hace impactar contra la superficie receptora. EL flujo de aspiración de este captador es de 10 m³/h. Está funcionando de forma continua 24 horas al día, por lo que representa una muestra de 240 m³ de aire al día.

Las muestras de aire en filtros formados por un medio bilaminado que contiene un soporte de poliéster y una membrana de politetrafluoroetileno (*Merck, Millipore®*). Su captación tiene un índice de eficiencia del 99,9% a partir de 0,3 mm(195).

Los filtros fueron recogidos y sustituidos al menos cada 48 ó 72 horas (lunes, miércoles y viernes) en los periodos de menor polinización y diariamente en los periodos de mayor polinización. Estos filtros fueron guardados en una bolsa cerrada de forma hermética en nevera a 4 °C para su posterior análisis y cuantificación de profilina. El procedimiento de cambio de filtro se detalla en anexo II.

Extracción del filtro y cuantificación de alérgeno

Una vez finalizado el periodo de seguimiento aerobiológico, se realizó el análisis individual de cada una de los filtros. De forma que se obtiene el material soluble presente en cada uno de los filtros que contiene los alérgenos solubles, y mediante técnicas inmunoenzimáticas de ELISA inhibición se realiza la cuantificación de la profilina.

El filtro se introdujo en un tubo y los alérgenos se extrajeron en tampón PBS (2ml de PBS 0,01M) durante toda la noche en agitación. Posteriormente fueron analizados individualmente mediante ELISA inhibición con sueros policlonales de conejo específicos a profilina tal y como se había realizado en otros estudios(94). Para el ensayo de inhibición se mezclaron 60µl de extracto del filtro con 60 µl de anticuerpo policlonal de conejo. Esta técnica se llevó a cabo en el Departamento de I + D del Laboratorio Leti para que sus resultados sean uniformes y adecuados para el análisis.

Para el procedimiento para la cuantificación de profilina, como en estudios previos(179), se obtuvo un anticuerpo policlonal de conejo inmunizándole con la profilina purificada. Se realizó una titulación, estableciendo la dilución de suero y selección del animal (1/30.000 animal 2). Se realizó el establecimiento de la cantidad de profilina para tapizar (1µg). Para la puesta a punto del sistema de cuantificación de profilina se realizó una Curva de inhibición: diluciones seriadas de profilina desde 1µg e inhibición con los sueros a dilución 1/30.000 y ajuste a una curva sigmoideal. Finalmente se comprobó la validez del sistema midiendo la profilina en otros extractos: *Betula alba*, *Phleum pratense* y *Olea europea*. La cantidad de profilina se calculó extrapolando el resultado de densidad óptica (D.O.) para cada punto respecto a la curva patrón de concentración conocida.

Para obtener el resultado de proteínas en ambiente se tuvo en cuenta el flujo del captador (10 m³/h) por lo que se utilizó la siguiente formula 10 m³/h x 24 h=240 m³.

IV.6.2 Recuento de pólenes.

Para obtener la cantidad de pólenes presentes en nuestro medio ambiente se utilizó un captador de método volumétrico *Burkard seven day volumetric sporetrap*® (*Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Herts, UK*), que fue cedido por el

Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para la realización de este estudio (Figura IV-14).

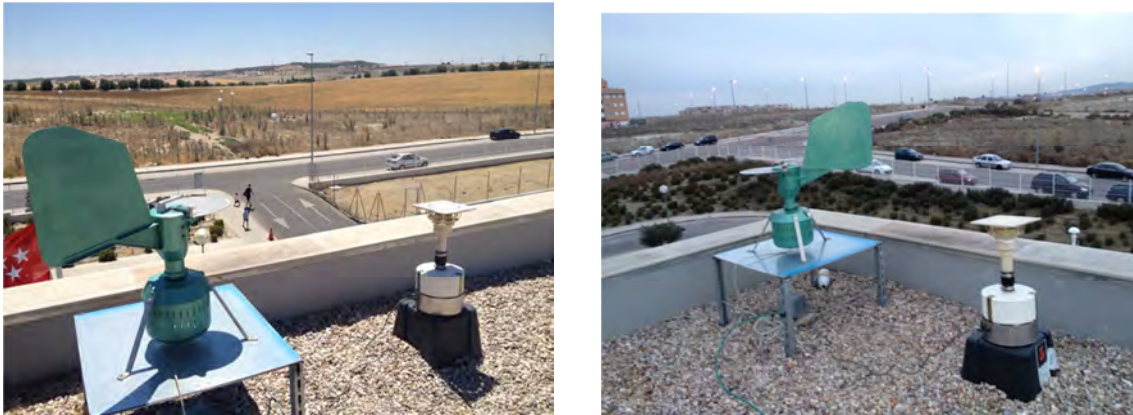


Figura IV-14 Captador Burkard® situado en Azotea del Hospital Universitario Infanta Elena

El captador Burkard® utiliza un método volumétrico con sistema de aspiración, de forma que el aire entra por un orificio de 14 milímetros de largo por 2 mm de ancho que permite la entrada de aire a 10 litros por minuto y que tiene un sistema de veleta por el que está siempre orientada en la dirección del viento. El orificio está muy próximo a un tambor que tiene una cinta transparente "MELINEX®" de 14mm x 28 mm que previamente ha sido impregnada con vaselina, de forma que impactan sobre ella los corpúsculos atmosféricos $> 1 \mu\text{m}$. Además la cinta se desplaza en él a una velocidad de 2 mm/hora, por lo que en 24 horas ha recorrido 48 mm, lo que permite separar los días que ha estado expuesto(9) (Figura IV-15).

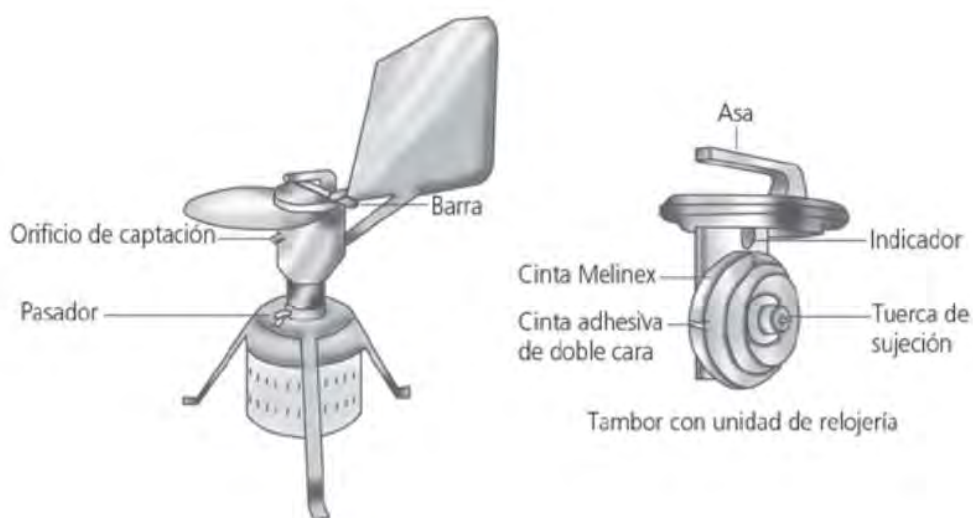


Figura IV-15 Partes del captador Burkard® (9)

El captador *Burkard*® se situó en el Hospital Universitario Infanta Elena (HUIE) situado en Valdemoro (Madrid, España) cuyas coordenadas son 40°11'53"N 3°41'50"O. El captador se situó en la azotea del hospital a 8,26 metros de altura sobre el nivel de la calle a menos de 1 metro de distancia del captador de partículas *Air Sentinel*® (Figura IV-14). En los alrededores del Hospital no hay edificios altos ni árboles muy cercanos.

Las muestras se cambiaron con una periodicidad máxima de 7 días (viernes). De forma que la cinta se pueda dividir en función de los días que haya estado expuesta (48 mm por día).

Las muestras fueron preparadas según técnica habitual, siempre por la misma persona en el HUIE. Se separaron de forma que en cada porta estaba la muestra correspondiente a un día y se montó entre un portaobjetos y un cubreobjetos de tamaño adecuado. El agente de montaje utilizado fue la glicerogelatina teñida con fucsina básica. (Según anexo 3).

Las preparaciones selladas y debidamente etiquetadas, se almacenaron y posteriormente, para garantizar una reproductibilidad de las lecturas, todos los portas se trasladaron al Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid donde fueron evaluados por una bióloga técnico experimentada en la lectura de pólenes. Para ello se utilizó un microscopio óptico con lente de inmersión

La metodología de lectura fue la habitual de la Red Palinocam y de la Red Española de Aerobiología. De forma que se realizan 4 barridos del porta horizontales y equidistantes entre sí con el objetivo de 40x10 aumentos, según se refleja en la Figura IV-16. De esta forma, dependiendo del diámetro del campo microscópico utilizado, se valora aproximadamente entre un 12 y un 13% de la superficie total(196).

En este barrido se realizó la identificación morfológica de los granos de polen y el contaje de los mismos, obteniendo el resultado con la cuantificación de los tipos polínicos reflejados en un valor medio diario de granos de polen por metro cúbico de aire.

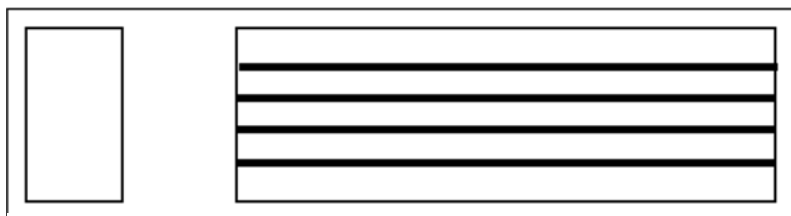


Figura IV-16 Representación de barridos de lectura de polen.

Además con el fin de poder establecer una comparativa del polen recogido en Valdemoro, se solicitó a la Red Palinológica de la Comunidad de Madrid o Red Palinocam, los datos correspondientes al recuento de pólenes de las dos estaciones más cercanas a Valdemoro, Getafe por el norte y Aranjuez por el sur (Figura IV-17).

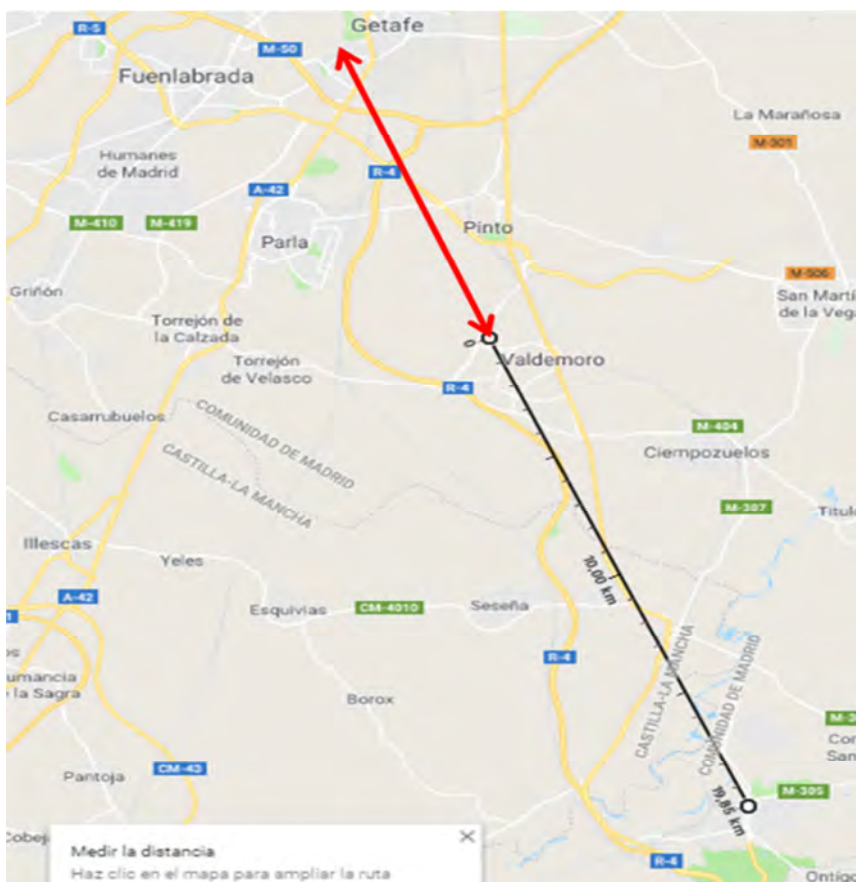


Figura IV-17 Situación captadores Getafe, Valdemoro y Aranjuez

De forma que la distancia entre el HUIE y los captadores se refleja en las Figuras 16 A y B

- Getafe: distancia al Hospital 11,97 Km (Figura IV-18.A).
- Aranjuez: distancia: al Hospital 19,85 Km (Figura IV-18.B).

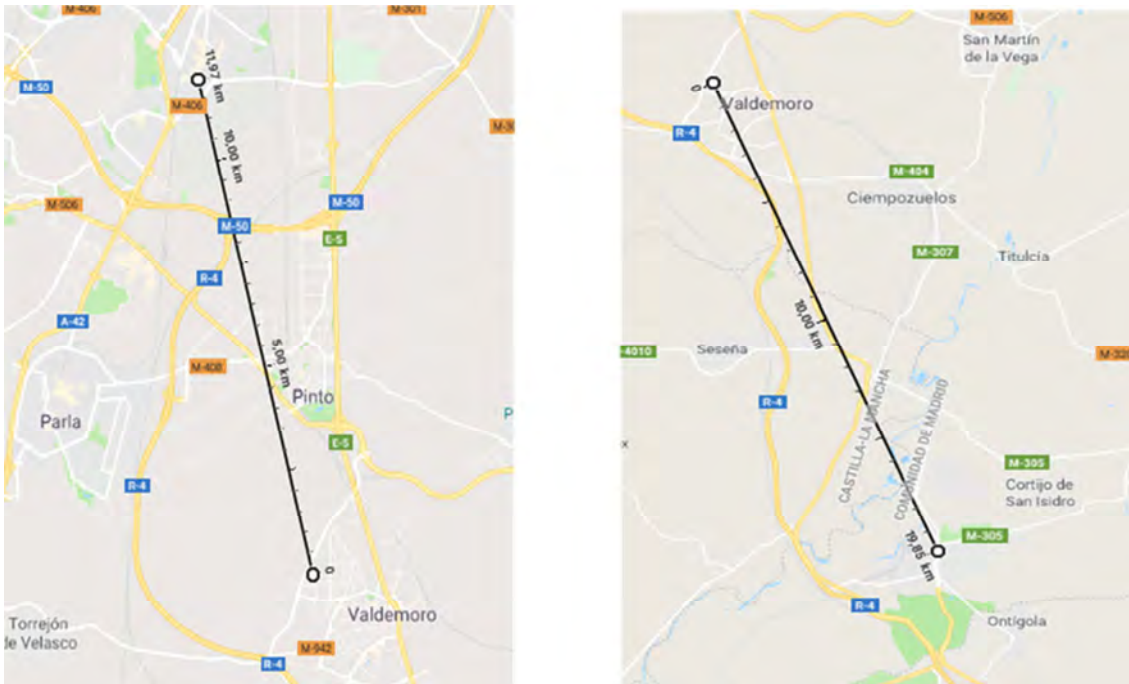


Figura IV-18 16 A: Distancia HUIE Captador Getafe B: Distancia HUIE Captador Aranjuez.

IV.6.3 Parámetros ambientales y contaminantes atmosféricos

Se recogieron los parámetros meteorológicos y contaminantes atmosféricos para intentar evaluar cómo pueden influir cada uno de ellos en la exposición ambiental de perfilina

Para ello se recogieron los datos de la Red de Calidad del Aire de la Comunidad de Madrid que registra los niveles de concentración de los principales contaminantes atmosféricos, de forma que se puedan definir los niveles de calidad del aire.

El centro de recogida de datos de Valdemoro se encuentra en el Colegio Público Pedro Antonio de Alarcón, que está situado a una distancia de 1,98 km del HUIE (Figura IV-19).

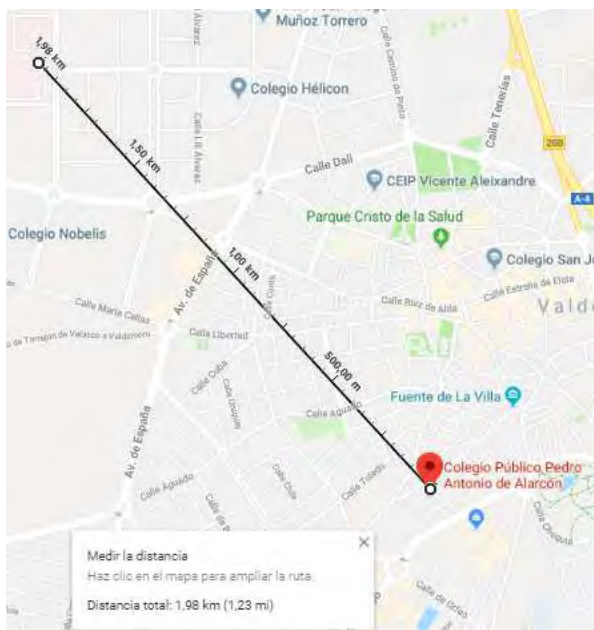


Figura IV-19 Distancia del centro de recogida de datos al HUIE

Cada centro de calidad del aire recoge y valida diariamente los parámetros registrados en la estación.

Los datos recogidos fueron:

- Lluvia expresados en l/m²
- Humedad relativa expresada en %
- Temperatura expresada en °C
- Velocidad del viento expresada en m/s
- Radiación solar expresada en W/m²
- Ozono (O³) expresada en µg/m³
- Presión barométrica expresada en mbar
- Partículas en suspensión de menos de 2,5 micras expresadas en µg/m³
- Dióxido de nitrógeno (NO₂) expresada en µg/m³
- Monóxido de nitrógeno (NO) expresada en µg/m³.

IV.7 Estudios clínicos. Registro de síntomas.

Durante el periodo de seguimiento, durante el cual se recogieron los parámetros medioambientales referidos anteriormente, los pacientes realizaron un registro de síntomas con el fin de intentar correlacionar estos datos.

El periodo de seguimiento en el que los pacientes registraron sus síntomas fue de un año. Durante todo este periodo los pacientes siguieron el tratamiento recomendado por su alergólogo, conforme a las guías clínicas existentes y al criterio médico.

Los pacientes cumplimentaron un registro de síntomas diario. En este registro se recogió la presencia o no de síntomas según una escala de severidad de 0 a 3. Tal y como se había realizado previamente en otros estudios(94,197).

La intensidad de la escala de síntomas se les explicó a los pacientes de la siguiente forma:

- 0: ausencia de síntomas evidentes
- 1: un poco (leve, trivial, claramente presente pero no molesto)
 - Obstrucción nasal leve,
 - Leve hidrorrea acuosa
 - Estornudos ocasionales
 - Picor de ojos leve
 - Sensación disneica
 - Tos ocasional
- 2: bastante (moderado, molesto, pero no incapacitante o intolerable)
 - Obstrucción nasal moderada,
 - Hidrorrea moderada
 - Picor ocular o
 - Asma leve
- 3: mucho (grave, incapacitante y/o intolerable)
 - Obstrucción nasal completa,
 - Hidrorrea continua
 - Estornudos repetidos y frecuentes
 - Síntomas oculares frecuentes
 - Crisis de asma

Los síntomas que valoraron diariamente se dividieron en tres categorías

- Síntomas oculares
 - Picor ocular
 - Lagrimeo
- Síntomas nasales

- Estornudos
- Hidrorrea
- Obstrucción nasal
- Picor nasal
- Síntomas bronquiales
 - Tos
 - Pitos en el pecho
 - Ahogo en el pecho.

A lo largo del periodo de seguimiento se programaron tres visitas de cada paciente con el alergólogo, con el objetivo de optimizar el seguimiento y recoger los datos realizados por los pacientes. Las visitas serán según el siguiente esquema (Figura IV-20):

- 1ª visita de seguimiento: Enero-Marzo coincidiendo con polinización de *Cupresaceas*
- 2ª visita de seguimiento: Mayo-Junio coincidiendo con polinización de *Gramineae* y *Olea europea*.
- 3ª visita de seguimiento: Septiembre-Octubre

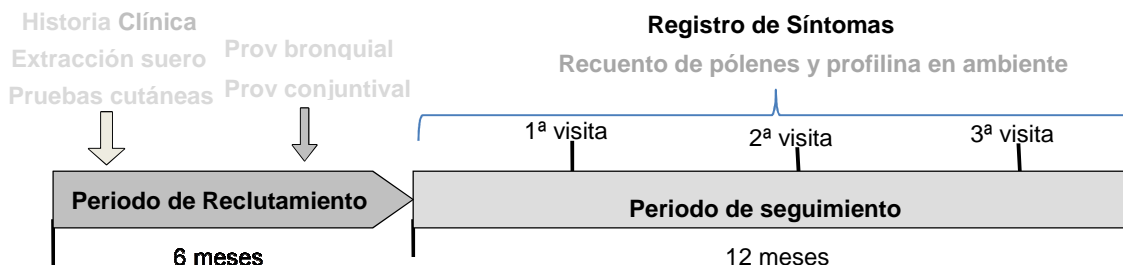


Figura IV-20 Cronograma: Registro de síntomas

IV.8 Análisis estadístico.

Se han utilizado test de *chi*-cuadrado para estudiar la relación entre las variables del estudio. El test de *Mann-Whitney* para comparar los valores obtenidos en los diferentes grupos. Se han utilizado modelos de regresión lineal y regresión logística para evaluar la relación de variables con la intensidad y presencia de síntomas respectivamente. Se utilizaron gráficos de dispersión y se calculó el coeficiente de

correlación de *Spearman* para evaluar la concentración de IgE y la intensidad de los síntomas. Se utilizó el software *GraphPad Prims 7* (La Jolla, CA, USA) y *OpenEpi* (<http://www.openepi.com>)

Para realizar el análisis de las correlaciones entre las determinaciones serológicas de IgE específica a profilina, se transformaron las variables con logaritmos para corregir la asimetría positiva de la distribución de los datos. Sobre los datos transformados con logaritmos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, su intervalo de confianza al 95% y su valor de p. Para comparar las tres variables correlacionadas en función del resultado de Inmublot, se agruparon todos los valores en la categoría de positivos y se obtuvieron las frecuencias de negativos y positivos en función del resultado de inmublot, de esta forma se realizó las comparaciones con la prueba exacta de Fisher.

La mayoría de los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la colaboración del Instituto de investigación Fundación Jiménez Díaz. Además en algunos parámetros también colaboró Departamento de I + D del Laboratorio Leti.

IV.9 Consideraciones éticas.

Este estudio se realizó de acuerdo con los principios establecidos en la declaración del Helsinki del 2008 (*World Medical Association Declaration of Helsinki*, 2013). El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del IIS Fundación Jiménez Díaz. Anexo 3.

Todos los pacientes que participaron en el estudio recibieron información adecuada del mismo y tuvieron tiempo necesario para realizar las preguntas oportunas. Finalmente dieron su consentimiento por escrito para la realización del mismo. Los documentos de solicitud de consentimiento que se ofrecieron a los pacientes y representantes, tanto a los casos como a los controles así como los asentimientos, se pueden revisar en el anexo IV.

Toda la información que se obtuvo del estudio fue tratada de forma confidencial, se llevó a cabo conforme a la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre sobre la protección de los datos de carácter personal. De forma que los datos derivados del estudio de cada paciente fueron identificados mediante un sistema alfanumérico de codificación interna, nunca con datos personales. Solo el investigador podía relacionar estos datos con la historia clínica de los pacientes.

V. RESULTADOS

V.2 Características basales de la población

V.2.1 Datos epidemiológicos

Se incluyeron 85 pacientes con rinitis y/o conjuntivitis y/o asma alérgica por sensibilización a pólenes que cumplían los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento informado. De todos ellos, 55 pacientes presentaron una prueba cutánea en *prick* positiva a profilina, por lo que fueron considerados casos y, 30 pacientes presentaron una prueba cutánea con profilina con resultado negativo, por lo que fueron considerados controles.

La edad de los pacientes presentó un rango entre 14 y 48 años, siendo la media de edad de 29,9 años y una mediana de 31 años, con una DE de 8,7.

La distribución de la edad de los pacientes se muestra en la Figura V-1

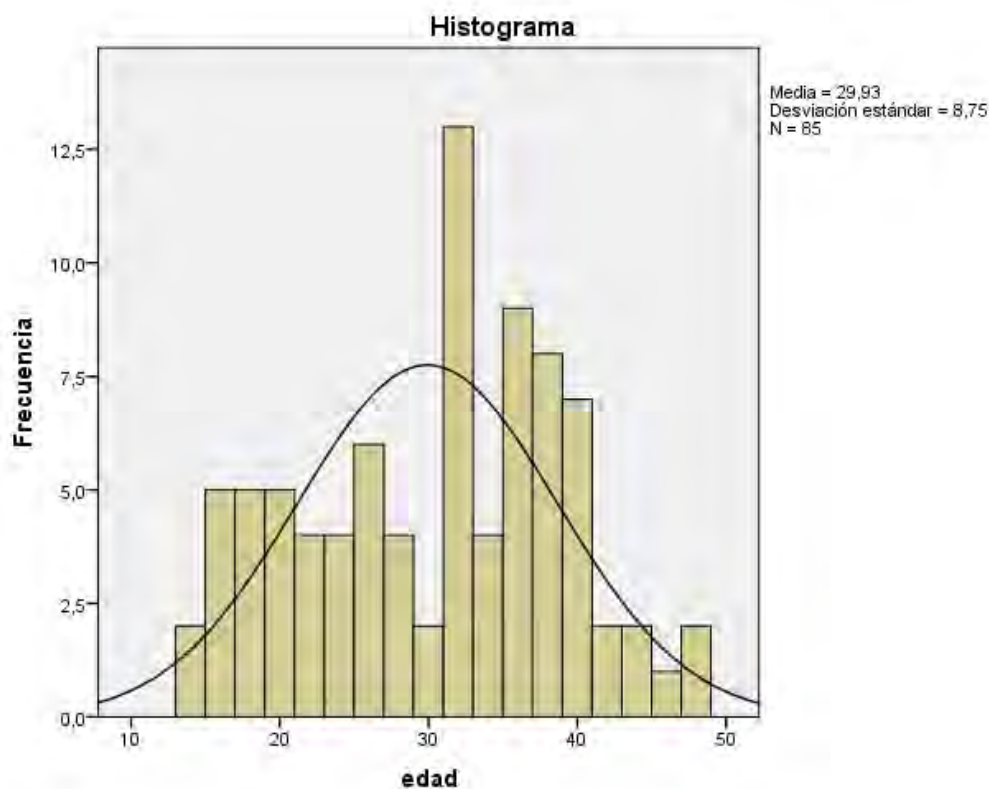


Figura V-1 Distribución de la edad en los pacientes del estudio

La edad media de los casos fue 28,8 con mediana de 31 DE 8,6. La media de los controles fue de 31,8 con mediana de 33,5 con DE 8,7. Estas diferencia en la edad media de los grupos de casos y controles no fueron ES ($p= 0.132$) (Tabla V-1 y Figura V-2).

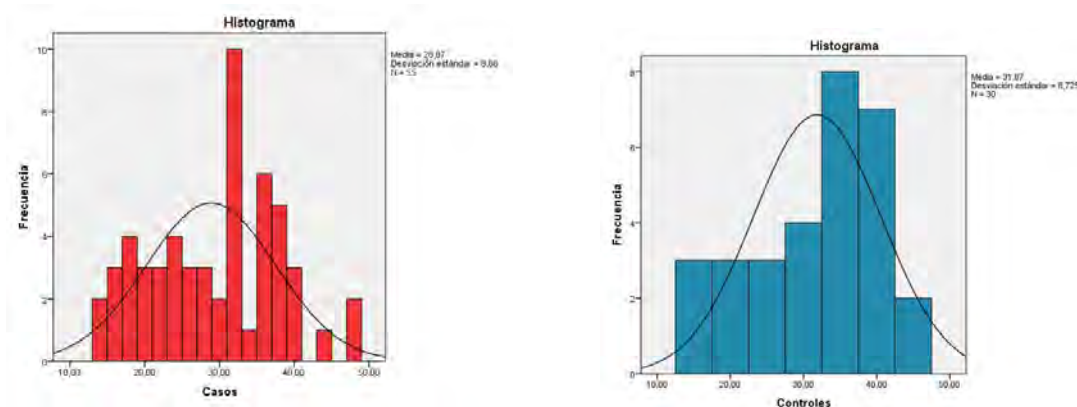


Figura V-2 Distribución de la edad en casos y controles.

	Media	Mediana	Desviación Estándar
Total	29,9	31	8,7
Casos	28,8	31	8,6
Controles	31,8	33,5	8,7

Tabla V-1 Edad media en casos y controles

En cuanto al sexo la muestra estaba formada por 49 mujeres (57,6%) y 36 varones (42,3%). En los casos la distribución fue de 60% de mujeres (33 casos) y 40 % varones (22 casos), mientras que en los controles fueron 53 % mujeres (16) y 47% varones (14) Sin que estas diferencias fueran ES ($P = 0.715$) (Tabla V-2 y Figura V-3).

Sexo	varones	mujeres	Total
Casos	22	33	55
Controles	14	16	30
Total	36	49	85

Tabla V-2 Sexo en casos y controles

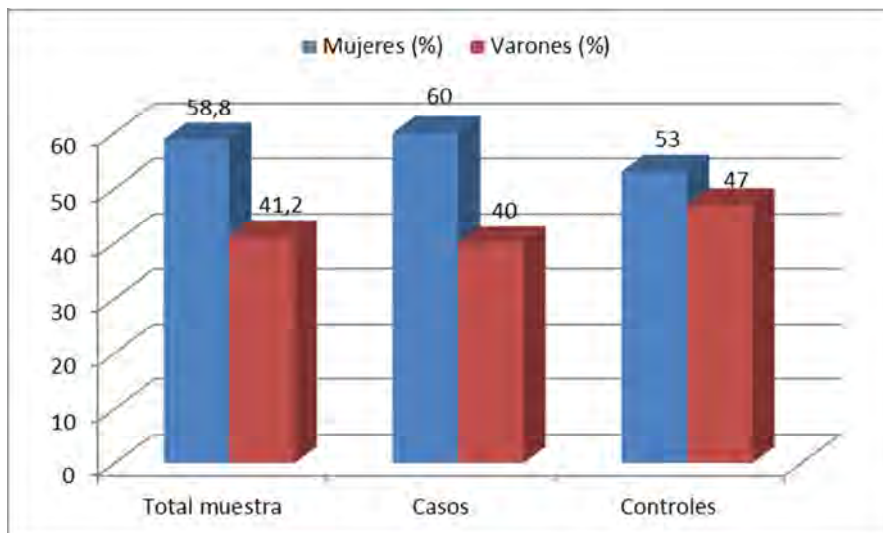


Figura V-3 Sexo en casos y controles

El 40 % de los pacientes (34) presentaban antecedentes familiares de atopia, siendo un 47,3 % (26 pacientes) entre los casos y un 26,7% (8 pacientes) en los controles, diferencias no significativas ($p= 0.105$) (Tabla V-3).

	Antecedentes familiares de atopia		Total
	Sí	No	
	Un padre	2 padres	
Casos	8	18	29
Controles	2	6	22
Total	10	24	51

Tabla V-3 Antecedentes familiares de atopia

V.2.2 Patología Respiratoria.

El 100 % de los casos y 96,6 % de los controles presentaban **rinitis alérgica**.

La clasificación de la rinitis en cuanto a gravedad y duración según la guía ARIA, se refleja en la Tabla V-4.

	Leve	Moderada	Grave	Intermitente	Persistente
Casos	33 (60%)	21 (38%)	1 (1,8%)	5 (9,1%)	50(90,9%)
Controles	7 (24,1%)	22(75,9%)	0	0	29 (100%)

Tabla V-4 Clasificación rinitis gravedad y duración

La gravedad de la rinitis fue algo superior en los controles, de forma que estas diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.003$) (Figura V-4).

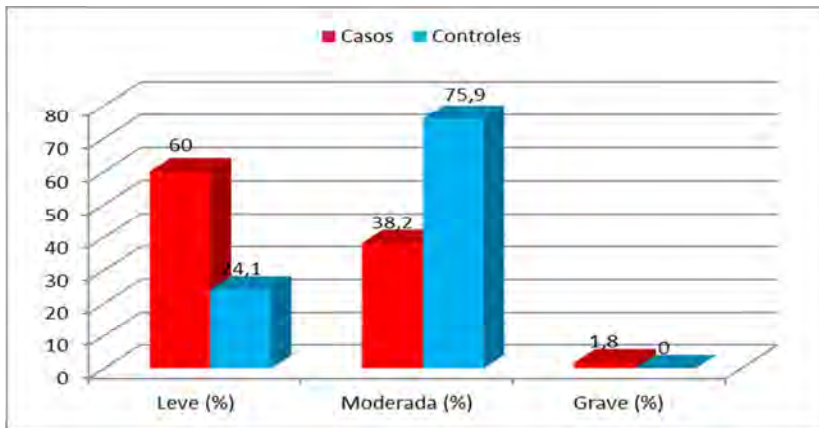


Figura V-4 Distribución gravedad de rinitis.

La Clasificación de la rinitis según la guía ARIA se refleja en la siguiente Tabla V-5 y Figura V-5

	Leve Intermitente	Leve Persistente	Moderada-Grave Intermitente	Moderada-Grave Persistente
Casos	2 (3,6%)	32 (58%)	4 (7,3%)	17 (30,9%)
Controles	0	7 (24,1%)	0	22 (75,9%)

Tabla V-5 Clasificación de la rinitis según la guía ARIA.

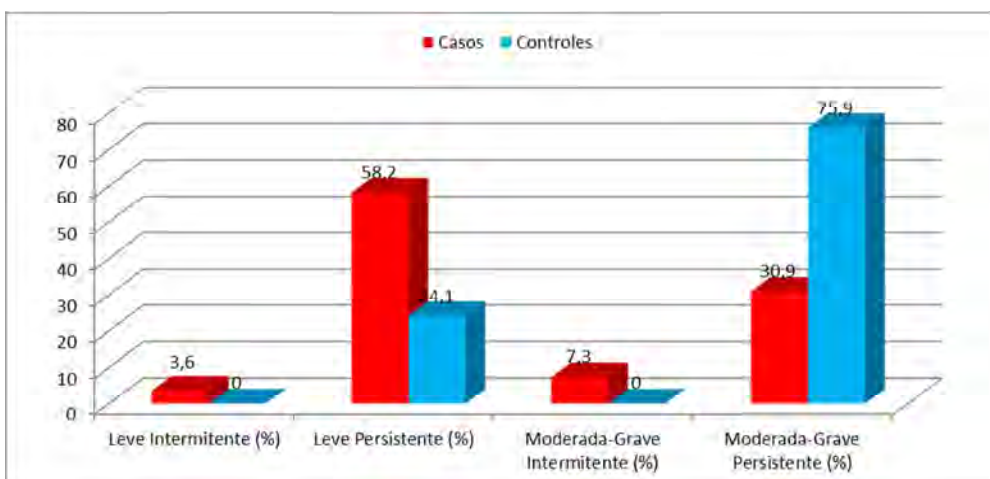


Figura V-5 Distribución de la clasificación de la rinitis según ARIA

Los pacientes presentaban un tiempo de evolución de la rinitis que iba de 2 a 20 años con una evolución media de 8,81 años y una mediana de 8 años sin que se encontrasen diferencias ES entre los casos y los controles (Tabla V-6).

	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Total muestra	8,81	8	5,34	2	20
Casos	8,96	8	4,92	2	20
Controles	8,52	5	6,15	2	20

Tabla V-6 Tiempo de evolución de la Rinitis (años)

La distribución de las frecuencias de duración de la evolución de la rinitis en todos los pacientes, en los casos y en los controles se puede observar en las Figuras V-6 y V7.

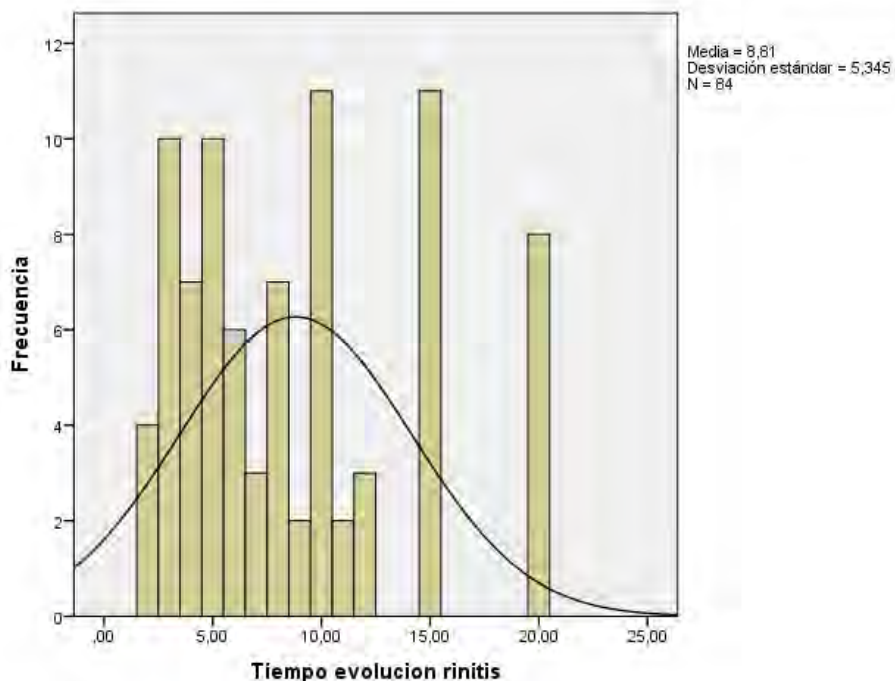


Figura V-6 Distribución del tiempo de evolución de la rinitis en los pacientes del estudio

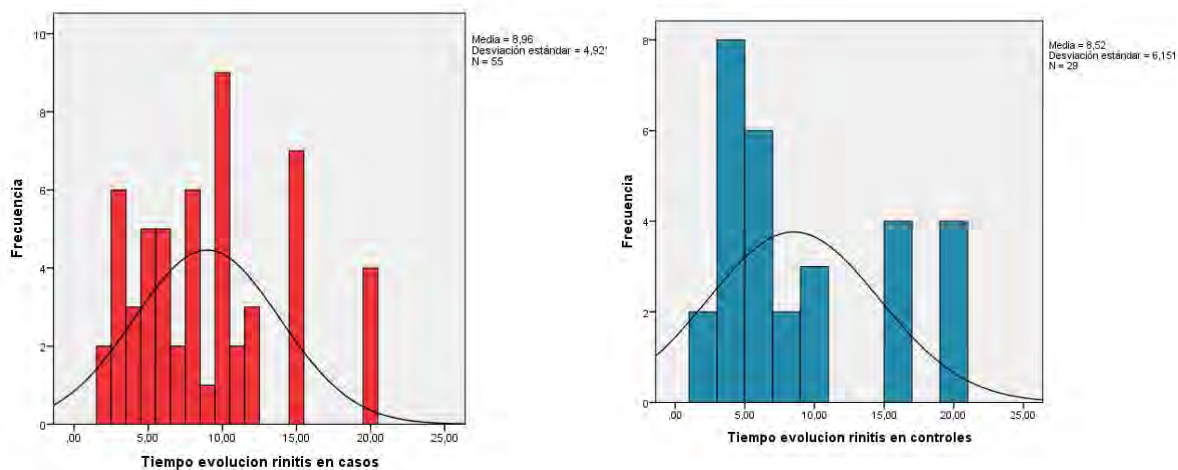


Figura V-7 Distribución del tiempo de evolución de la rinitis en casos y controles

El 100 % de los casos y el 96% de los controles presentaban **conjuntivitis alérgica**.

El 75,3% de los pacientes presentaban **síntomas bronquiales**, con una distribución del 72,7 % de los casos (40 pacientes) y un 80 % de los controles (24 pacientes). Diferencias no ES ($p= 0.631$)

El tiempo de evolución de los síntomas bronquiales de los pacientes al inicio del estudio tenía una media de casi 5 años, siendo superior en los casos con una media de 5,9 con DE 5,04 que en los controles con media de 3,46 años de evolución DE 3,48 siendo esta diferencia ES $p<0,05$ (Tabla V-7).

	N	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Total	64	4,98	3	4,65	1	20
Casos	40	5,9	4	5,05	1	20
Controles	24	3,46	2	3,48	1	15

Tabla V-7 Tiempo de evolución del asma

La distribución del tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas bronquiales en todos los pacientes, en los casos y en los controles se puede observar en las Figuras V-8 y V-9.

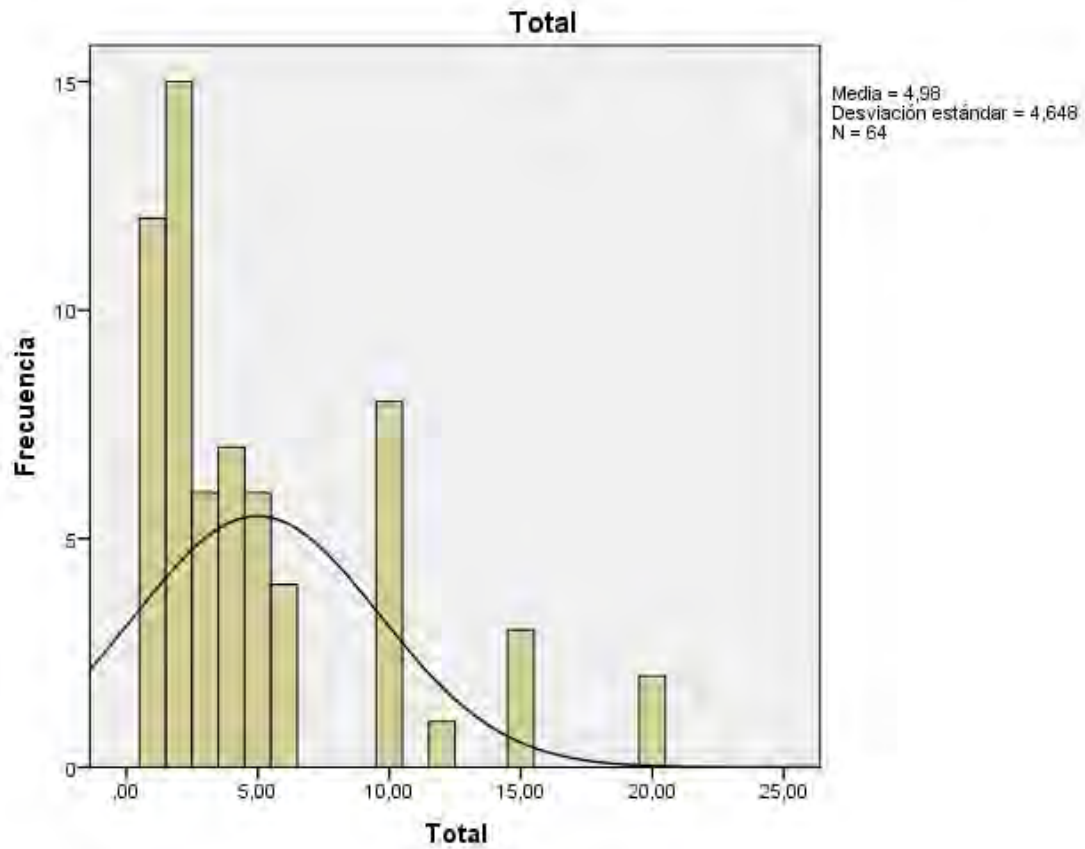


Figura V-8 Distribución del tiempo de evolución del asma

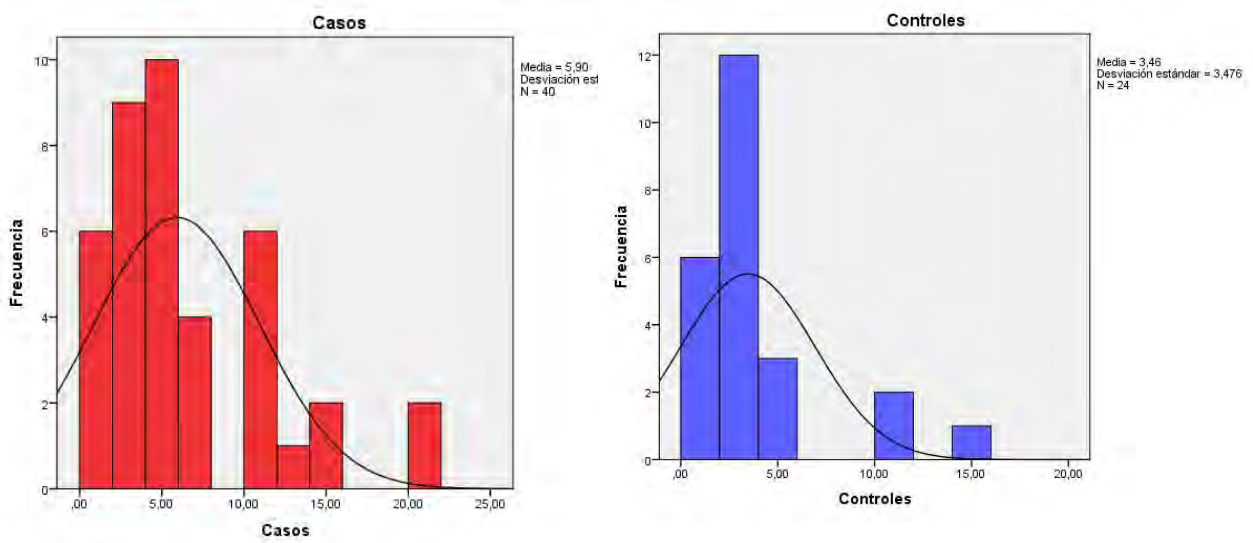


Figura V-9 Distribución del tiempo de evolución del asma en casos y controles.

La mayoría de los pacientes (28) presentaba un asma intermitente (43,7% de los pacientes con asma), 22 pacientes (34,4%) presentaba un asma persistente leve y 14 pacientes (21,9%) presentaba asma persistente moderado. Ningún paciente presentaba asma persistente grave.

La clasificación de la gravedad del asma se distribuyó entre los casos y controles según la siguiente tabla y gráfica, sin que se encontraran diferencias ES ($P = 0.377$) (Tabla V-8 y Figura V-10).

	Intermitente	Persistente Leve	Persistente Moderada	Persistente Grave	Total
Casos	15(37,5%)	16(40%)	9(22,5%)	0	40
Controles	13(54,2%)	6(25%)	5(20,8%)	0	24

Tabla V-8 Clasificación de la gravedad del asma.

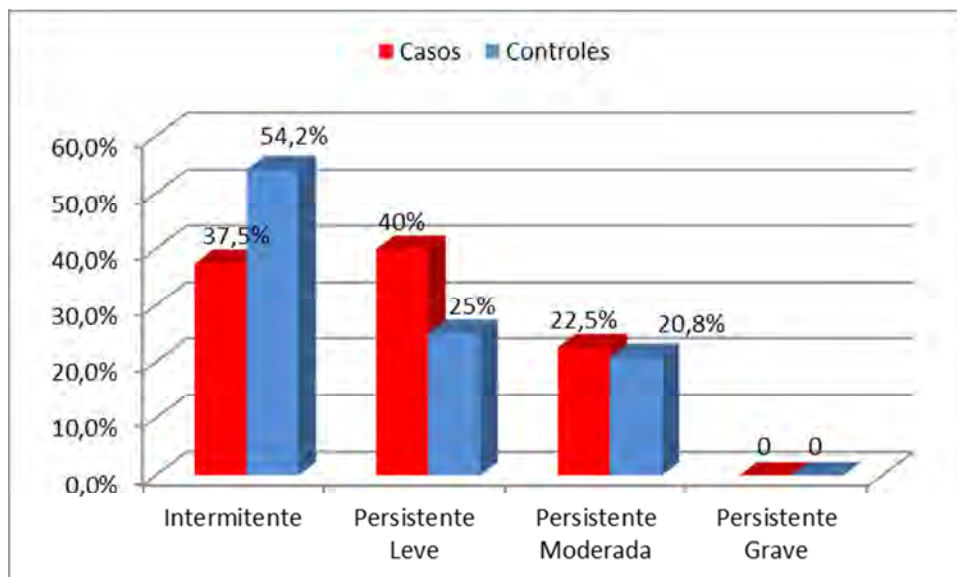


Figura V-10 Distribución de la clasificación de gravedad del asma de casos y controles.

Por otra parte 30 pacientes (46,9% de los pacientes con asma) presentaban un asma controlada, 32 pacientes (50%) presentaba un asma parcialmente controlada y 2 pacientes (3,1%) presentaba un asma no controlado al inicio del estudio.

La distribución de los pacientes en cuanto al control del asma se distribuyó entre los casos y controles según la siguiente tabla y gráfica. Las diferencias no fueron ES ($P = 0.651$) (Tabla V-9 y Figura V-11).

	Controlada	Parcialmente controlada	No controlada	Total
Casos	19 (47,5%)	19 (47,5%)	2 (5%)	40
Controles	11 (45,8%)	13 (54,2%)		24

Tabla V-9 Clasificación control del asma

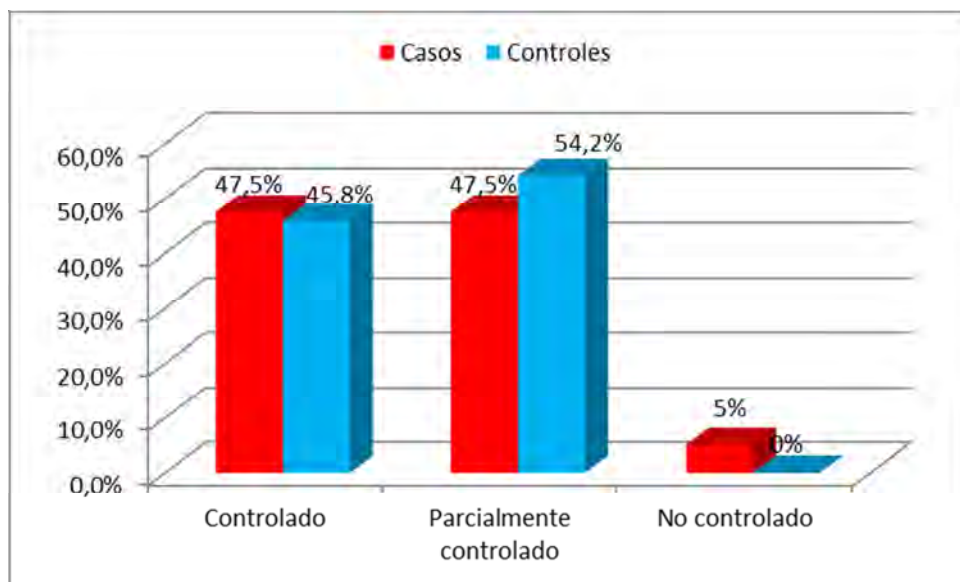


Figura V-11 Distribución clasificación control del asma

V.2.3 Alergia a alimentos.

La alergia a alimentos fue estadísticamente más significativa en los casos que en los controles, de forma que 45 de los casos (81,82%) presentaba alergia a alimentos y solo 3 de los controles (10 %) ($p < 0.001$)

La clínica más frecuente que presentaban los casos fue el síndrome de alergia oral, que la presentaban 42 pacientes (93,3% de los alérgicos a alimentos) 3 pacientes (6,6%) presentaban urticaria y dos pacientes (4,4%) presentaban anafilaxia. Tabla V-10

De los 3 controles que presentaban alergia a alimentos uno presentaba síndrome de alergia oral, otro paciente presentaba urticaria y otro anafilaxia.

	N	Alergia a Alimentos	SAO	Anafilaxia
Casos	55	45	42	2
Controles	30	3	1	1
Total	85	48	43	3

Tabla V-10 Alergia a alimentos. Clínica casos y controles

Por lo tanto, en nuestro estudio, la presencia de síndrome de alergia oral se asoció de forma ES con pacientes sensibilizados a profilina. De los 43 pacientes que presentaban síndrome de alergia oral 42 (97,7 %) pertenecían al grupo de los casos y solo uno al de los controles ($p < 0.001$).

En el caso de las anafilaxias dos de los casos (3,6%) la presentaba y uno de los controles (3,3%) sin que esta diferencia sea ES.

El alimento más frecuentemente implicado en la alergia a alimentos fue el melón, 41 de los casos (74,5 %) seguido de la sandía con 20 de los casos (36,4 %) 11 casos (20%) referían síntomas con kiwi, 10 con melocotón (18,2%), 10 con plátano (18,2%), 8 de los casos con piña (14,5%), 8 de los casos con tomate (14,5%), 6 con manzana (10,9%) al igual que con pera y naranja, 3 casos con cereza, 3 casos con frutos secos, 2 con fresa, y solo en un caso referían síntomas con aguacate, uva, mandarina. chirimoya, granada (Tabla V-11).

Alimento	Total	Casos	Controles
Melón	42	41 (74,5%)	1 (3,3%)
Sandía	20	20 (36,4%)	
Kiwi	12	11 (20%)	1 (3,3%)
Melocotón	10	10 (18,2%)	
Plátano	10	10	

		(18,2%)	
Piña	8	8 (14,5%)	
Tomate	8	8 (14,5%)	
Manzana	6	6 (10,9%)	
Pera	6	6 (10,9%)	
Naranja	6	6 (10,9%)	
Cereza	3	3 (5,4%)	
Frutos secos	5	3 (5,4%)	2 (6,6%)
Fresa	2	2 (3,6%)	
Uva	1	1 (1,8%)	
Mandarina	1	1 (1,8%)	
Granada	1	1 (1,8%)	
Chirimoya	1	1 (1,8%)	
Aguacate	2	1 (1,8%)	1 (3,3%)

Tabla V-11 Alimentos implicados en alergia a alimentos

Los dos casos que presentaron anafilaxia, el alimento referido por los pacientes en un caso fue el mango y en otro caso la avellana. El paciente control que había referido una anafilaxia el alimento implicado fueron los frutos secos

V.3 Estudio *in vitro*

Se realizaron los estudios *in vitro* en 51 casos y en 28 controles, ya que hubo 6 pacientes (4 casos y dos controles) que fueron excluidos de este análisis porque no se llegaron a realizar extracción sanguínea.

Los resultados de los valores de rPhl p 12 y rBet v 2 de los casos se presentan en la Tabla V-12.

Suero de los casos	rPhp p 12 (kUA/L)	rBet v 2 (kUA/L)
Caso-1	0,51	0,75
Caso-2	1,01	0,72
Caso-3	0,76	0,8
Caso-4	n	0,36
Caso-5	0,57	0,71
Caso-6	1,83	2,26
Caso-7	5,52	8,26
Caso-8	2,7	4,88
Caso-9	4,56	8,37
Caso-10	3,7	4,93
Caso-11	8,9	12,3
Caso-12	0,57	0,65
Caso-13	6,57	5,37
Caso-14	24	34,3
Caso-15	0,5	0,36
Caso-16	5,11	7,63
Caso-17	1,69	1,57
Caso-18	21,7	41,7
Caso-19	2	2,51
Caso-20	n	n
Caso-21	4,35	4,04
Caso-22	n	0,75
Caso-23	9,18	10,9
Caso-24	3,09	4,46
Caso-25	0,52	0,73
Caso-26	1,92	1,81
Caso-27	0,77	0,9
Caso-28	n	n
Caso-29	n	n
Caso-30	7,13	7,83
Caso-31	2,58	2,29

Caso-32	8,99	10,3
Caso-33	0,98	1,63
Caso-34	4,94	5,31
Caso-35	n	n
Caso-36	3,76	5,13
Caso-37	6,64	16,2
Caso-38	0,66	1,24
Caso-39	14,5	20,7
Caso-40	n	n
Caso-41	n	n
Caso-42	65,3	55,1
Caso-43	1,33	2,47
Caso-44	n	n
Caso-45	1,22	1,39
Caso-46	n	0,37
Caso-47	n	n
Caso-48	n	n
Caso-49	10,6	17,1
Caso-50	1,26	1,64
Caso-51	2,52	5,97

Tabla V-12 Valores de rPhi p 12 y rBet v 2 de los casos (n: no detectado)

En este caso se encontró una correlación ES ($p < 0,001$) entre los valores rPhi p 12 y rBet v 2 de los casos con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,97 con un IC 95 % (0,95-0,99) Según se refleja en la Figura V-12.

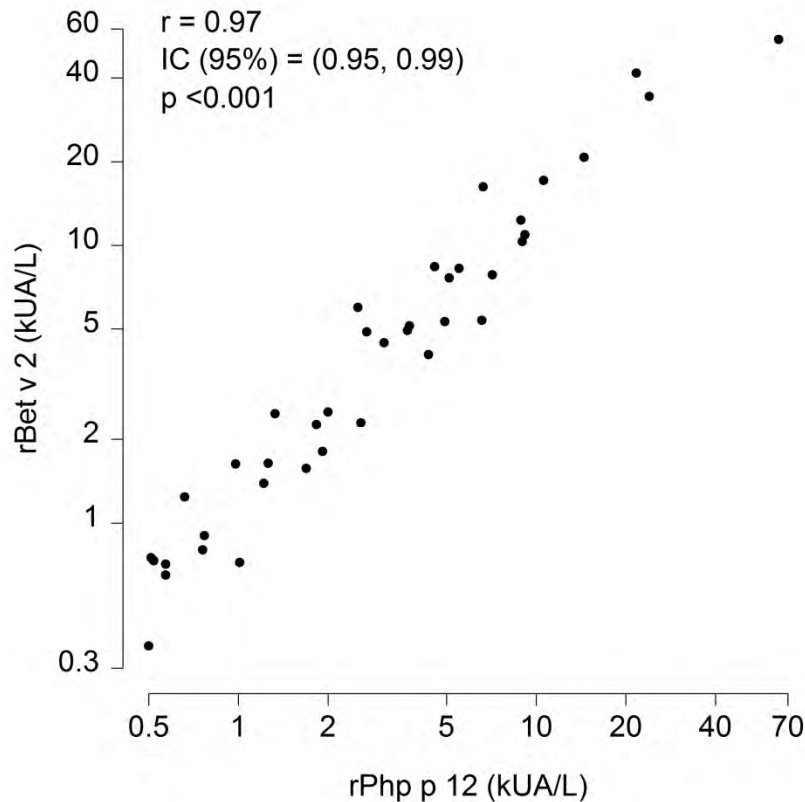


Figura V-12 Correlación entre rPhl p 12 y rBet v2 medido por InmunoCAP® en los casos.

Según este estudio realizado por InmunoCAP®, rPhl p 12 fue positivo en 39 pacientes, el 74,5 % de los casos. De igual forma rBet v 2 fue positivo en 42 pacientes, el 82,3% de los casos. Obteniéndose un 96 % de concordancia entre las dos profilinas en términos cualitativos, es decir presencia o no de IgE específica a profilina en cada uno de los análisis. En todos los controles el resultado fue negativo para ambas profilinas.

La Media de detección de rPhl p 12 fue de 4,8 kUA/L, con una mediana de 1,7 (DE 10,04) y un rango de 65,30 (Figura V-13).

En el caso de IgE específica para rBet v 2 la media fue de 6,2 kUA/L, la mediana de 1,8 con una DE (10,81) y el rango de 55,10 (Figura V-13).

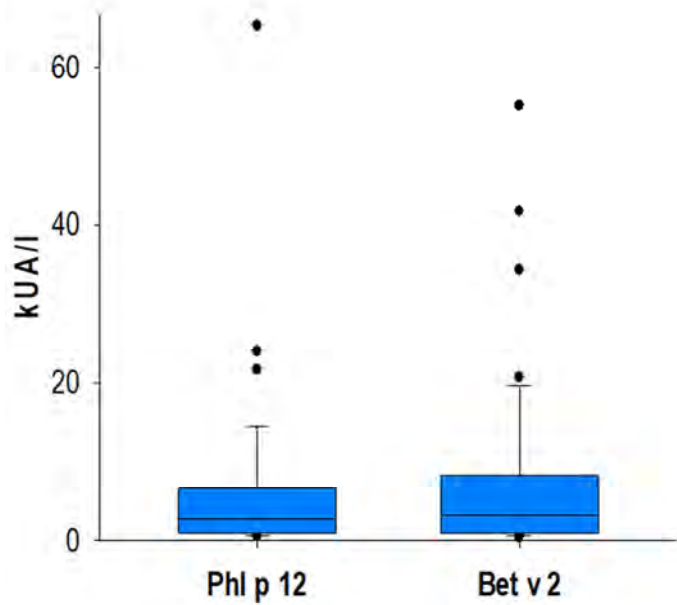


Figura V-13 IgE específica a Phl p 12 y Bet v 2

De entre los casos en los que no se detectó IgE específica a profilina, en nueve de los pacientes estos resultados negativos fueron concordantes, siendo negativos ambos alérgenos (casos, 20, 28, 29, 35, 40, 41, 44, 47 y 48), solo en dos casos fue positivo para rBet v 2 y negativo para rPhl p 12 (caso 4 y caso 46) siendo en estos casos los valores de rBet v 2 muy limítrofes 0,36 y 0,37 kUA/L respectivamente.

Adicionalmente se realizó un estudio de detección de IgE específica al alérgeno purificado (Pho d 2) marcado con biotina, cuyos resultados se muestran en la Tabla V-13.

	Pho d 2 Biot (kUA/L)
Caso 1	0,36
Caso 2	0,52
Caso 3	0,51
Caso 4	n
Caso 5	n
Caso 6	0,63
Caso 7	3,15

Caso 8	1,15
Caso 9	2,89
Caso 10	1,81
Caso 11	2,78
Caso 12	n
Caso 13	1,66
Caso 14	12,9
Caso 15	n
Caso 16	n
Caso 17	0,51
Caso 18	12,6
Caso 19	1,02
Caso 20	n
Caso 21	0,91
Caso 22	0,45
Caso 23	4,8
Caso 24	n
Caso 25	0,35
Caso 26	N
Caso 27	0,37
Caso 28	n
Caso 29	n
Caso 30	4,78
Caso 31	1,59
Caso 32	4,44
Caso 33	0,6
Caso 34	1,92
Caso 35	n
Caso 36	1,59
Caso 37	5,5
Caso 38	0,44
Caso 39	13,3
Caso 40	n

Caso 41	n
Caso 42	38,2
Caso 43	0,84
Caso 44	n
Caso 45	6,38
Caso 46	n
Caso 47	n
Caso 48	n
Caso 49	0,35
Caso 50	n
Caso 51	n

Tabla V-13 IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina (n: no detectado)

En este caso se detectó IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina en 35 de los casos 68,6 % de los casos. Con un rango de 0 a 38,20 kUA/L. Una Media de 2,5 y una mediana de 0,51 kUA/L (DE: 6,02).

Se observó una correlación ES ($p < 0,001$) de los valores de la IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina tanto con respecto a los valores de rPhi p 12 como a los de la rBet con una correlación de 0,83 (IC95% 0,67-0,91) y $R=0,82$ (IC 95% 0,66-0,91) respectivamente tal y como se muestra en las Figuras V-14 y V-15.

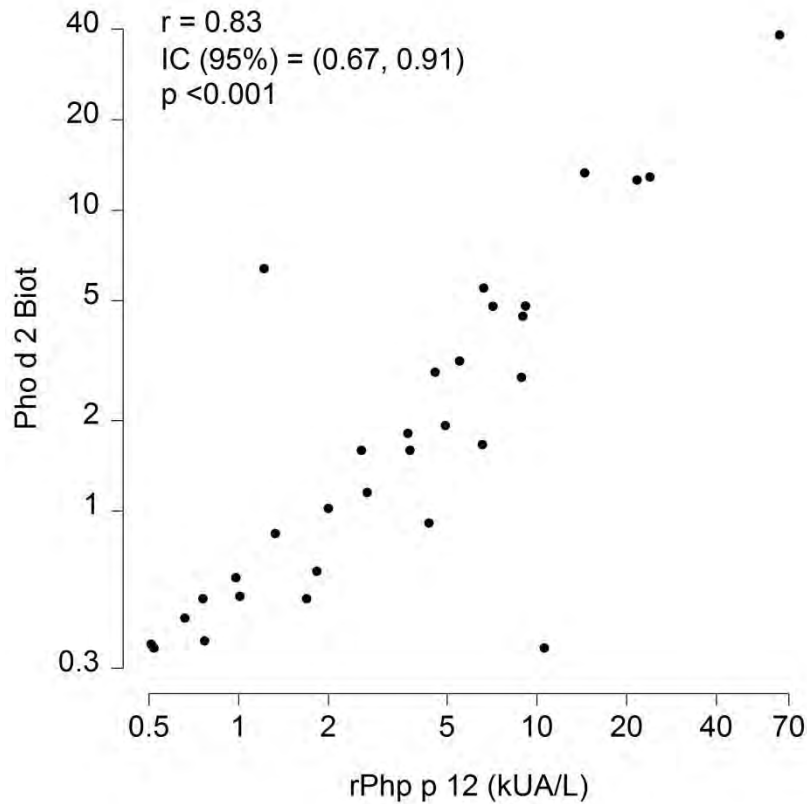


Figura V-14 Correlación IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina con rPhl p 12 medido por InmunoCAP® en los casos.

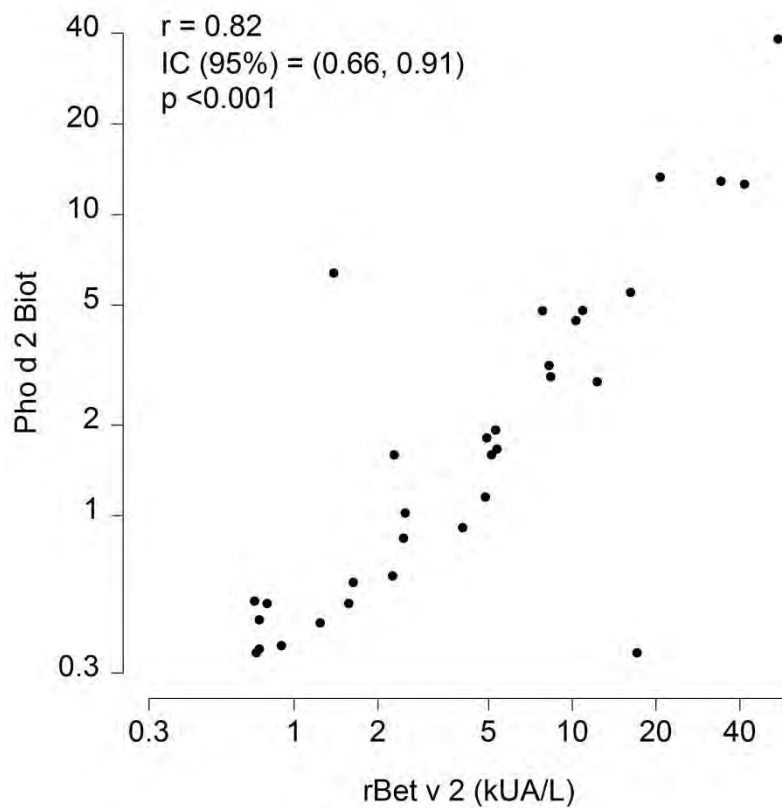


Figura V-15 Correlación IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina con rBet v2 medido por InmunoCAP® en los casos.

Se obtuvo una concordancia en términos cualitativos (presencia o no de IgE específica a profilina) con las pruebas realizadas en InmunoCAP® del 86,3% para rPhl p 12 y del 82,3% para rBet v 2. Si bien, no se detectó IgE específica a profilina Pho d 2 en ninguno de los pacientes en los que no se detectó IgE específica, para rPhl p 12 y/o rBet v 2 (los once casos comentados en la Tabla V-12). Además hubo otros 7 pacientes que resultaron positivos en la detección de IgE específica a rPhl p 12 y rBet v 2 que no se detectó IgE específica frente a Pho d 2 (Casos 5, 12, 15, 16, 24, 26 y 50)

Se realizó *immunoblot* con los sueros de todos los pacientes, observándose en 42 de los casos (82,4%) una banda en torno a 14 kDa tal y como está descrito para Pho d 2(118). Los resultados se muestran en las siguientes Figuras V-16 a V-19.

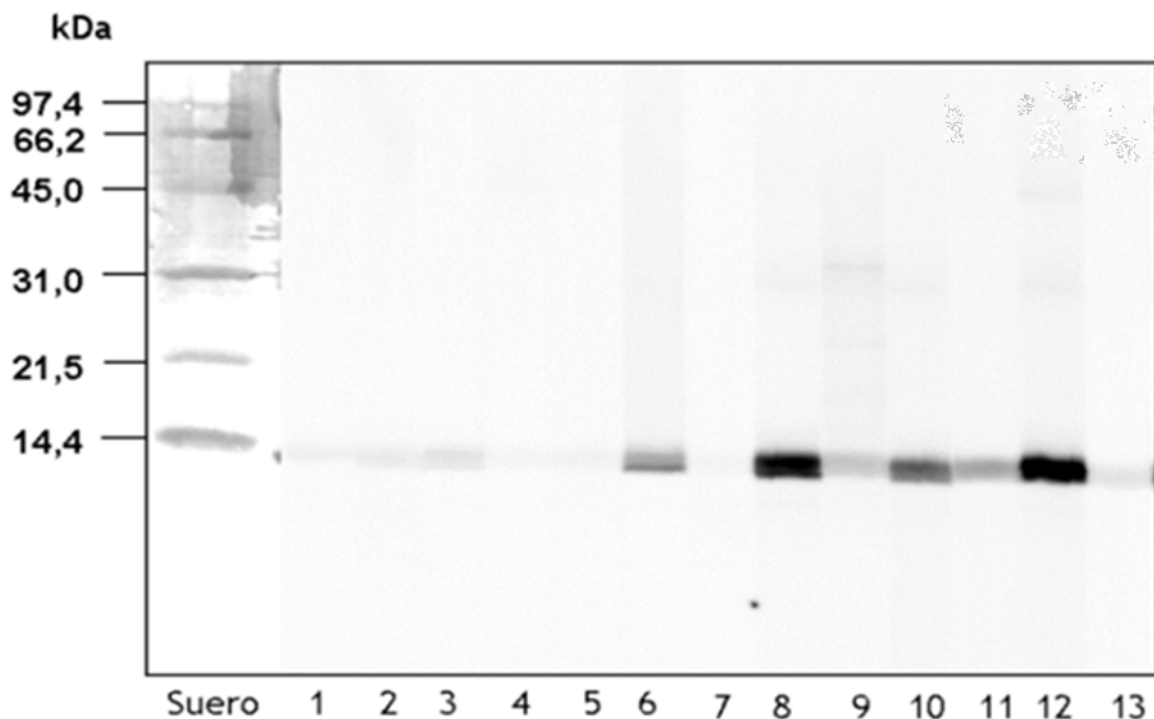


Figura V-16 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 1-13.

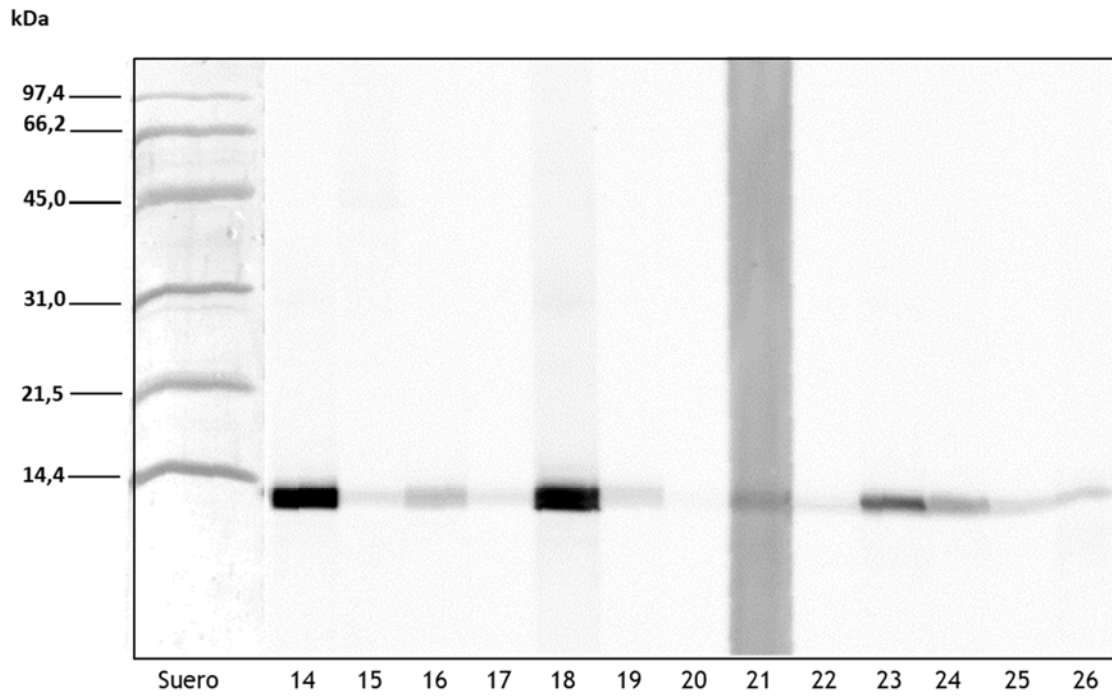


Figura V-17 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 14-26.

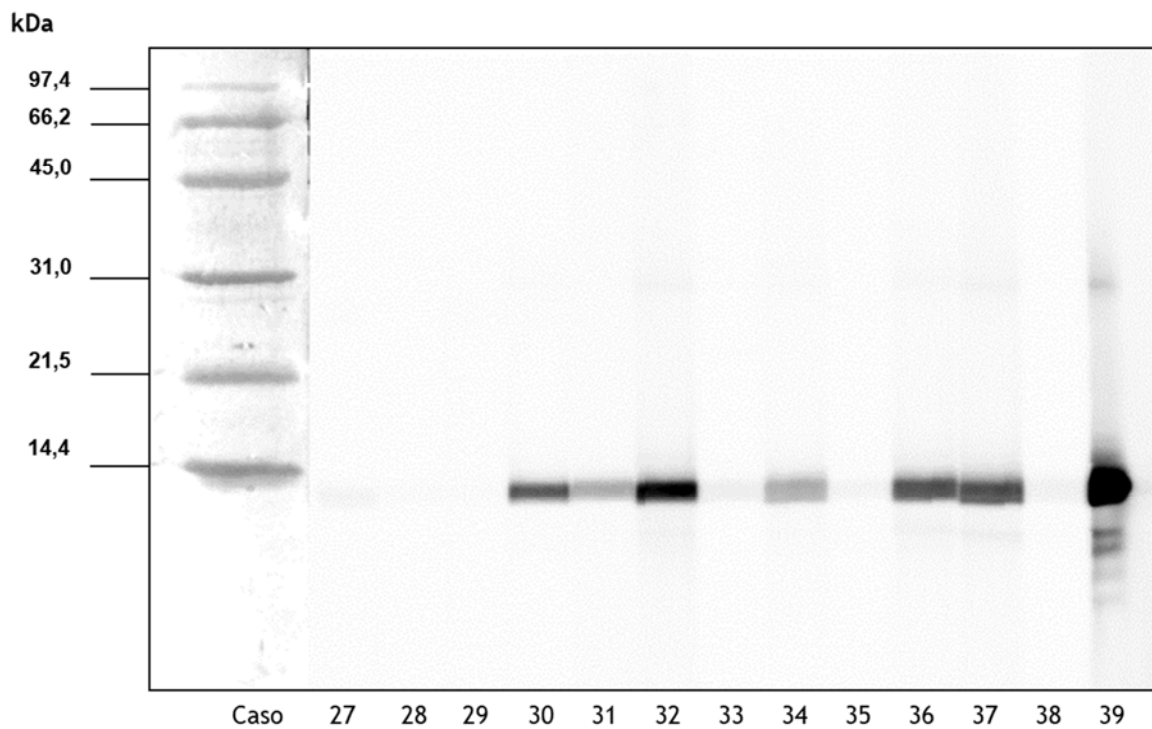


Figura V-18 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 27-39.

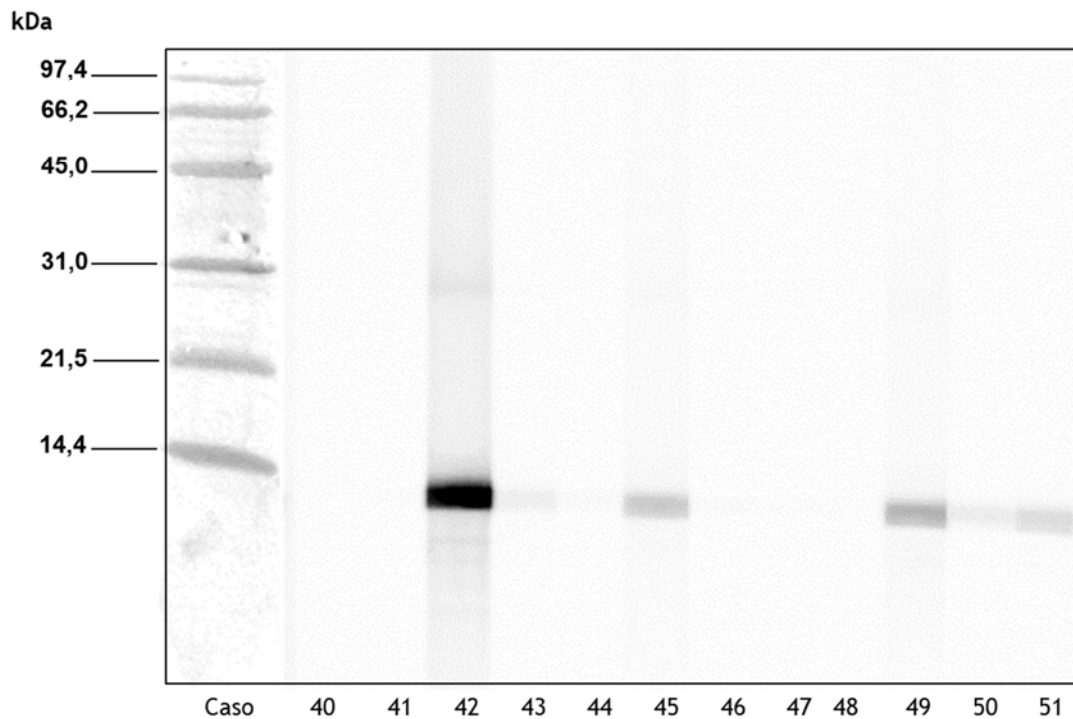


Figura V-19 Inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) 3µg/carril en fase sólida de casos 40-51.

En nuestro estudio también se encontró una relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre los resultados del inmunoblot con profilina purificada (Pho d 2) y las tres determinación séricas de profilina (rPhl p 12, rBet v 2 medidos por ImmunoCAP® e IgE específica frente a profilina Pho d 2 marcada con Biotina) tal y como se refleja en la Tabla V-14.

Variable	Negativo	Positivo	
rPhl p 12 (kUA/L)			<0.001
• Negativo	8 (100.0%)	3 (7.1%)	
• Positivo	0 (0.0%)	39 (92.9%)	
rBet v 2 (kUA/L)			<0.001
• Negativo	7 (87.5%)	1 (2.4%)	
• Positivo	1 (12.5%)	41 (97.6%)	
Pho d 2 Biot			<0.001
• Negativo	8 (100.0%)	10 (23.8%)	
• Positivo	0 (0.0%)	32 (76.2%)	

Tabla V-14 Correlación inmunoblot con rPhl p 12, rBet v 2 y Pho d 2,

En términos cualitativos esta técnica fue concordante con las anteriores. De forma que coincidió en 94,1 % tanto con rPhl p 12 como con rBet v 2 y en un 78,4 % con la profilina Pho d 2 marcada con biotina.

Hubo 7 de los casos (13,7%) en los que no se detectó IgE específica a profilina por ninguna de las 4 técnicas *in vitro* que se realizaron (casos: 28, 29, 40, 41, 44, 47 y 48).

Solo en los casos 20 y 35 que fueron negativos por *ImmunoCAP* se reconoció una banda en el inmunoblot aunque débil. Al contrario en el caso 46 fue negativo por inmunoblot y positivo a rBet v 2 pero con valores cercanos al límite de la positividad (0,37 kUA/L).

En las tablas V-15 y V-16 se muestra la concordancia entre los casos por las cuatro técnicas *in vitro* realizadas.

Nº de casos (% de casos)	rPhp p 12	rBet v 2	Pho d 2 Biot	Inmunoblot
rPhp p 12	51 (100%)	49 (96,1%)	44 (86,3%)	48 (94,1%)
rBet v 2	49 (96,1%)	51 (100%)	42, (82,3%)	48 (94,1%)
Pho d 2 Biot	44 (86,3%)	42 (82,3%)	51(100%)	40 (78,4%)
Inmunoblot	48 (94,1%)	48 (94,1%)	40 (78,4%)	51(100%)

Tabla V-15 Correlación cualitativa entre las técnicas de detección de IgE específica a profilina.

	rPhp p 12 (kUA/L)	rBet v 2 (kUA/L)	Pho d 2 Biot	Inmublot Pho d 2
Caso-1	0.51	0.75	0,36	POSITIVO
Caso-2	1.01	0.72	0,52	POSITIVO
Caso-3	0.76	0.8	0,51	POSITIVO
Caso-4	Negativo	0.36	Negativo	POSITIVO
Caso-5	0.57	0.71	Negativo	POSITIVO

Caso-6	1.83	2.26	0,63	POSITIVO
Caso-7	5.52	8.26	3,15	POSITIVO
Caso-8	2.7	4.88	1,15	POSITIVO
Caso-9	4.56	8.37	2,89	POSITIVO
Caso-10	3.7	4.93	1,81	POSITIVO
Caso-11	8.9	12.3	2,78	POSITIVO
Caso-12	0.57	0.65	Negativo	POSITIVO
Caso-13	6.57	5.37	1,66	POSITIVO
Caso-14	24	34.3	12,9	POSITIVO
Caso-15	0.5	0.36	Negativo	POSITIVO
Caso-16	5.11	7.63	Negativo	POSITIVO
Caso-17	1.69	1.57	0,51	POSITIVO
Caso-18	21.7	41.7	12,6	POSITIVO
Caso-19	2	2.51	1,02	POSITIVO
Caso-20	Negativo	Negativo	Negativo	POSITIVO
Caso-21	4.35	4.04	0,91	POSITIVO
Caso-22	Negativo	0.75	0,45	POSITIVO
Caso-23	9,18	10,9	4,8	POSITIVO
Caso-24	3.09	4.46	Negativo	POSITIVO
Caso-25	0.52	0.73	0,35	POSITIVO
Caso-26	1.92	1.81	Negativo	POSITIVO
Caso-27	0.77	0.9	0,37	POSITIVO
Caso-28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-30	7.13	7.83	4,78	POSITIVO
Caso-31	2.58	2.29	1,59	POSITIVO
Caso-32	8.99	10.3	4,44	POSITIVO
Caso-33	0.98	1.63	0,6	POSITIVO
Caso-34	4.94	5.31	1,92	POSITIVO
Caso-35	Negativo	Negativo	Negativo	POSITIVO
Caso-36	3.76	5.13	1,59	POSITIVO
Caso-37	6.64	16.2	5,5	POSITIVO
Caso-38	0.66	1.24	0,44	POSITIVO
Caso-39	14.5	20.7	13,3	POSITIVO
Caso-40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-42	65.3	55.1	38,2	POSITIVO
Caso-43	1,33	2,47	0,84	POSITIVO
Caso-44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-45	1.22	1.39	6,38	POSITIVO
Caso-46	Negativo	0.37	Negativo	Negativo

Caso-47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Caso-49	10.6	17.1	0,35	POSITIVO
Caso-50	1.26	1.64	Negativo	POSITIVO
Caso-51	2.52	5.97	Negativo	POSITIVO

Tabla V-16 Resultados de técnicas *in vitro*.

Por otra parte, en ninguno de los sueros de los pacientes controles se detectó ninguna banda en el inmunoblot. Tampoco se detectó IgE específica a rPhl p 12, rBet v 2 ni a Pho d 2 marcada con biotina en ninguno de los controles.

Por último, la mediana de IgE total de los casos en la inclusión fue de 264 KU/L, siendo significativamente superior a los controles (91 KU/L) $p = 0.002$.

V.4 Estudios *in vivo*

V.4.1 Pruebas cutáneas

El valor medio del tamaño de las pápulas del prick a profilina de los pacientes sensibilizados a profilina fue de 32.9 ± 23.1 mm².

El 100 % de los casos y el 100% de los controles estaban sensibilizados a algún polen. Los epitelios de animales fueron los siguientes alérgenos con mayor frecuencia de sensibilización en las pruebas cutáneas, 56,47%, (58,18% de los casos y 53,33% de los controles, diferencias no ES ($p=1$)) En el caso de los ácaros fueron 28,23 % los pacientes sensibilizados, 27,27% de los casos y 20% de los controles sin que estas diferencias fueran ES ($p=1$). El 21,18 % de los pacientes estaban sensibilizados a hongos, sin que hubiera una diferencia entre los casos y controles (21,81% y 20% respectivamente ($p=0,98$)). El 58% de los casos y el 53 % de los controles estaba sensibilizado a epitelios, sin que esta diferencia fuera ES ($p=0,84$)(Tabla V-17).

	Casos		Controles		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pólenes	55	100	30	100	85	100
Hongos	12	21,81	6	20	18	21,18
Ácaros	15	27,27	9	30	24	28,23
Epitelios	32	58,18	16	53,33	48	56,47

Tabla V-17 Resultados pruebas cutáneas a grupos de inhalantes.

Las pruebas cutáneas que fueron positivas en mayor porcentaje de pacientes fueron *Secale* (95,29%) *Lolium* (94,12%) mezcla de gramíneas 92,94% seguidos del *Olea* (83,53%), *Cynodon* (78,82%), *Platanus* (56,47%) *Cupressus* (55,29 %) (Tabla V-18).

La sensibilización a algunos pólenes demostrada por prueba cutánea en prick fue significativamente superior en los casos que en los controles, como fue el caso de *Cynodon*, ($p < 0.001$). *Platanus* ($p < 0.001$) y *Parietaria* ($p < 0.03$).

El epitelio más frecuentemente encontrado fue el epitelio de perro (51%) seguido del gato (36,47%) sin que hubiera diferencias ES entre los casos y los controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en casos y controles (Tabla V-18).

La *Alternaria* fue el hongo que fue más veces positivo en las pruebas cutáneas (20% seguidos de *Aspergillus* (5,88%) y *Cladosporium*, solo en 3 pacientes, sin que hubiera diferencias ES entre los casos y los controles (Tabla V-18).

El caso de los ácaros fue el *D. farinae* el que presentó más positividad en las pruebas cutáneas seguidas del *L. destructor* y el *D. pteronnysinus* (20%, 17,65% y 12,94% respectivamente) Sin que se encontrasen diferencias ES entre casos y controles (Tabla V-18).

	Casos		Controles		Total		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Gramíneas mezcla	51	92,73	28,00	93,33	79,00	92,94	1.000
<i>Lolium</i>	52	94,55	28,00	93,33	80,00	94,12	1.000
<i>Secale</i>	53	96,36	28,00	93,33	81,00	95,29	0.611
<i>Cynodon</i>	50	90,91	17,00	56,67	67,00	78,82	0.001
<i>Olea</i>	47	85,45	24,00	80,00	71,00	83,53	0.551
<i>Cupressus</i>	32	58,18	15,00	50,00	47,00	55,29	0.555
<i>Platanus</i>	43	78,18	5,00	16,67	48,00	56,47	0.000
<i>Parietaria</i>	12	21,82	1,00	3,33	13,00	15,29	0.028
<i>Salsola</i>	28	50,91	9,00	30,00	37,00	43,53	0.103
<i>Alternaria</i>	11	20,00	6,00	20,00	17,00	20,00	1.000
<i>Aspergillus</i>	4	7,27	1,00	3,33	5,00	5,88	0.652
<i>Cladosporium</i>	2	3,64	1,00	3,33	3,00	3,53	1.000
<i>D. pteronn.</i>	6	10,91	5,00	16,67	11,00	12,94	0.508
<i>D. farinae</i>	10	18,18	7,00	23,33	17,00	20,00	0.777
<i>Lepidogl.</i>	8	14,55	7,00	23,33	15,00	17,65	0.473
Perro	29	52,73	15,00	50,00	44,00	51,76	0.989
Gato	21	38,18	10,00	33,33	31,00	36,47	0.835

Tabla V-18 Resultados pruebas cutáneas a alérgenos.

En nuestra muestra, el 88,2 % de los pacientes (75) presentaban sensibilización a 3 o más inhalantes, Esta polisensibilización era del 94,5 % en los casos y del 76,7% de los controles, siendo esta diferencia ES ($p = 0.029$) (Tabla V-19).

Polisensibilizados Inhalantes			
	Sí	No	Total
Casos	52	3	55
Controles	23	7	30
Total	75	10	85

Tabla V-19 Polisensibilizados a Inhalantes.

El número de sensibilizaciones a inhalantes fue mayor en los casos que en los controles de forma ES ($p = 0.029$). La mediana de número de sensibilizaciones en los casos fue de 5 y en los casos de 4 (Tabla V-20 y Figura V-20).

Nº Sensib	N	Media	Mediana	DE
Casos	55	5,53	5	2,26
Controles	30	4,47	4	2,389

Tabla V-20 Media y mediana de sensibilizaciones a inhalantes en casos y controles.

En la siguiente tabla podemos encontrar las frecuencias de sensibilizaciones de los casos y controles, encontrándose de nuevo diferencias ES ($p = 0.039$)

	Nº sensibil pólenes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Casos	Frecuencia	2	1	8	10	7	7	10	4	4	1	1
	Porcentaje	3,63	1,81	14,54	18,18	12,72	12,7	18,18	7,27	7,27	1,82	1,82
Controles	Frecuencia	3	4	2	9	3	4	2	1	1		1
	Porcentaje	10	13,33	6,67	30	10	13,33	6,67	3,33	3,33	0	3,33

Tabla V-21 Número de sensibilizaciones a inhalantes en casos y controles.

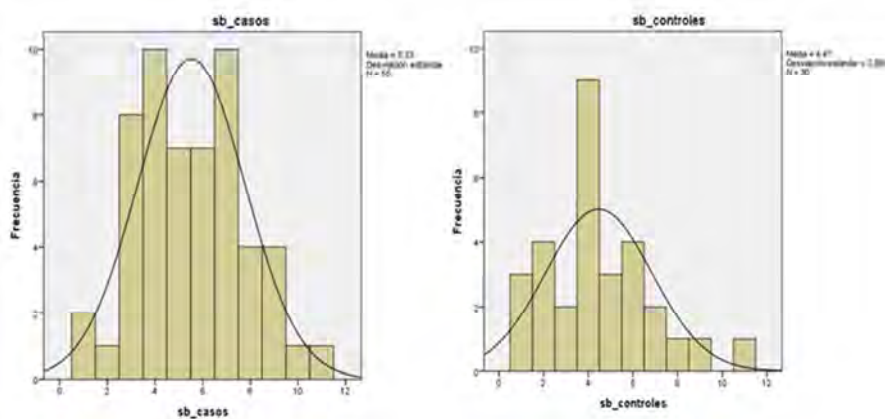
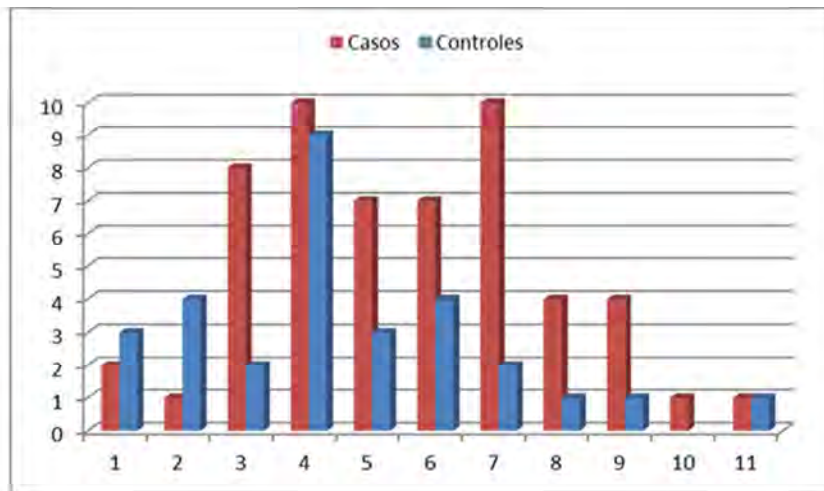


Figura V-20 Histograma de sensibilizaciones a inhalantes de casos y controles.

Quando analizamos exclusivamente las sensibilizaciones a pólenes, encontramos que el 74,12% de los pacientes presentaba polisensibilización a 3 o más pólenes. En este caso sí encontramos diferencias ES ($p < 0.001$) ya que en los casos la polisensibilización fue del 87,3 % mientras que en los controles se encontró un 50% de pacientes sensibilizados a 3 o más pólenes (Tabla V-22).

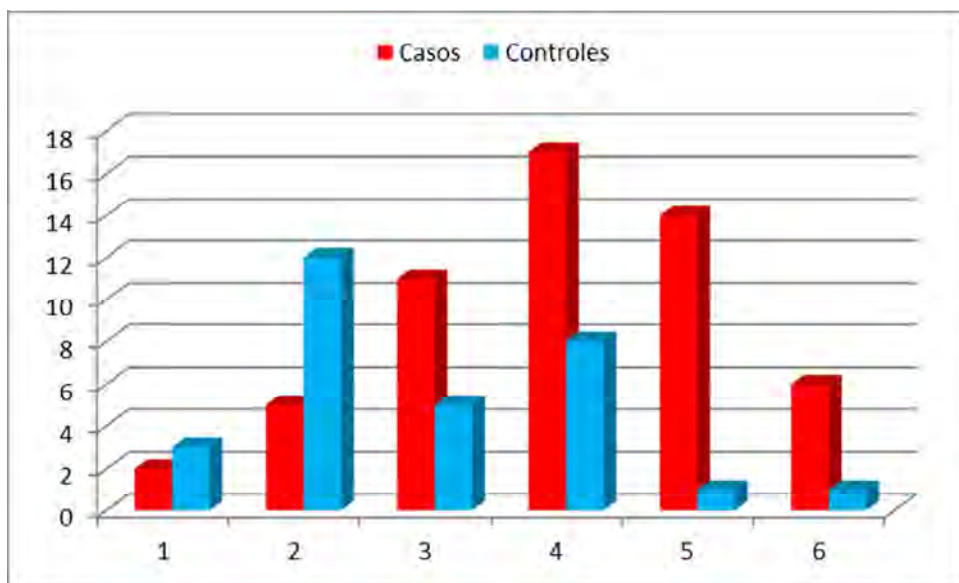
Polisensibilizados Pólenes			
	Sí	No	Total
Casos	48	7	55
Controles	15	15	30
Total	63	22	85

Tabla V-22 Polisensibilización a pólenes en casos y controles.

El número de sensibilizaciones también fue mayor en los casos de forma ES ($p < 0.001$) según se refleja en la Tabla V-23 y Figura V-21. La mediana de sensibilizaciones a pólenes fue de 4 en los casos y de 2,5 en los controles.

	Nº sensibilizaciones	1	2	3	4	5	6	Total	Media	Mediana	DE
Casos	Frecuencia	2	5	11	17	14	6	55	3,98	4,00	1,27
	Porcentaje	3,6	9,1	20,0	30,9	25,5	10,9	100			
Controles	Frecuencia	3	12	5	8	1	1	30	2,83	2,50	1,23
	Porcentaje	10	40	16,7	26,7	3,3	3,3	100			

Tabla V-23 Número de sensibilizaciones a pólenes en casos y controles.



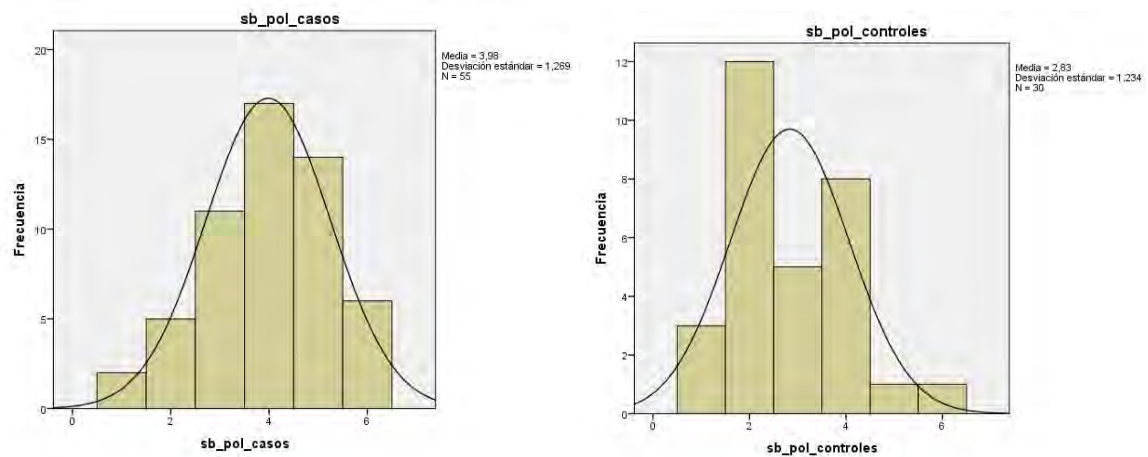


Figura V-21 Histogramas de sensibilizaciones a pólenes de casos y controles

En el caso de las pruebas cutáneas con extractos de alimentos el 42, 35 % de los pacientes presentaron positividad para algún alimento (58,18% de los casos y 13,33 % de los controles) siendo esta diferencia ES. Las frutas fueron los alimentos que fueron positivos de forma más frecuente, siendo el 52,72% de los casos y el 13,33 % de los controles. ($p < 0.01$). Según se refleja en la Tabla V-24.

		Alimentos	Frutas	Frutos secos	Otros vegetales	Otros alimentos
Casos	Frecuencia	32	29	5	4	1
	Porcentaje	58,18	52,72	5,1	7,27	1,82
Controles	Frecuencia	4	4	1	0	0
	Porcentaje	13,33	13,33	3,33		
Total	Frecuencia	36	33	6	4	1
	Porcentaje	42,35	38,82	7,06	4,7	1,18

Tabla V-24 Frecuencia de alergia a alimentos.

El alimento que resultó positivo en mayor frecuencia en los casos fue el melón (50,91% de los casos) seguido de la piel de melocotón 10,91% y el aguacate 9,09 %. En el caso de los controles el alimento que demostró más positividad fue la piel de melocotón (10%) seguido del kiwi (6,67 %). El resto de frecuencias de sensibilización cutánea se pueden ver en la Tabla V-25. La diferencias en las sensibilizaciones en casos y controles solo fueron ES en el caso del melón.

	Casos		Controles		Total		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Melocotón Piel	6	10,91	3	10,00	9	10,59	1.000
Melocotón Pulpa	3	5,45	1	3,33	4	4,71	1.000
Manzana Piel	4	7,27	1	3,33	5	5,88	0.654
Manzana Pulpa	3	5,45	0	0	3	3,53	0.548
Ciruela	3	5,45	1	3,33	4	4,71	1.000
Naranja	1	1,82	1	3,33	2	2,35	1.000
Melón	28	50,91	1	3,33	29	34,12	0.000
Plátano	1	1,82	1	3,33	2	2,35	1.000
Kiwi	3	5,45	2	6,67	5	5,88	1.000
Aguacate	5	9,09	1	3,33	6	7,06	0.659
Higo	1	1,82	1	3,33	2	2,35	1.000
Sandía	2	3,64	0	0	2	2,35	0.542
Tomate	2	3,64	0	0	2	2,35	0.5421
Cacahuete	4	7,27	1	3,33	5	5,88	0.654
Almendra	1	1,82	1	3,33	2	2,35	1.000
Avellana	3	5,45	1	3,33	4	4,71	1.000
Nuez	1	1,82	1	3,33	2	2,35	1.000
Pistacho	2	3,64	1	3,33	3	3,53	1.000
Castaña	2	3,64	0	0	2	2,35	0.542
Piñón	2	3,64	0	0	2	2,35	0.542
Pipa de girasol	1	1,82	0	0	1	1,18	1.000
Judía blanca	1	1,82	0	0	1	1,18	0.542
Garbanzo	2	3,64	0	0	2	2,35	0.542
Calamar	1	1,82	0	0	1	1,18	1.000
Mejillón	1	1,82	0	0	1	1,18	1.000
Gamba	1	1,82	0	0	1	1,18	1.000

Tabla V-25 Sensibilización a alimentos en casos y controles.

La prueba cutánea con extracto de látex fue positiva en 5 pacientes (5,88 %) 4 casos y 1 control (7,27% y 3,33 % respectivamente) Diferencias no ES (0.654).

Las pruebas cutáneas con panalérgenos fueron positivas en el 8,24 % para LTP y en 22, 35 % para la polcalcina. Encontrándose diferencias en la distribución de casos y controles tal y como se reflejan en la Tabla V-26 que fueron significativas para el caso de la polcalcina (p=0.005) pero no para la LTP (p=0.413).

		LTP	Polcalcina
Casos	Frecuencia	6	18
	Porcentaje	10,91	32,73
Controles	Frecuencia	1	1
	Porcentaje	3,33	3,33
Total	Frecuencia	7	19
	Porcentaje	8,24	22,35

Tabla V-26 Sensibilización a panalérgenos en casos y controles.

Relacionamos la clínica de síndrome de alergia oral con frutas de los casos con las pruebas cutáneas realizadas en esos pacientes, observando que la prueba cutánea con extracto de melón tenía una baja sensibilidad y especificidad para SAO por melón (56% y 54 % respectivamente), El resto de valores de sensibilidad y especificidad para las frutas que con más frecuencia produjeron Síndrome de alergia oral se reflejan en la Tabla V-27.

Melón	SAO Sí	SAO no	Total	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
PC +	23	5	28	0,56	0,54	0,82	0,84
PC -	18	9	27				
Total	41	14	55				
				Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Sandía	SAO Sí	SAO no	Total	0,1	0,94	1	1
PC +	2	0	2				
PC -	18	35	53				
Total	20	35	55				
				Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Kiwi	SAO Sí	SAO no	Total	0	1	0	0,93
PC +	0	3	3				
PC -	12	40	52				
Total	12	43	55				
				Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Piel Meloc.	SAO Sí	SAO no	Total	0,1	0,97	0,17	0,89
PC +	1	5	6				
PC -	9	40	49				
Total	10	45	55				
				Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Pulpa Meloc.	SAO Sí	SAO no	Total	0,1	0,97	0,33	0,95
PC +	1	2	3				
PC -	9	43	52				
Total	10	45	55				
				Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Plátano	SAO Sí	SAO no	Total	0	1	0	0,97
PC +	0	1	1				
PC -	10	44	54				
Total	10	45	55				

Tabla V-27 Medidas de validez de alergia a frutas y síndrome de alergia oral.**V.4.2 Prueba de provocación conjuntival.**

Se realizó la prueba de provocación conjuntival con profilina Pho d 2 purificada en un subgrupo de pacientes, en 10 casos y en 5 controles.

La prueba fue positiva en 9 de los 10 casos y negativa en los 5 controles. Los resultados se muestran en la Tabla V-28.

Pacientes	Resultado de la Prueba	Concentración final	Puntuación Final	Efectos Adversos
Caso-13	Positiva	3	22	E,R, PP, POC,
Caso-15	Positiva	0,3	9	POC
Caso-20	Positiva	0,03	5	No
Caso-27	Positiva	1,5	11	E
Caso-31	Negativa	3*	0	No
Caso-33	Positiva	0,3	8	POC, E
Caso-34	Positiva	0,3	7	E, R
Caso-38	Positiva	0,3	8	No
Caso-39	Positiva	0,3	8	No
Caso-46	Positiva	1,5	13	No
Control-6	Negativa	3*	2	POC
Control-7	Negativa	3*	2	No
Control-8	Negativa	3*	0	No
Control-13	Negativa	3*	0	N
Control-25	Negativa	3*	3	No

Tabla V-28 Prueba de provocación conjuntival con Profilina Pho d 2 purificada. (*: No produjo una respuesta positiva; E: estornudos, R: rinorrea, PP prurito palatino, POC: prurito en ojo contralateral)

Las concentraciones de Profilina Pho d 2 a las que se produjo el resultado positivo en los 9 pacientes positivos se reflejan en la Figura V-22.

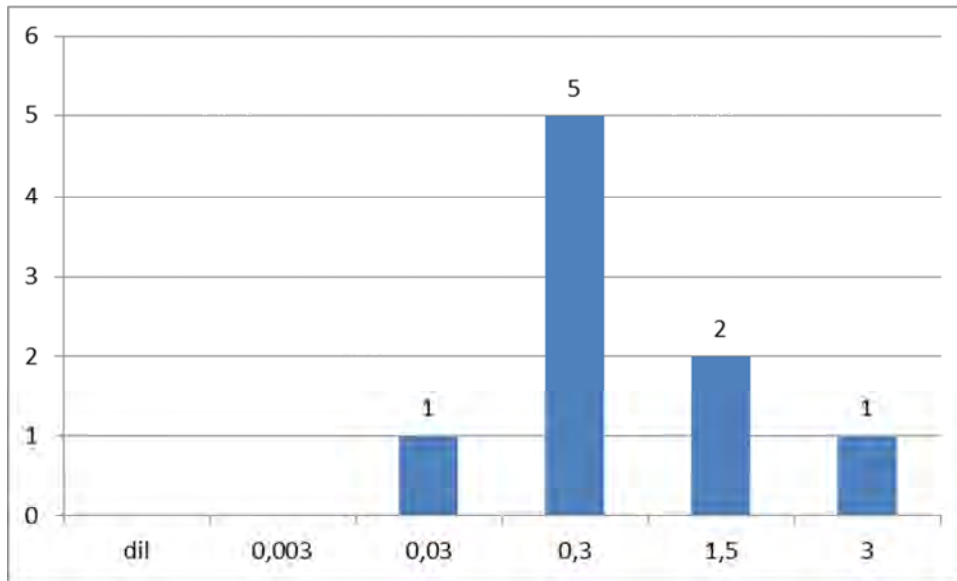


Figura V-22 Concentración de Profilina Pho d2 a la que se produjo el resultado positivo en los 9 casos positivos.

La puntuación de los pacientes en cada una de las valoraciones se refleja en la Tabla V-29.

	Prurito	Irritación	Enrojecimiento	Lagrimeo	Puntuación total
Caso-13	13	3	3	3	22
Caso-15	4	2	3	0	9
Caso-20	2	0	2	1	5
Caso-27	7	0	2	2	11
Caso-31	0	0	0	0	0
Caso-33	4	2	2	0	8
Caso-34	3	2	2	0	7
Caso-38	4	0	4	0	8
Caso-39	3	3	2	0	8
Caso-46	8	1	3	1	13
Control-6	2	0	0	0	2
Control-7	1	1	0	0	2
Control-8	0	0	0	0	0
Control-13	0	0	0	0	0
Control-25	0	0	2	0	3

Tabla V-29 Puntuación en prueba de provocación conjuntival con Pho d 2 purificada.

La media de puntuación de síntomas en la provocación conjuntival con Pho d 2 purificada en casos y en controles fue ES ($p < 0.01$) se refleja en Figura V-23.

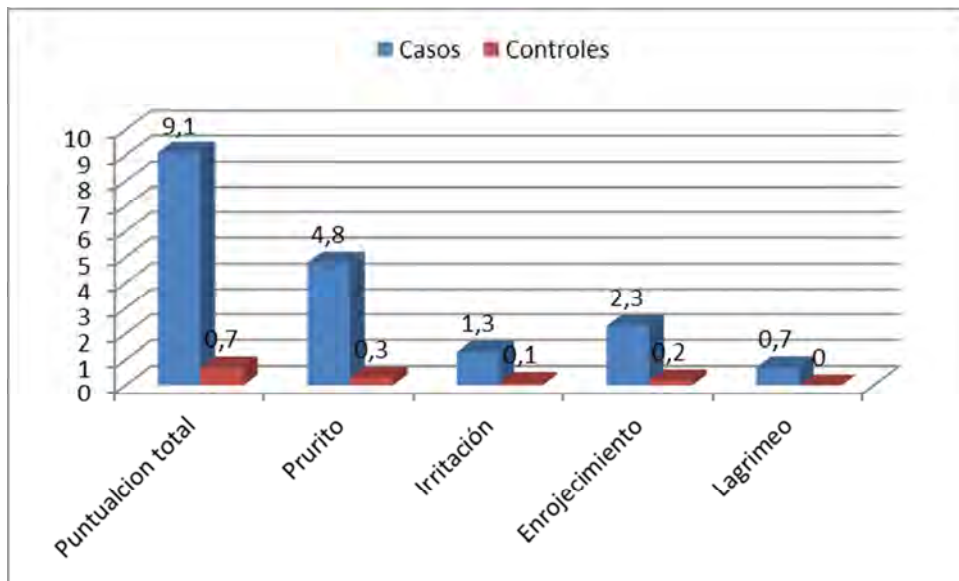


Figura V-23 Media de puntuación de síntomas en provocación conjuntival con Pho d2 purificada.

Además, en algunos pacientes, 5 controles (50%) y en 1 caso (20%) se produjeron efectos adversos tales como síntomas nasooculares, prurito ocular bilateral y prurito palatino, tras la prueba de provocación conjuntival con Pho d 2 purificada. Ninguno de los pacientes presentó síntomas respiratorios con la prueba (Figura V-24).

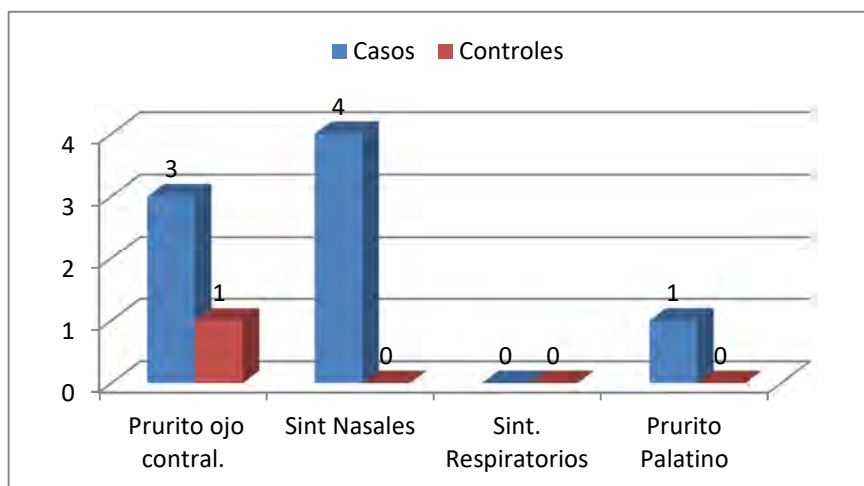


Figura V-24 Efectos adversos con prueba de provocación conjuntival con Pho d 2 purificada.

V.4.3 Prueba de provocación bronquial específica.

Se realizó prueba de provocación bronquial específica (PPBE) con profilina de palmera Pho d 2 purificada en un subgrupo de pacientes, de forma que se realizó la PPBE en 20 casos y en 10 controles.

Los resultados de la PPBE con extracto de profilina Pho d 2 purificada se muestran en la Tabla V-30 para controles y Tabla V-31 para casos.

Casos	FEV1 basal (L)	FEV1 post-diluyente (L)	FEV1 Final (L)	Descenso del FEV1 (%) con respecto a basal	Última concentración de profilina (mcg/ml)	PC20 (mcg/ml)	Resultado de la prueba	Síntomas adicionales
Caso-2	3,38	3,51	2,62	25,4	5	7,48	Positivo	ON, RA, E, D, T
Caso-3	1,87	1,78	1,27	28,7	5	6,33	Positivo	n
Caso-12	3	3,01	2,35	21	10	18,67	Positivo	D, PB, T
Caso-13	3,14	3,02	2,17	28,1	5	7,32	Positivo	n
Caso -15	2,62	2,59	2,44	5,8	20		Negativo	n
Caso-16	2,64	2,31	1,67	27,7	2,5	3,24	Positivo	ON, RA, E
Caso-17	2,35	2,34	1,84	21,4	0,31	0,43	Positivo	T, N
Caso-21	2,86	2,9	2,09	28	10	12,86	Positivo	ON
Caso-22	2,94	2,99	2,26	24,4	1,21	1,46	Positivo	E, SO
Caso-24	3,14	3,19	2,55	20,1	20	39,36	Positivo	n
Caso-26	4,25	4,33	3,46	20	10	19,77	Positivo	E, D, PB
Caso-27	3,02	3,07	2,16	29,7	20	26,96	Positivo	PB
Caso-31	4,15	4,07	3,13	23,1	2,5	2,98	Positivo	n
Caso-32	3,35	3,36	2,44	27,4	2,5	3,45	Positivo	n
Caso-33	3,17	3,02	1,94	35,8	1,25	1,27	Positivo	ON, RA, E, SO
Caso-34	2,38	2,27	1,75	26,5	2,5	3,96	Positivo	PB, C

Caso-35	4,14	4,11	3,22	21,7	20	34,99	Positivo	E
Caso-38	2,61	2,55	2	21,6	1,25	2,13	Positivo	n
Caso-48	3,25	3,21	2,44	24	1,25	1,19	Positivo	ON, RA, E
Caso-51	3,96	3,93	2,94	25,2	5	6,65	Positivo	n
Media (DE)	3,111 (DE: 0,64)	3,078 (DE: 0,68)	2,337 (DE: 0,55)	24,28 (DE: 5,85)	Mediana: 5 mcg/ml	10,55 (DE: 11,87)		

Tabla V-30 PPBE con Profilina de palmera Pho d 2 purificada en casos. Ninguno (n), obstrucción nasal (ON), Rinorrea acuosa (RA), Estornudo (E), Tos (T), Disnea (D), náuseas (N), mareo (M), síntomas oculares (SO), prurito en boca, labios y/o faringe (PB).

Controles	FEV1 Basal (L)	FEV1 post-diluyente(L)	FEV1 Final (L)	Descenso del FEV1 (%) con respecto a basal	Última concentración de profilina (mcg/ml)	Dosis Total acumulada	Resultado	Síntomas adicionales
Control-03	3,12	3,04	2,87	5,6	20	39,83	Negativo	n
Control-04	3,66	3,7	3,43	7,3	20	39,83	Negativo	AM
Control-08	3,88	3,71	3,71	0	20	39,83	Negativo	n
Control-11	2,69	2,79	2,8	0,3	20	39,83	Negativo	n
Control-12	3,46	3,39	3,27	5,4	20	39,83	Negativo	n
Control-13	4,07	4,11	3,83	7,8	20	39,83	Negativo	n
Control-15	2,59	2,51	2,5	0,4	20	39,83	Negativo	n
Control-23	3,78	3,8	3,32	12,2	20	39,83	Negativo	n
Control-25	2,78	2,52	2,34	7,2	20	39,83	Negativo	n
Control-28	4,25	4,11	3,92	4,4	20	39,83	Negativo	n
Media (DE)	3,428 (DE: 0,6)	3,368 (DE: 0,61)	3,199 (DE: 0,552)	5,06 (DE: 3,93)				

Tabla V-31 PPBE con Profilina de palmera Pho d 2 purificada en controles. Ninguno (n), Aumento de la Mucosidad (AM)

En las Tablas V-32 y V-33 se describen y se comparan los valores que tomaron las variables espirométricas en los grupos de casos y controles. Las variables se describieron mediante la media y la desviación estándar. Los valores FEV1 se compararon mediante la prueba de la t de Student, mientras que los porcentajes de descenso se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney debido a la falta de normalidad de los datos.

No existieron diferencias ES entre la FEV1 Basal y tras diluyente de los pacientes sensibilizados a profilina y los controles (Tabla V-32).

	Controles		Casos		
Variable	Media	DE	Media	DE	Valor p
FEV1 basal	3,428	0,599	3,111	0,640	0.203
FEV1 tras diluyente	3,368	0,616	3,078	0,676	0.264

Tabla V-32 FEV1 basal y tras diluyente.

Tras la realización de la PPBE con profilina en el grupo de casos, el FEV1 final presentó una media de 2,337 litros (DE 0.55) lo que supone un descenso de 24,28 % (DE 5,85). Mientras que en el grupo de los controles el FEV1 final fue de 3,199 (DE 0.552) con un descenso de 5,06 % (DE 3,93). Por tanto, esta comparación mostró una diferencia ES ($p < 0.001$) tanto en la FEV1 final como en el % de descenso en los dos grupos (Tabla V-33).

	Controles		Casos		
Variable	Media	DE	Media	DE	Valor p
FEV1 final (L)	3,199	0,552	2,337	0,55	<0.001
% de descenso	5,06	3,93	24,28	5,85	<0.001

Tabla V-33 FEV1 finales y porcentaje de descenso tras PPBE.

En la Figura V-25 se muestran los porcentajes de caída del FEV1 tras la realización de la PPBE con profilina, de cada uno de los casos tras la PPBE ordenados de menor a mayor concentración.

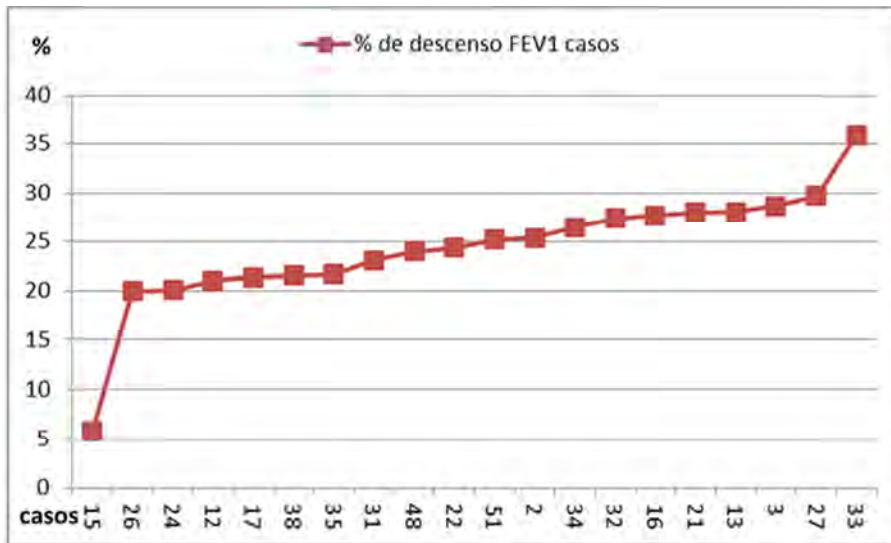


Figura V-25 Porcentaje de descenso del FEV1 de los casos tras la PPBE con profilina

Las concentraciones finales de profilina que produjeron un descenso del FEV1 mayor del 20% presentaron una mediana de 5 mcg/ml. La distribución de estas concentraciones se puede ver en las Figuras V-25 y V26.

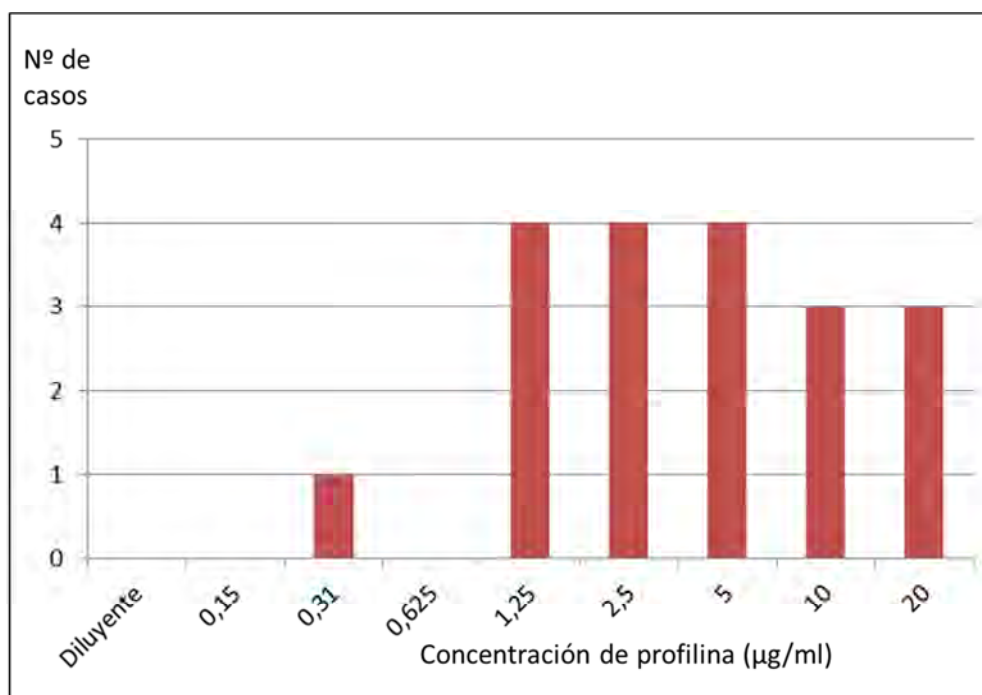


Figura V-26 Nº de casos positivos en cada una de las concentraciones finales de profilina.



Figura V-27 Concentraciones de profilina que produjeron un resultado positivo por cada paciente.

La PC20 de las PPBE con Profilina en los casos tuvo una Mediana de 6,33 µg/mL, una media de 10,55 µg/mL con una DE de 11,87. Con un rango entre 0,43 µg/mL y 39,36 µg/mL. Los resultados de la PC20 por paciente se pueden ver en la Tabla V-34 y Figura V-28.

	PC20 (µg/ml)
Caso-2	7,48
Caso-3	6,33
Caso-12	18,67
Caso-13	7,32
Caso-16	3,24
Caso-17	0,43
Caso-21	12,86
Caso-22	1,46
Caso-24	39,36

Caso-26	19,77
Caso-27	26,96
Caso-31	2,98
Caso-32	3,45
Caso-33	1,27
Caso-34	3,96
Caso-35	34,99
Caso-38	2,13
Caso-48	1,19
Caso-51	6,65
Media	10,55
Mediana	6,33
DE	11,87

Tabla V-34 PC20 tras PPBE con profilina.

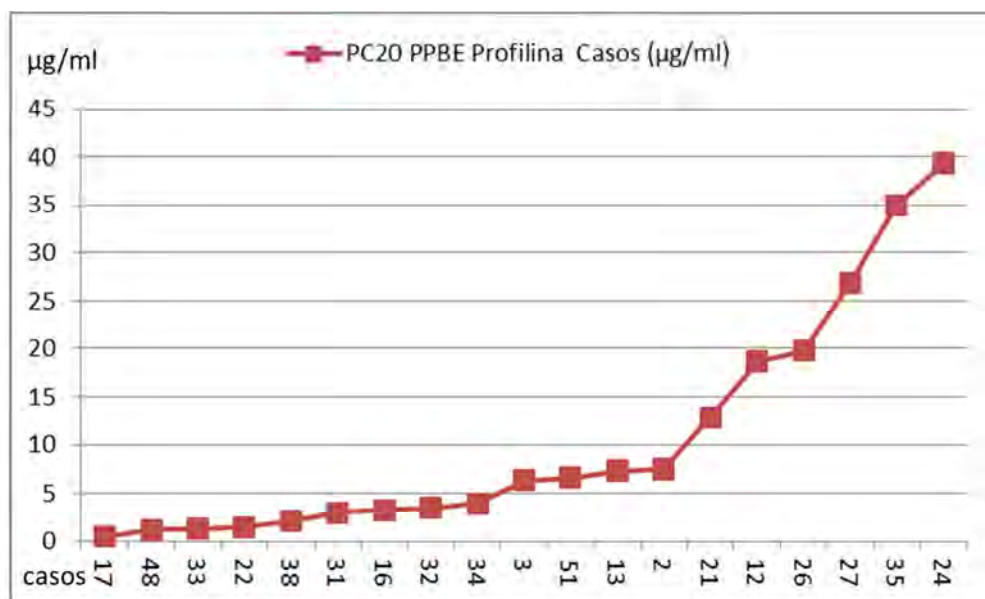


Figura V-28 PC20 en cada uno de los casos en orden creciente.

Por lo tanto el resultado de la PPBE con profilina fue positiva en 19 de los casos (95 %) y negativa en el 100% de los controles (Tabla V-35 y Figura V-29).

	Positiva	Negativa	Total
Casos	19	1	20
Controles	0	10	10
Total	19	11	30

Tabla V-35 Resultado de la PPBE con Profilina.

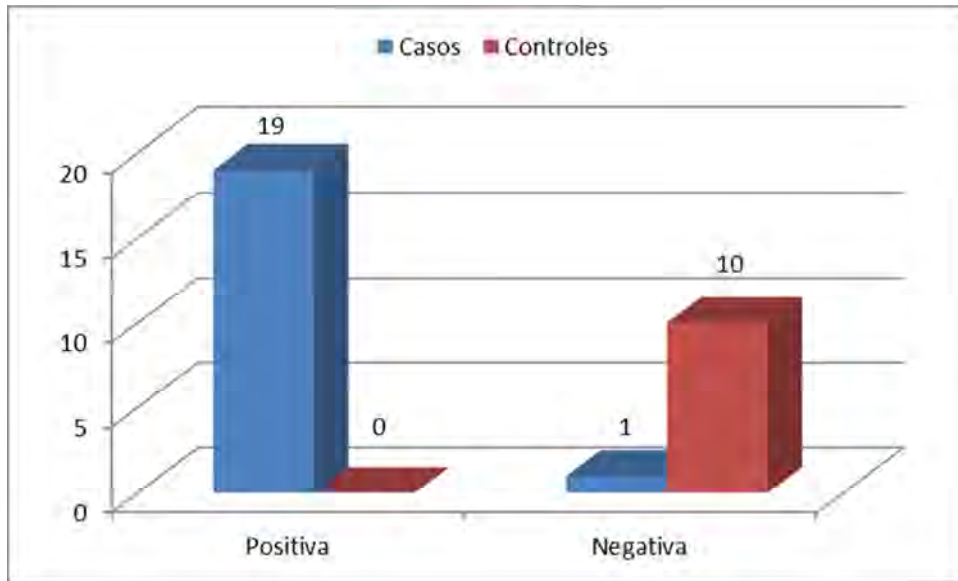


Figura V-29 Resultado de la PPBE con Profilina en casos y controles.

Para comparar las frecuencias de resultados negativos y positivos en casos y controles se aplicó la prueba de Chi-cuadrado que nos dio un valor p muy inferior a 0.001, por lo que se puede decir que el resultado positivo de la prueba se asocia con los casos y el negativo con los controles.

Además el 60 % de los casos (12 casos) presentaron síntomas adicionales durante la PPBE con profilina (Figura V-30). Uno de los controles (10%) presentó aumento de la mucosidad nasal.

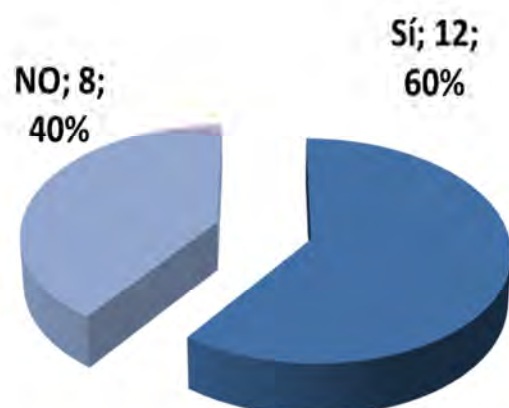


Figura V-30 Síntomas adicionales entre los casos tras la PPBE con profilina.

Los síntomas adicionales que presentó cada uno de los pacientes se pueden ver en la Tabla V-36.

Caso-2	Obstrucción nasal, Rinorrea acuosa, Estornudos, Disnea y Tos
Caso-3	Ninguno
Caso-12	Disnea, tos, prurito bucal y palatino
Caso-13	Ninguno
Caso -15	Ninguno
Caso-16	Obstrucción nasal, rinorrea acuosa y estornudos
Caso-17	Tos en accesos y nauseas
Caso-21	Obstrucción nasal
Caso-22	Estornudos y síntomas oculares
Caso-24	Ninguno
Caso-26	Estornudos, Disnea y Prurito bucal y palatino
Caso-27	Prurito bucal y faríngeo
Caso-31	Ninguno
Caso-32	Ninguno
Caso-33	Obstrucción nasal, estornudos, rinorrea acuosa y síntomas oculares

Caso-34	Prurito bucal y palatino, Tos
Caso-35	Estornudos en salva
Caso-38	Ninguno
Caso-48	Obstrucción nasal, Rinorrea acuosa y estornudos
Caso-51	Ninguno

Tabla V-36 Síntomas adicionales tras la PPBE en cada uno de los pacientes.

Los síntomas adicionales más frecuentes tras la PPBE con profilina fueron los estornudos que estuvieron presentes en 7 de los casos (35 % de todas las PPBE en los casos) seguidas de la obstrucción nasal en 5 (25 %) y rinorrea acuosa y prurito en boca, labios y/o faringe y tos en 4 casos cada una (20%). Otros síntomas menos frecuentes fueron disnea (3 casos), síntomas oculares (2 casos) y náuseas y mareo en un caso cada una (Figura V-31).

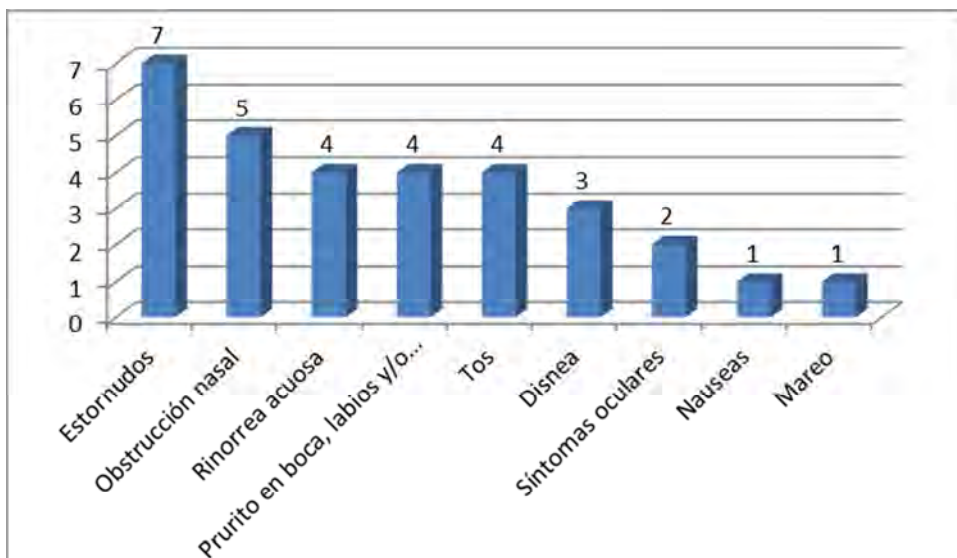


Figura V-31 Frecuencia de síntomas adicionales en los casos tras la PPBE con profilina.

V.5 Estudios aerobiológicos.

V.5.1 Recuento de profilina en el ambiente

Tras la cuantificación de profilina en el ambiente, se detectó profilina en el ambiente en 133 días, lo que supuso presencia del panalérgeno durante el 36,5 % del año.

Los niveles de profilina detectados en ambiente se te pueden ver en las Figuras V-32 y V-33.

El día pico de profilina en ambiente, en el que se encontró mayor concentración de profilina, fue el 10 de Junio con 133,6 ng de profilina en el filtro equivalente a 0,56 ng de profilina por m³ de aire

Consideramos niveles bajos medios y altos de profilina en función de la cantidad de profilina en el filtro fuera mayor de 5 ng, entre 5 y 10 ng y mayor de 10 ng. Lo que equivaldría a menor de 0,02 ng / m³ de aire, entre 0,02 y 0,04 ng / m³ de aire y mayor de 0,04 ng / m³ de aire respectivamente. De esta forma encontramos 58 días (15,9% del año) con niveles altos de profilina, 46 días (12,6% del año) niveles medios y 33 días (9 % del año) niveles bajos de profilina en ambiente

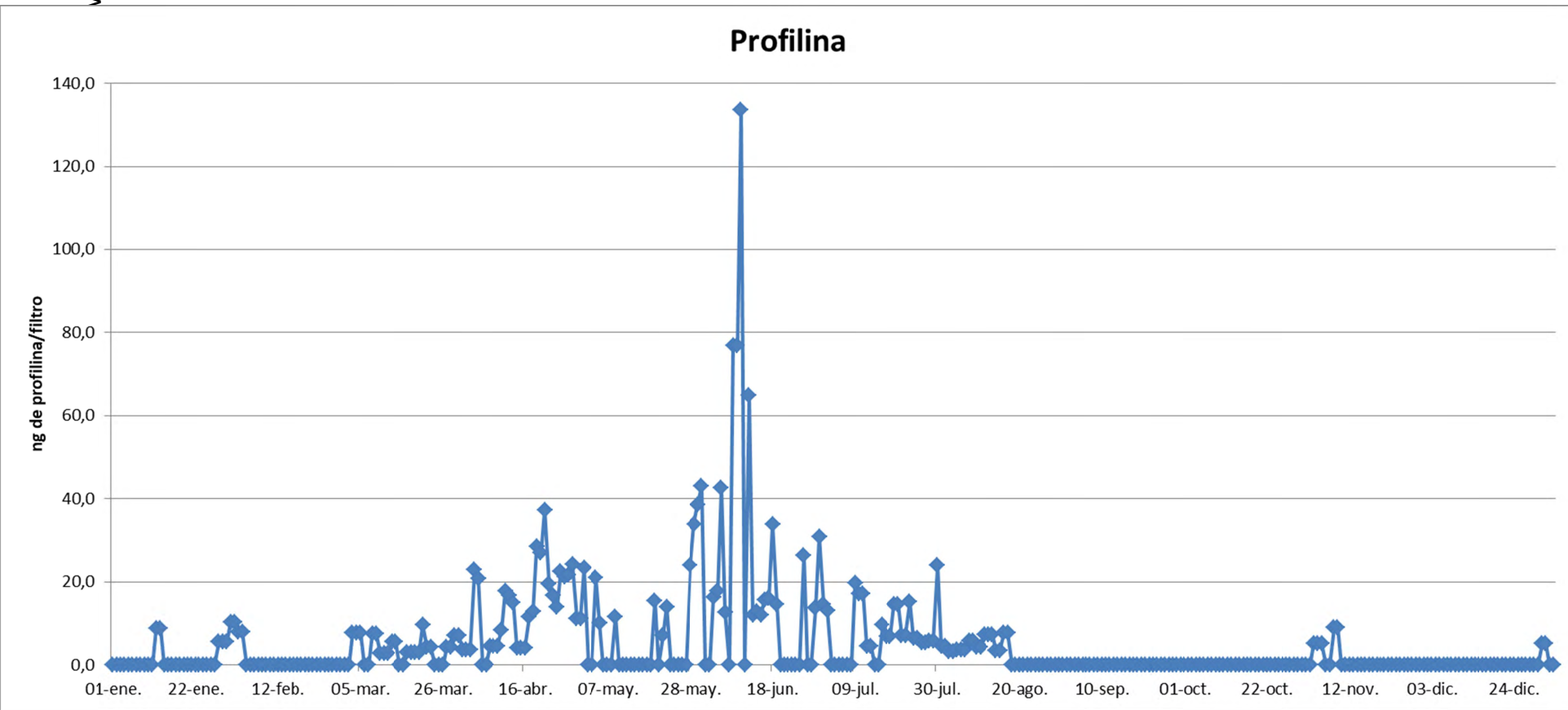


Figura V-32 Niveles de profilina por filtro a lo largo de un año (ng/filtro).

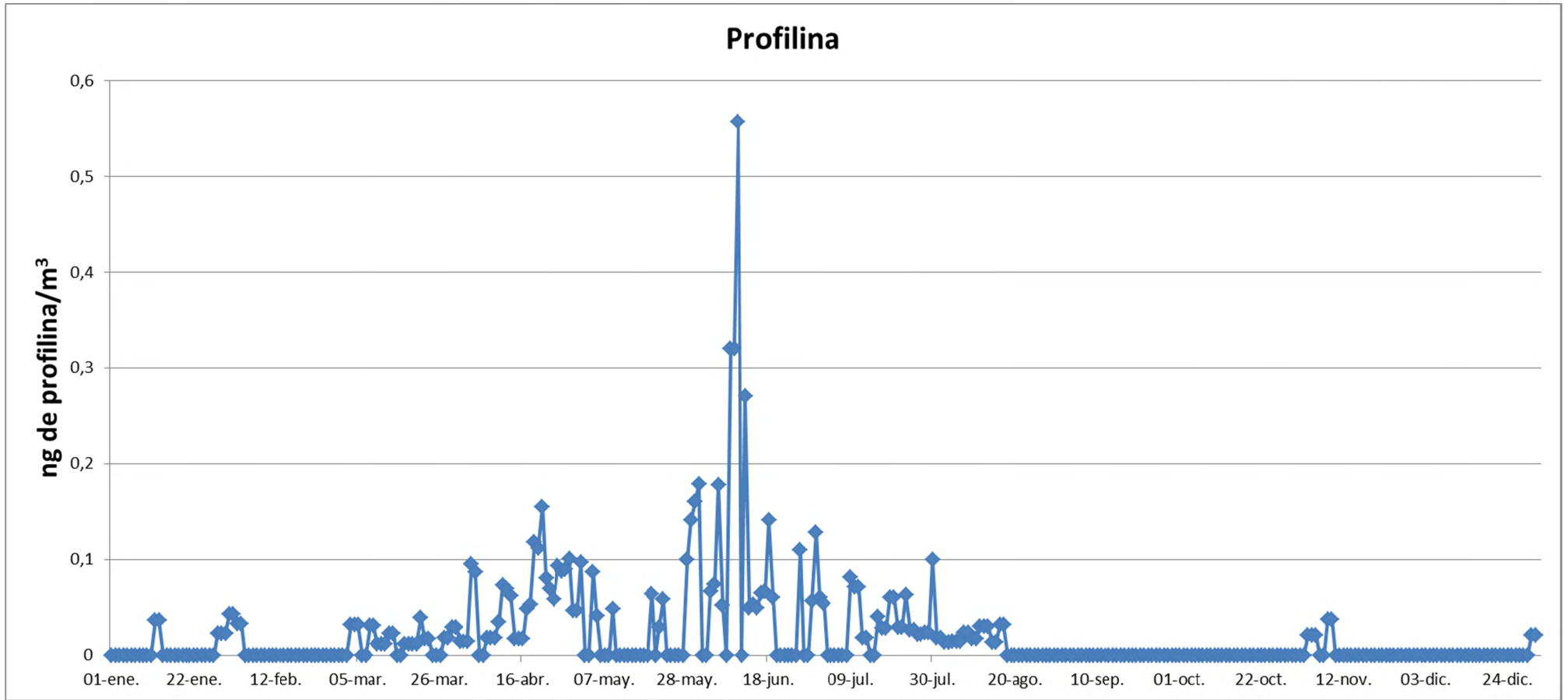


Figura V-33 Niveles de profilina en ambiente a lo largo de un año (ng/m³)

Se encontraron niveles de profilina en el ambiente durante 8 de los 12 meses del año, siendo el mes donde más profilina se recogió el mes de Junio, seguido de Mayo y Abril (Figura V-34 y Tabla V-37).

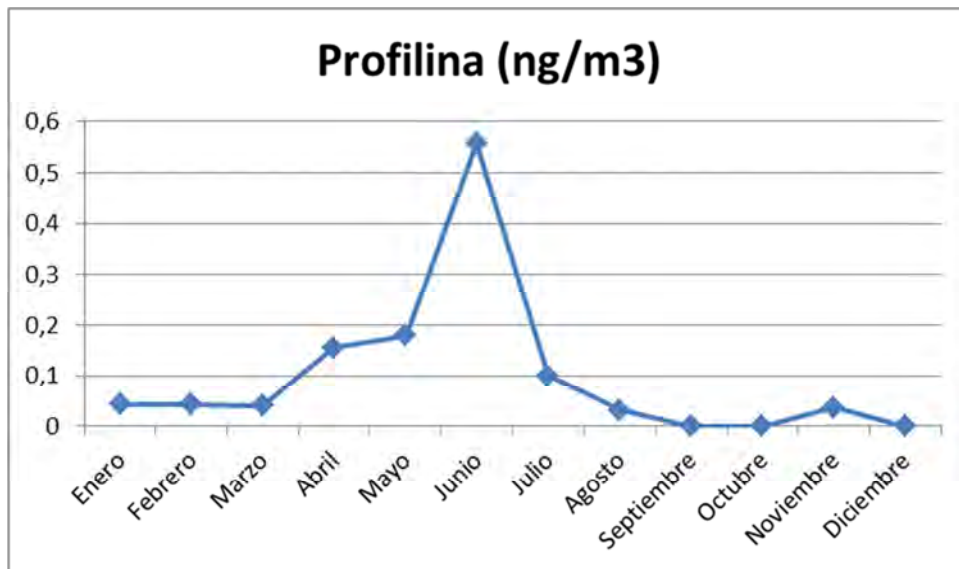


Figura V-34 cantidad de profilina en ambiente por mes a lo largo de un año.

	Profilina (ng/m ³)
Enero	0,043
Febrero	0,043
Marzo	0,04
Abril	0,155
Mayo	0,179
Junio	0,557
Julio	0,1
Agosto	0,032
Septiembre	0
Octubre	0
Noviembre	0,037
Diciembre	0

Tabla V-37 Cantidad de profilina en ambiente por mes a lo largo de un año.

Otros datos aerobiológicos de la profilina que obtuvimos extrapolando conceptos de la aerobiología del polen fueron:

- Índice de profilina anual, (suma de las concentraciones de profilina diarias a lo largo del año): 7,641 ng/m³ de aire
- El periodo principal de profilina en ambiente: se calculó como el periodo en el que se recoge el 90% de la profilina anual, eliminando el 5% inicial y final. Fue del 8 de Marzo al 9 de Agosto
- Inicio del Periodo principal de profilina en ambiente: día en el que se alcanzó el 5 % del total de la profilina anual fue el 8 de Marzo.
- Día Pico: día en el que se registró la máxima concentración diaria de profilina fue el 10 de Junio
- Final del Periodo principal de profilina en ambiente: día en el que se alcanzó el 95 % del total de profilina anual fue el 9 de Agosto
- Pre-Pico: número de días comprendidos entre el inicio del periodo principal y el día pico fueron 95 días.
- Post-Pico: número de días comprendidos entre el día pico y el final del periodo principal fueron 60 días
- Duración: número de días comprendidos entre el día de inicio y el día final del periodo principal de profilina en ambiente fue de 155 días.

V.5.2 Recuento de pólenes.

En el captador de Valdemoro se identificaron 54 tipos morfológicos de polen en total.

Los tipos polínicos con un % de representación superior a 1% fueron 14: *Quercus*, *Olea*, *Poaceae*(=*Gramineae*), *Cupressaceae/Taxaceae*, *Pinaceae*, *Platanus*, *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, *Plantago*, *Fraxinus*, *Ulmus*, *Urticaceae*, *Populus*, *Rumex*, *Castanea* De ellos 9 son arbóreos *Quercus*, *Olea*, *Cupressaceae/Taxaceae*, *Pinaceae*, *Platanus*, *Fraxinus*, *Ulmus*, *Populus*, *Castanea* y 5 tipos polínicos procedentes de plantas herbáceas son: *Poaceae*(=*Gramineae*), *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*, *Plantago*, *Urticaceae* y *Rumex*. El resto de tipos polínicos identificados, 40 tipos

polínicos + pólenes no identificados (PNI) solo representaron el 6,16% de todo el polen anual. Su incidencia atmosférica se consideró baja.

La cantidad de polen total identificado en la estación de Valdemoro fue de 29.662 granos.

En la Tabla V38 se detalla la diversidad de tipos polínicos identificados, sus niveles atmosféricos, con los tipos polínicos que fueron identificados ordenados de mayor a menor en función de su Índice polínico anual (IPA) o suma de las concentraciones medias diarias a lo largo del año, expresado como número de granos de polen/año. También se incluyó el índice polínico mensual (IPM) suma de las concentraciones medias diarias a lo largo de un mes, se expresó como número de granos de polen/mes y el porcentaje de representación sobre el polen total anual (% PT).

Valdemoro	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	IPA	% PT
<i>Quercus</i>	5	8	14	1.6 14	7.8 07	2.4 35	476	159	109	62	10	46	12. 745	42, 97
<i>Olea</i>	1	0	0	1	1.2 89	1.5 02	76	31	16	1	0	0	2.9 17	9,8 3
<i>Gramineae</i>	41	85	75	57	1.1 00	746	247	39	36	41	9	29	2.5 05	8,4 5
<i>Cupress./T axac.</i>	462	671	591	15	79	93	14	23	13	106	73	53	2.1 93	7,3 9
<i>Pinaceae</i>	3	5	124	252	963	521	80	26	14	5	0	2	1.9 95	6,7 3
<i>Platanus</i>	2	1	557	294	77	126	13	1	1	1	0	0	1.0 73	3,6 2
<i>Chenopod. /Amaranth</i>	2	5	6	2	47	116	103	230	392	77	12	2	994	3,3 5
<i>Plantago</i>	0	2	10	97	460	160	52	11	5	1	1	0	799	2,6 9
<i>Fraxinus</i>	291	148	150	9	6	0	1	0	0	14	1	16	636	2,1 4
<i>Ulmus</i>	7	278	163	1	2	0	0	0	0	0	0	0	451	1,5 2
<i>Urticaceae</i>	3	13	53	61	108	59	39	4	5	26	29	51	451	1,5 2
<i>Populus</i>	4	3	367	11	2	1	0	1	1	0	0	0	390	1,3 1
<i>Rumex</i>	0	1	8	28	173	117	19	4	1	0	0	0	351	1,1 8

V- Resultados

<i>Castanea</i>	0	0	0	0	2	75	229	22	7	0	0	0	335	1,13
<i>Alnus</i>	130	46	38	5	0	0	0	0	0	1	0	1	221	0,75
<i>Compositae</i>	0	0	1	2	31	86	45	24	9	10	3	1	212	0,71
<i>Moraceae</i>	2	0	18	104	17	4	1	4	0	0	0	0	150	0,51
<i>Ericaceae</i>	0	1	7	15	54	21	10	3	5	1	0	1	118	0,40
<i>Carex</i>	0	0	33	5	13	37	19	3	2	0	0	0	112	0,38
<i>Echium</i>	0	0	0	0	44	46	8	2	2	2	0	0	104	0,35
<i>Brassicaceae</i>	0	0	4	19	32	0	5	2	22	4	2	3	93	0,31
<i>Acer</i>	11	3	53	9	7	0	1	0	0	0	7	0	91	0,31
<i>Apiaceae</i>	0	0	0	0	15	50	11	6	4	0	0	0	86	0,29
<i>Salix</i>	2	4	13	25	17	0	3	0	0	1	0	0	65	0,22
<i>Betula</i>	2	3	7	7	23	1	1	9	0	5	0	1	59	0,20
<i>Artemisia</i>	0	4	2	0	2	9	0	3	3	2	27	6	58	0,20
<i>Corylus</i>	1	11	15	0	1	0	0	0	0	0	1	0	29	0,10
<i>Eucalyptus</i>	0	0	0	0	0	15	12	0	0	0	0	0	27	0,09
<i>Rosaceae</i>	0	1	6	2	3	0	2	0	1	0	0	0	15	0,05
<i>Cannabis</i>	0	0	0	0	3	0	6	4	0	0	0	1	14	0,05
<i>Labiatae</i>	0	0	2	0	3	4	4	1	0	0	0	0	14	0,05
<i>Tamarix</i>	0	0	0	0	12	0	0	0	1	0	0	0	13	0,04
<i>Sambucus</i>	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0,03
<i>Robinia</i>	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	9	0,03
<i>Papilionaceae</i>	0	0	0	0	3	4	1	0	0	0	0	0	8	0,03
<i>Philadelphus</i>	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	8	0,03
<i>Ligustrum</i>	0	0	0	0	2	0	4	0	1	0	0	0	7	0,02

V- Resultados

<i>Ephedra</i>	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	6	0,0 2
<i>Juglans</i>	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	6	0,0 2
<i>Typha</i>	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0,0 2
<i>Buxus</i>	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0,0 1
<i>Cariophyllaceae</i>	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	4	0,0 1
<i>Forsythia</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,0 1
<i>Ailanthus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,0 0
<i>Cistaceae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0 0
<i>Cytisus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0 0
<i>Mercurialis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,0 0
<i>Rubiaceae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0 0
OTROS	0	0	0	5	8	0	1	0	1	0	0	0	15	0,0 5
PNI	3	5	11	14	32	77	23	36	34	10	6	5	256	0,8 6
PTOTAL	972	1.298	2.331	2.660	12.468	6.307	1.522	649	685	370	181	219	29.662	100,00

Tabla V-38 Recuentos de pólenes en estación de Valdemoro.

Se comparó la cantidad total de polen de Valdemoro con la de las estaciones de Aranjuez y Getafe. Se encontró que los niveles de Valdemoro eran un 76,9% superiores a los de Getafe y un 48,8% superiores a los de la estación de Aranjuez:

- Valdemoro: 29.662 granos de polen
- Aranjuez: 19.972 granos de polen
- Getafe: 16.761 granos de polen

También se encontraron diferencias en otros parámetros aerobiológicos entre las tres estaciones (Tabla V-39).

Polen total anual	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	29662	19972	16761
% PT	100,00	100,00	100,00
[] MAX	1200	833	666
Inicio PPP	23-feb	20-feb	10-feb
Día Pico	17-may	29-may	28-mar
Final PPP	41150	41149	41094
Días pre-pico	84	99	48
Días post-pico	102	89	96
Duración total PPP	186	188	144
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	4	27	29
Nª de días con valor ≥ 1	355	285	330
entre 1 y 30	190	155	229
entre 31 y 50	49	52	27
entre 51 y 100	41	38	25
entre 101 y 200	39	17	27
entre 201 y 500	24	13	20
entre 751 y 1000	11	10	2
mayor que 1000	1	0	0

Tabla V-39 Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

[] **Max:** concentración máxima diaria/año

PPP Periodo de Polinización Principal: se calculó como el periodo en el que se recoge el 90% del polen total anual del tipo polínico, eliminando el 5% inicial y final.

Inicio PPP: día en el que se alcanzó el 5 % del total de polen anual

Día Pico: día en el que se registró la máxima concentración diaria

Final PPP: día en el que se alcanzó el 95 % del total de polen anual

Pre-Pico: número de días comprendidos entre el inicio de PPP y el día pico

Post-Pico: número de días comprendidos entre el día pico y el final del PPP

Duración: número de días comprendidos entre el día de inicio y el día final del PPP

La concentración máxima fue mayor en Valdemoro que en las estaciones de Aranjuez y Getafe. La duración de la polinización fue similar a Aranjuez y superior a

Getafe. El día pico fue un poco anterior en Valdemoro a las otras dos estaciones, y el número de días sin nada de polen fue inferior en Valdemoro a las otras dos estaciones.

En las siguientes tablas se presentan los datos obtenidos en los recuentos de pólenes de las estaciones de Aranjuez (Tabla V-40) y Getafe (Tabla V-41) respectivamente

Aranjuez	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	IPA	% PT
<i>Quercus</i>	5	5	23	63	1.105	997	337	113	75	13	0	55	2.791	13,97
<i>Cupress./Taxac.</i>	92	1.452	683	29	25	31	18	13	9	16	5	100	2.473	12,38
<i>Gramineae</i>	15	53	22	13	950	573	241	61	71	32	1	9	2.041	10,22
<i>Acer</i>	0	0	89	291	1.137	477	6	0	0	0	0	0	2.000	10,01
<i>Ulmus</i>	3	1.341	403	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1.749	8,76
<i>Olea</i>	0	0	0	0	843	626	41	11	10	0	0	0	1.531	7,67
<i>Platanus</i>	0	0	405	1.087	11	0	0	2	0	0	0	0	1.505	7,54
<i>Chenopod./Am</i>	0	0	0	0	8	187	183	306	268	16	1	0	969	4,85
<i>Pinaceae</i>	0	3	4	34	380	346	37	26	9	4	1	5	849	4,25
<i>Moraceae</i>	0	0	6	420	201	17	2	4	0	0	0	0	650	3,25
<i>Brassicaceae</i>	0	0	0	0	150	418	0	0	0	0	0	0	568	2,84
<i>Rumex</i>	1	0	3	3	164	86	33	10	4	1	0	0	305	1,53
<i>Plantago</i>	0	0	0	3	120	85	19	8	2	0	0	0	237	1,19
<i>Populus</i>	0	52	171	7	0	0	0	0	0	0	0	0	230	1,15
<i>Ligustrum</i>	0	0	0	0	13	208	4	2	0	1	0	0	228	1,14
<i>Fraxinus</i>	86	107	4	0	0	0	0	0	0	0	0	15	212	1,06

V- Resultados

<i>Urticaceae</i>	4	12	22	21	10	41	29	20	6	11	2	8	186	0,93
<i>Castanea</i>	0	0	0	0	43	5	120	0	0	1	0	1	170	0,85
<i>Alnus</i>	36	35	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87	0,44
<i>Sambucus</i>	0	0	0	0	45	19	0	0	0	0	0	0	64	0,32
<i>Compositae</i>	0	0	0	0	12	25	8	4	8	3	0	1	61	0,31
<i>Carex</i>	0	0	0	0	5	26	12	12	1	0	0	0	56	0,28
<i>Tilia</i>	0	0	0	0	0	22	5	3	2	0	0	0	32	0,16
<i>Artemisia</i>	0	0	0	0	0	0	1	3	12	10	0	0	26	0,13
<i>Apiaceae</i>	0	0	0	0	1	12	1	2	3	0	0	0	19	0,10
<i>Typha</i>	0	0	0	0	1	7	9	2	0	0	0	0	19	0,10
<i>Syringa</i>	0	0	0	3	15	0	0	0	0	0	0	0	18	0,09
<i>Ericaceae</i>	0	0	0	1	7	8	0	0	1	0	0	0	17	0,09
<i>Aesculus</i>	0	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	0	9	0,05
<i>Echium</i>	0	0	0	0	2	5	1	1	0	0	0	0	9	0,05
<i>Cytisus</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0,03
<i>Eucalyptus</i>	0	0	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0	5	0,03
<i>Ephedra</i>	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	4	0,02
<i>Juncaceae</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4	0,02
<i>Tamarix</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0,02
<i>Betula</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0,02
<i>Cannabis</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0,02
<i>Robinia</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0,02

V- Resultados

<i>Salix</i>	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,02
<i>Cistus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,01
<i>Corylus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,01
<i>Juglans</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01
OTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0,02
PNI	8	33	84	61	168	174	137	36	81	16	1	20	819	4,10
PTOTAL	250	3.094	1.935	2.040	5.433	4.405	1.255	643	562	125	11	219	19.972	100,00

Tabla V-40 Recuentos de pólenes en estación de Aranjuez.

Getafe	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	IPA	% PT
<i>Platanus</i>	0	0	2.958	1.565	113	6	6	6	4	22	29	2	4.711	28,11
<i>Cupress./Taxac.</i>	394	912	954	22	49	23	2	0	1	7	11	65	2.440	14,56
<i>Quercus</i>	0	0	16	166	1.584	411	57	21	9	8	3	2	2.277	13,59
<i>Acer</i>	0	0	27	244	1.293	112	0	0	0	0	0	0	1.676	10,00
<i>Gramineae</i>	7	21	30	33	608	240	71	19	15	1	2	11	1.058	6,31
<i>Pinaceae</i>	0	4	84	94	357	212	27	13	8	4	2	1	806	4,81
<i>Olea</i>	0	0	0	0	323	269	15	8	5	2	1	0	623	3,72

V- Resultados

<i>Ulmus</i>	0	300	150	2	0	0	0	0	0	0	0	0	452	2,70
<i>Plantago</i>	0	0	3	35	229	52	4	6	7	6	0	0	342	2,04
<i>Urticaceae</i>	11	5	32	45	128	35	21	5	2	5	13	11	313	1,87
<i>Fraxinus</i>	148	68	49	5	0	0	0	0	0	0	0	2	272	1,62
<i>Moraceae</i>	0	0	46	188	25	0	0	0	0	0	1	0	260	1,55
<i>Rumex</i>	0	0	0	8	130	41	3	0	0	0	0	0	182	1,09
<i>Populus</i>	0	0	172	7	0	2	0	0	0	0	0	0	181	1,08
<i>Chenopod./Amaranth.</i>	0	0	0	0	34	13	23	19	43	4	0	0	136	0,81
<i>Castanea</i>	0	0	0	0	4	52	62	12	1	0	0	0	131	0,78
<i>Sophora</i>	0	0	0	0	0	0	54	37	2	0	0	0	93	0,55
<i>Gleditchia</i>	0	0	0	0	79	8	0	0	0	0	0	0	87	0,52
<i>Aesculus</i>	0	0	0	0	82	0	0	0	0	0	0	0	82	0,49
<i>Compositae</i>	1	0	2	0	31	26	9	8	2	0	1	1	81	0,48
<i>Alnus</i>	37	27	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78	0,47
<i>Mercurialis</i>	0	0	0	1	33	3	1	2	0	0	0	1	41	0,24
<i>Salix</i>	0	0	5	7	26	1	0	0	0	0	0	0	39	0,23

V- Resultados

<i>Echium</i>	0	0	0	1	18	11	2	0	0	0	0	0	32	0,19
<i>Cyperaceae</i>	0	0	0	0	7	19	2	2	0	0	0	0	30	0,18
<i>Sambucus</i>	0	0	0	0	8	9	3	3	0	0	0	0	23	0,14
<i>Ericaceae</i>	0	0	1	1	18	0	2	0	0	0	0	0	22	0,13
<i>Eucalyptus</i>	0	0	0	0	1	4	7	3	0	0	0	0	15	0,09
<i>Robinia</i>	0	0	0	1	12	2	0	0	0	0	0	0	15	0,09
<i>Apiaceae</i>	0	0	0	1	5	5	1	0	1	0	0	0	13	0,08
<i>Betula</i>	0	0	2	4	7	0	0	0	0	0	0	0	13	0,08
<i>Ligustrum</i>	0	0	0	0	0	6	6	1	0	0	0	0	13	0,08
<i>Artemisia</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	7	0	1	1	11	0,07
<i>Brassicaceae</i>	0	0	0	4	6	1	0	0	0	0	0	0	11	0,07
<i>Rosaceae</i>	0	0	0	2	7	2	0	0	0	0	0	0	11	0,07
<i>Cannabis</i>	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0,04
<i>Juncaceae</i>	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0,03
<i>Tamarix</i>	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	4	0,02
<i>Juglans</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,02

V- Resultados

<i>Ailanthus</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0,01
<i>Corylus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,01
<i>Acacia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
<i>Eleagnus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01
<i>Hedera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,01
<i>Tilia</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01
<i>Typha</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,01
OTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
PNI	1	1	22	21	78	21	11	1	4	1	1	2	164	0,98
PTOTAL	601	1.338	4.568	2.461	5.304	1.588	393	171	112	60	65	100	16.761	100,00

Tabla V-41 Recuentos de pólenes en estación de Getafe.

Al comparar los tipos polínicos con mayor incidencia atmosférica, el Índice polínico anual (IPA): y los porcentajes de representación sobre el polen total de las tres estaciones, también se encontraron diferencias (Tabla V-42).

TIPO POLINICO	Valdemoro		Aranjuez		Getafe	
	IPA	% PT	IPA	% PT	IPA	% PT
<i>Quercus</i>	12.745	42,97	2.791	13,97	2.277	13,59
<i>Platanus</i>	1.073	3,62	1.505	7,54	4.711	28,11
<i>Cupress./Taxac.</i>	2.193	7,39	2.473	12,38	2.440	14,56
<i>Gramineae</i>	2.505	8,45	2.041	10,22	1.058	6,31

<i>Olea</i>	2.917	9,83	1.531	7,67	623	3,72
<i>Acer</i>	91	0,31	2.000	10,01	1.676	10,00
<i>Pinaceae</i>	1.995	6,73	849	4,25	806	4,81
<i>Ulmus</i>	451	1,52	1.749	8,76	452	2,70
<i>Chenopod./Amaranth.</i>	994	3,35	969	4,85	136	0,81
<i>Plantago</i>	799	2,69	237	1,19	342	2,04
<i>Fraxinus</i>	636	2,14	212	1,06	272	1,62
<i>Moraceae</i>	150	0,51	650	3,25	260	1,55
<i>Urticaceae</i>	451	1,52	186	0,93	313	1,87
<i>Rumex</i>	351	1,18	305	1,53	182	1,09
<i>Populus</i>	390	1,31	230	1,15	181	1,08
<i>Brassicaceae</i>	93	0,31	568	2,84	11	0,07
<i>Castanea</i>	335	1,13	170	0,85	131	0,78
<i>Alnus</i>	221	0,75	87	0,44	78	0,47
<i>Compositae</i>	212	0,71	61	0,31	81	0,48
Otros	804	2,71	539	2,70	567	3,38
PNI	256	0,86	819	4,10	164	0,98
PTOTAL	29.662	100,00	19.972	100,00	16.761	100,00

Tabla V-42 Tipos polínicos con mayor incidencia atmosférica en Valdemoro, Aranjuez, Getafe. IPA y porcentaje de representación sobre el polen total.

Mientras en Valdemoro el polen más frecuentemente encontrado fue el *Quercus* (42,97% Seguido de la *Olea* 9,83% y Gramineae 8,45%, En Getafe el polen más frecuente fue el *Platanus* (28,11%) *Cupresaceas* (14,11%) y *Quercus* (13,59%). En Aranjuez se encontró *Quercus* (13,97%), *Cupresacea* (12,38%), *Gramineae* (10,22%) (Figura V-35).

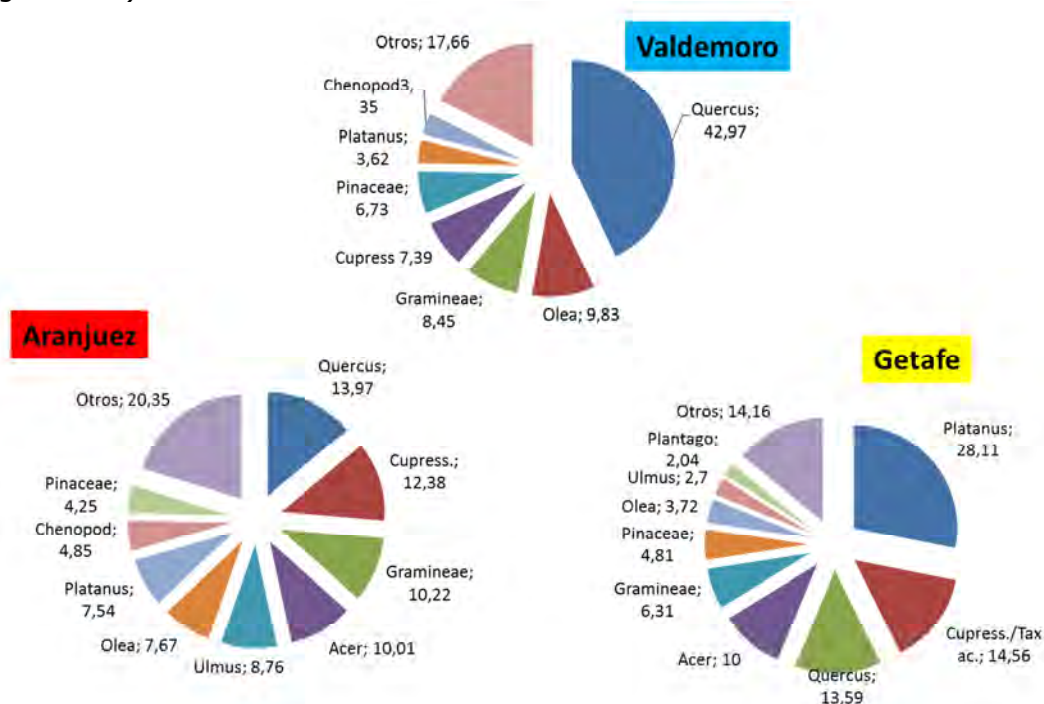


Figura V-35 Porcentajes de representación de los pólenes más relevantes en las estaciones de Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

Se realizó el análisis comparativo de la aerobiología de cada uno de los pólenes más relevantes en las tres estaciones, Con especial relevancia el polen de gramíneas, que en Valdemoro presentó IPA más del doble del que se obtuvo en la estación de Getafe (2505 y 1058 respectivamente) y un 22, 7 % más que la estación de Aranjuez. Con una duración también ostensiblemente mayor 167 días en Valdemoro, 130 en Aranjuez y 122 días en Getafe (Tabla V-43 y Figura V-36).

<i>Gramineae</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	2505	2041	1058
%	8,45	10,22	6,31
[] MAX	160	172	79
Inicio PPP	29-feb	22-abr	24-mar
Día Pico	25-may	26-may	18-may
Final PPP	17-ago	2-sep	26-jul
Días pre-pico	85	34	54
Días post-pico	82	96	68
Duración total PPP	167	130	122
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	102	128	177
Nº de días con valor >= 1	257	184	182
entre 1 y 30	235	168	174
entre 31 y 50	14	7	4
entre 51 y 100	5	3	4
entre 101 y 200	3	6	0
entre 201 y 500	0	0	0
entre 501 y 1000	0	0	0
mayor de 1000	0	0	0

Tabla V-43 Tipo polínico *Gramineae*. Parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

IPA Gramineas

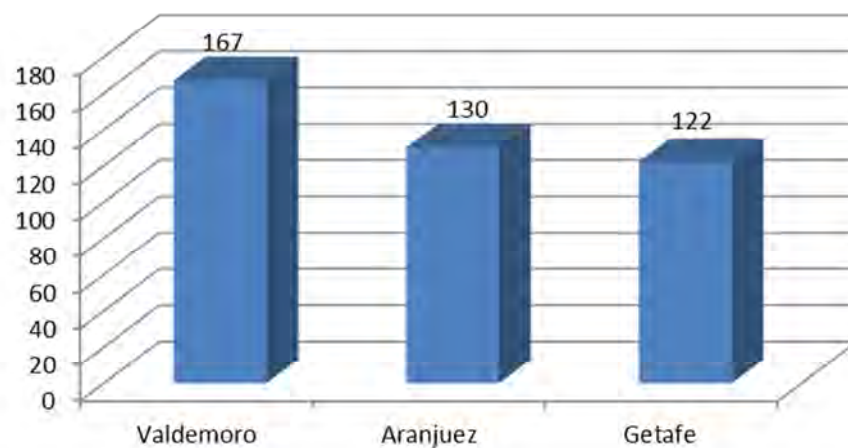
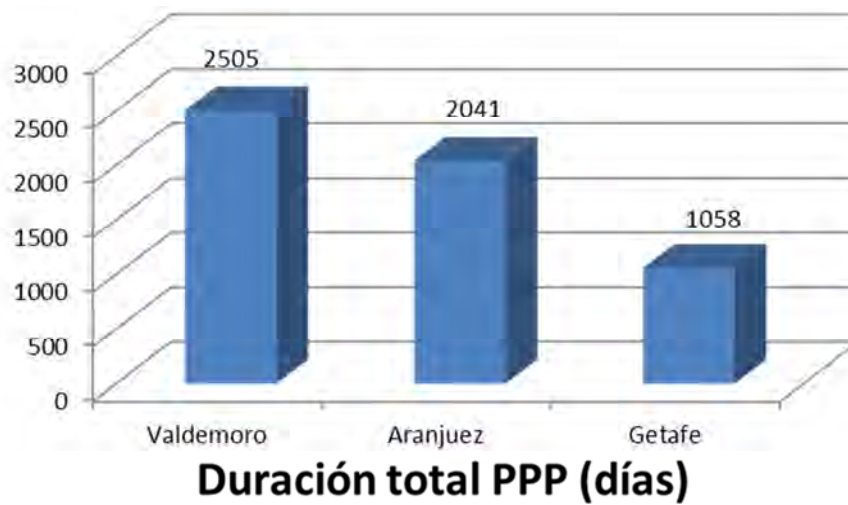


Figura V-36 Comparación del IPA y duración total del PPP de gramíneas en las estaciones de Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

De igual forma se estudiaron los parámetros aerobiológicos de cada uno de los pólenes más relevantes, comparándolos en las tres estaciones, como se detallan a continuación (Tablas V-44 a V-50).

<i>Olea</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	2917	1531	623
% PT	9,83	7,67	3,72
[] MAX	403	214	101
Inicio PPP	17-may	25-may	17-may
Día Pico	1-jun	31-may	2-jun
Final PPP	25-jun	24-jun	29-jun

Días pre-pico	14	6	15
Días post-pico	24	24	27
Duración total PPP	38	29	42
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	238	243	283
Nª de días con valor >= 1	121	69	76
entre 1 y 30	99	55	70
entre 31 y 50	8	4	2
entre 51 y 100	7	6	3
entre 101 y 200	3	3	1
entre 201 y 500	4	1	0
entre 501 y 1000	0	0	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-44 Tipo polínico *Olea*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

<i>Quercus</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	12745	2791	2277
% PT	42,97	13,97	13,59
[] MAX	910	251	160
Inicio PPP	21-abr	15-may	23-abr
Día Pico	8-may	25-may	18-may
Final PPP	7-jul	2-sep	25-jun
Días pre-pico	17	10	25
Días post-pico	59	97	37
Duración total PPP	76	107	62
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	117	121	202
Nª de días con valor >= 1	242	191	157
entre 1 y 30	181	172	130
entre 31 y 50	8	3	12
entre 51 y 100	15	11	11
entre 101 y 200	21	4	4
entre 201 y 500	14	1	0
entre 751 y 1000	3	0	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-45 Tipo polínico *Quercus*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

<i>Platanus</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	1073	1505	4711
% PT	3,62	7,54	28,11
[] MAX	114	415	626
Inicio PPP	25-mar	29-mar	25-mar
Día Pico	28-mar	1-abr	28-mar
Final PPP	13-jun	16-abr	21-abr
Días pre-pico	3	2	3
Días post-pico	75	15	23

Duración total PPP	78	17	26
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	256	267	266
Nº de días con valor >= 1	103	45	93
entre 1 y 30	94	35	78
entre 31 y 50	3	2	0
entre 51 y 100	3	5	4
entre 101 y 200	3	1	3
entre 201 y 500	0	2	6
entre 501 y 1000	0	0	2
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-46 Tipo polínico *Platanus*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

<i>Cupressaceae/Taxaceae</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	2193	2473	2440
% PT	7,39	12,38	14,56
[] MAX	120	565	266
Inicio PPP	14-ene	3-feb	20-ene
Día Pico	27-feb	20-feb	27-feb
Final PPP	14-nov	15-sep	26-may
Días pre-pico	43	17	37
Días post-pico	257	205	89
Duración total PPP	300	222	126
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	110	148	187
Nº de días con valor >= 1	249	164	172
entre 1 y 30	226	148	151
entre 31 y 50	12	9	7
entre 51 y 100	8	2	9
entre 101 y 200	3	3	4
entre 201 y 500	0	1	1
entre 501 y 1000	0	1	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-47 Tipo polínico *Cupressaceae/Taxaceae*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

<i>Acer</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	91	2000	1676
%	0,31	10,01	10,00
[] MAX	9	211	173
Inicio PPP		1-abr	20-abr
Día Pico		29-may	17-may

Final PPP		5-jun	1-jun
Días pre-pico		58	27
Días post-pico		6	14
Duración total PPP		64	41
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	316	234	278
Nª de días con valor >= 1	43	78	81
entre 1 y 30	43	63	61
entre 31 y 50	0	2	10
entre 51 y 100	0	7	8
entre 101 y 200	0	5	2
entre 201 y 500	0	1	0
entre 501 y 1000	0	0	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-48 Tipo polínico *Acer*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

<i>Pinaceae</i>	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	1.995	849	806
%	6,73	4,25	4,81
[] MAX	138	114	57
Inicio PPP	29-mar	2-may	28-mar
Día Pico	15-may	5-jun	29-may
Final PPP	8-jul	1-ago	16-jul
Días pre-pico	46	33	61
Días post-pico	53	56	47
Duración total PPP	99	89	108
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	176	207	218
Nª de días con valor >= 1	183	105	141
entre 1 y 30	169	94	138
entre 31 y 50	4	7	1
entre 51 y 100	7	3	2
entre 101 y 200	3	1	0
entre 201 y 500	0	0	0
entre 501 y 1000	0	0	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-49 Tipo polínico *Pinaceae*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

ULMU	Valdemoro	Aranjuez	Getafe
IPA	451	1749	452
%	1,52	8,76	2,70
[] MAX	63	223	69
Inicio PPP	19-feb	19-feb	20-feb
Día Pico	1-mar	26-feb	27-feb
Final PPP	11-mar	8-mar	15-mar
Días pre-pico	12	7	7
Días post-pico	10	12	18
Duración total PPP	22	19	25
Nº días sin datos	7	54	7
Nº de días con valor = 0	312	258	312
Nª de días con valor ≥ 1	47	54	47
entre 1 y 30	42	39	42
entre 31 y 50	3	3	3
entre 51 y 100	2	6	2
entre 101 y 200	0	5	0
entre 201 y 500	0	1	0
entre 501 y 1000	0	0	0
mayor que 1000	0	0	0

Tabla V-50 Tipo polínico *Ulmus*. Principales parámetros aerobiológicos en Valdemoro, Aranjuez y Getafe.

1.1.1.1 Relación pólenes con profilina en ambiente

Una vez obtenidos los datos de profilina en el ambiente de Valdemoro y el recuento de los distintos pólenes en la estación localizada en el mismo sitio, se procedió a estudiar la relación entre la profilina y los granos de polen más relevante que la contienen.

En primer lugar se observó una relación de la profilina con el polen de gramíneas ($\rho=0.24$; $p<0.001$), Si bien hay un decalaje entre el pico de máxima concentración de profilina y el pico de máxima concentración de pólenes de gramíneas de 16 días (Figura V-37).

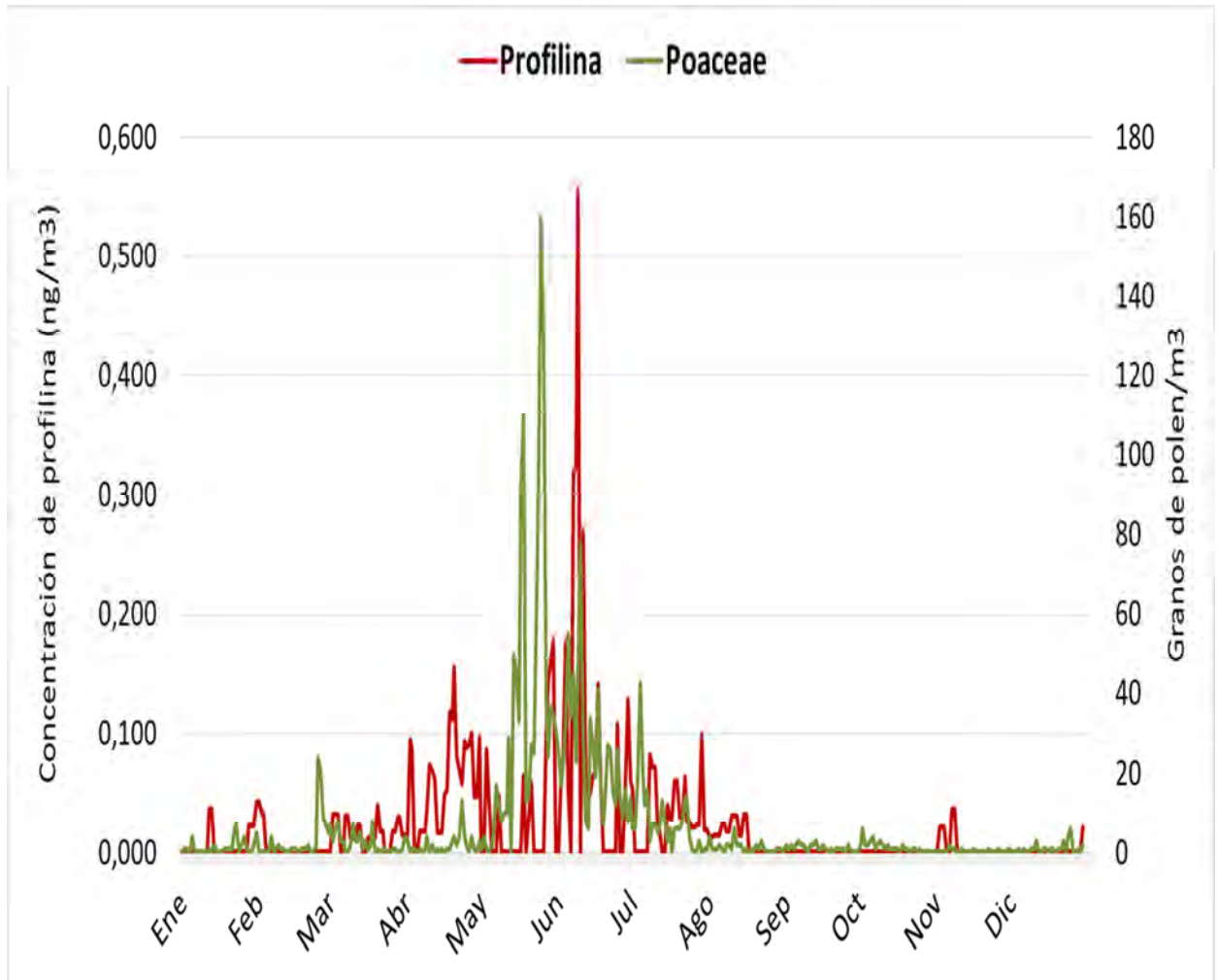


Figura V-37 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de gramíneas.

También se observó una correlación similar con la concentración de polen de olivo ($\rho=0.24$; $p<0.001$). En este caso hubo una diferencia de 9 días entre el día pico del polen de *olea* y la concentración máxima de profilina en ambiente (Figura V-38).

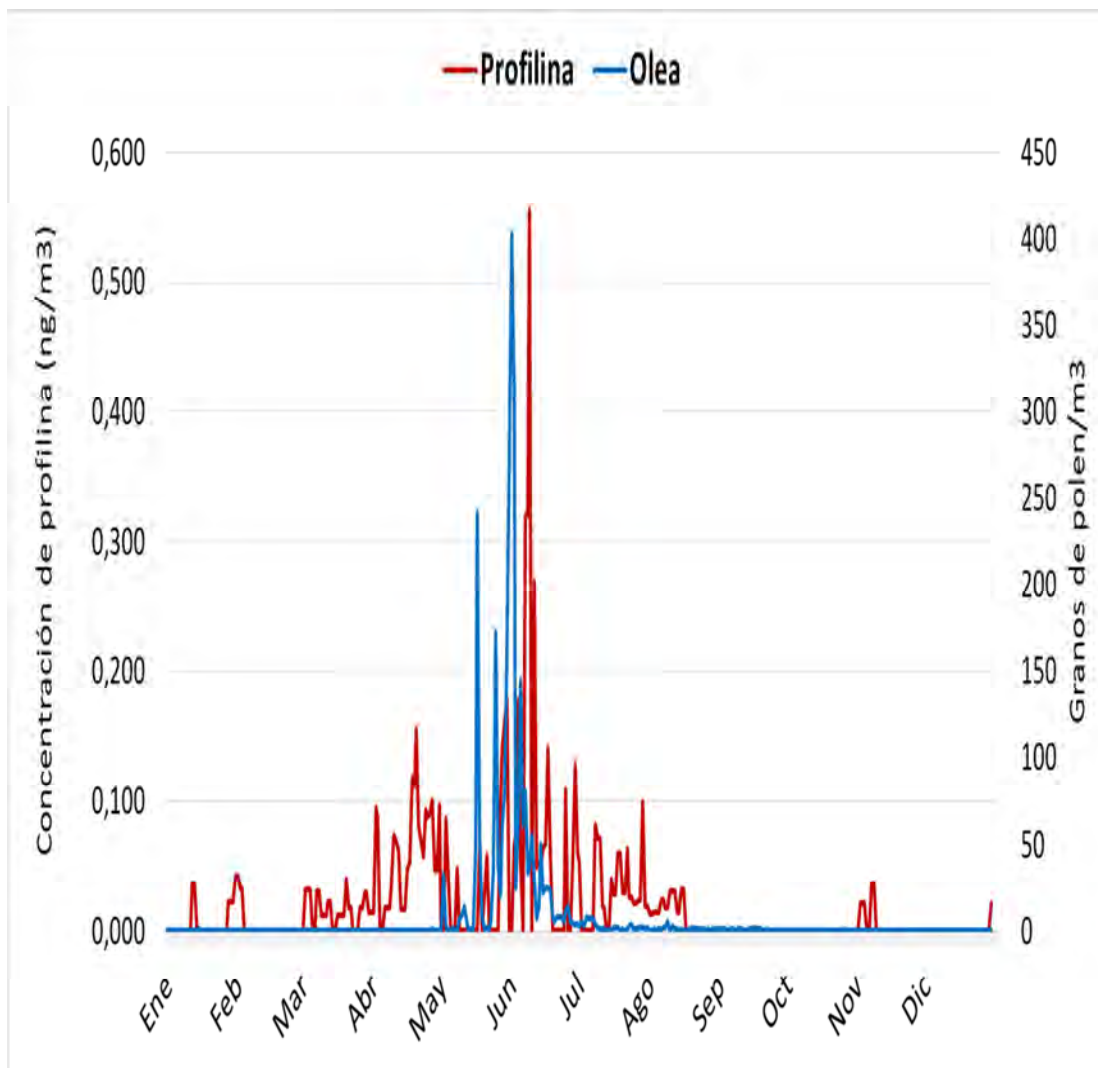


Figura V-38 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen del Olivo.

La relación que se encontró con el polen del árbol del plátano fue superior a los anteriores ($\rho=0.41$; $p<0.001$), en cambio el periodo que va del pico del polen del *platanus a.* al pico de máxima concentración de profilina fue superior, (74 días), Si bien, hubo otro pico de profilina inferior a los 23 días del pico de polen de *platanus a.* (Figura V-39).

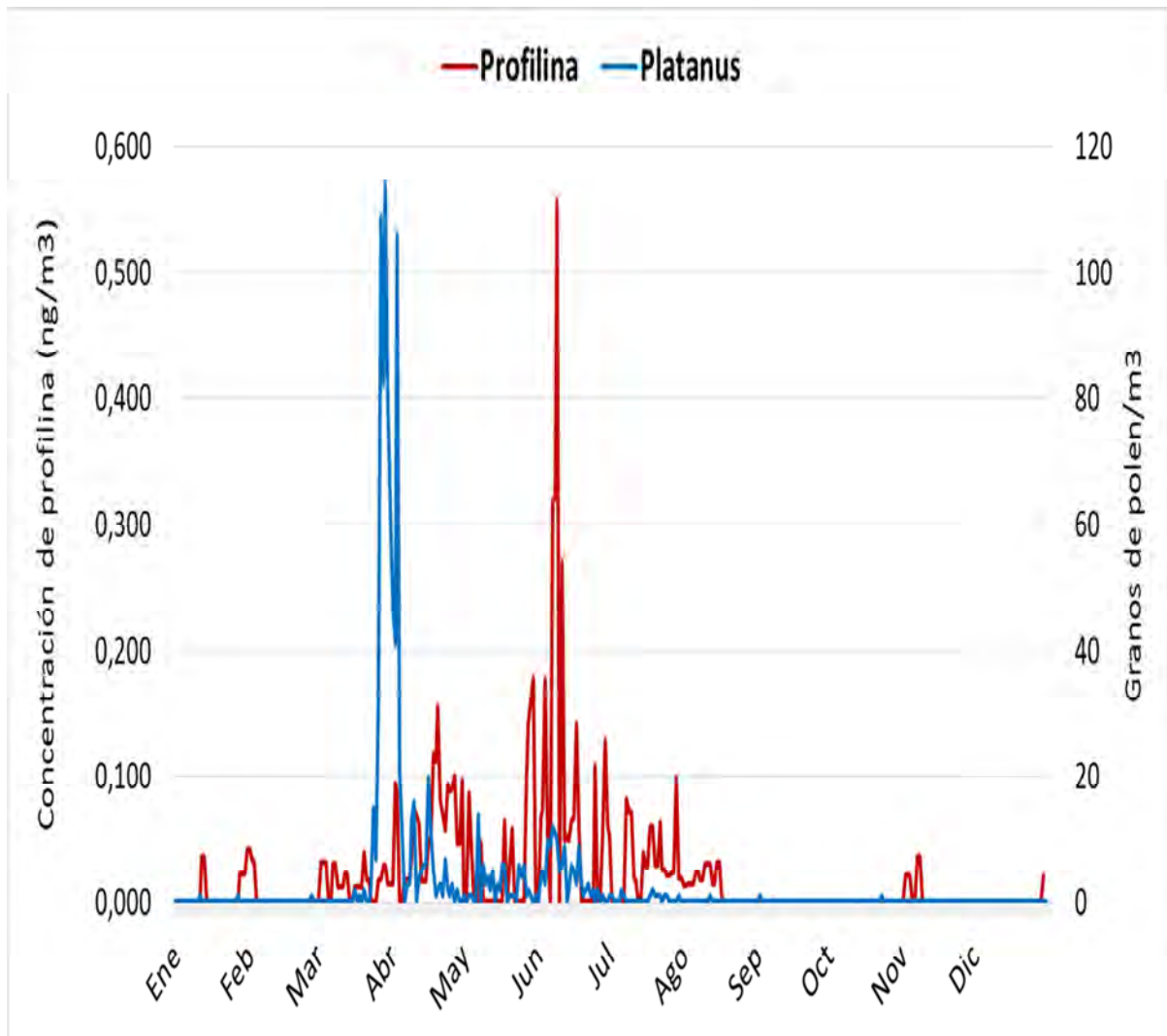


Figura V-39 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de árbol del plátano.

En el caso del polen tipo *Quercus* se encontró una correlación positiva con la concentración de profilina en ambiente ($\rho=0.36$; $p<0.001$) El pico de polen de *quercus* fue 31 días antes del pico máximo de concentración de profilina en ambiente (Figura V-40).

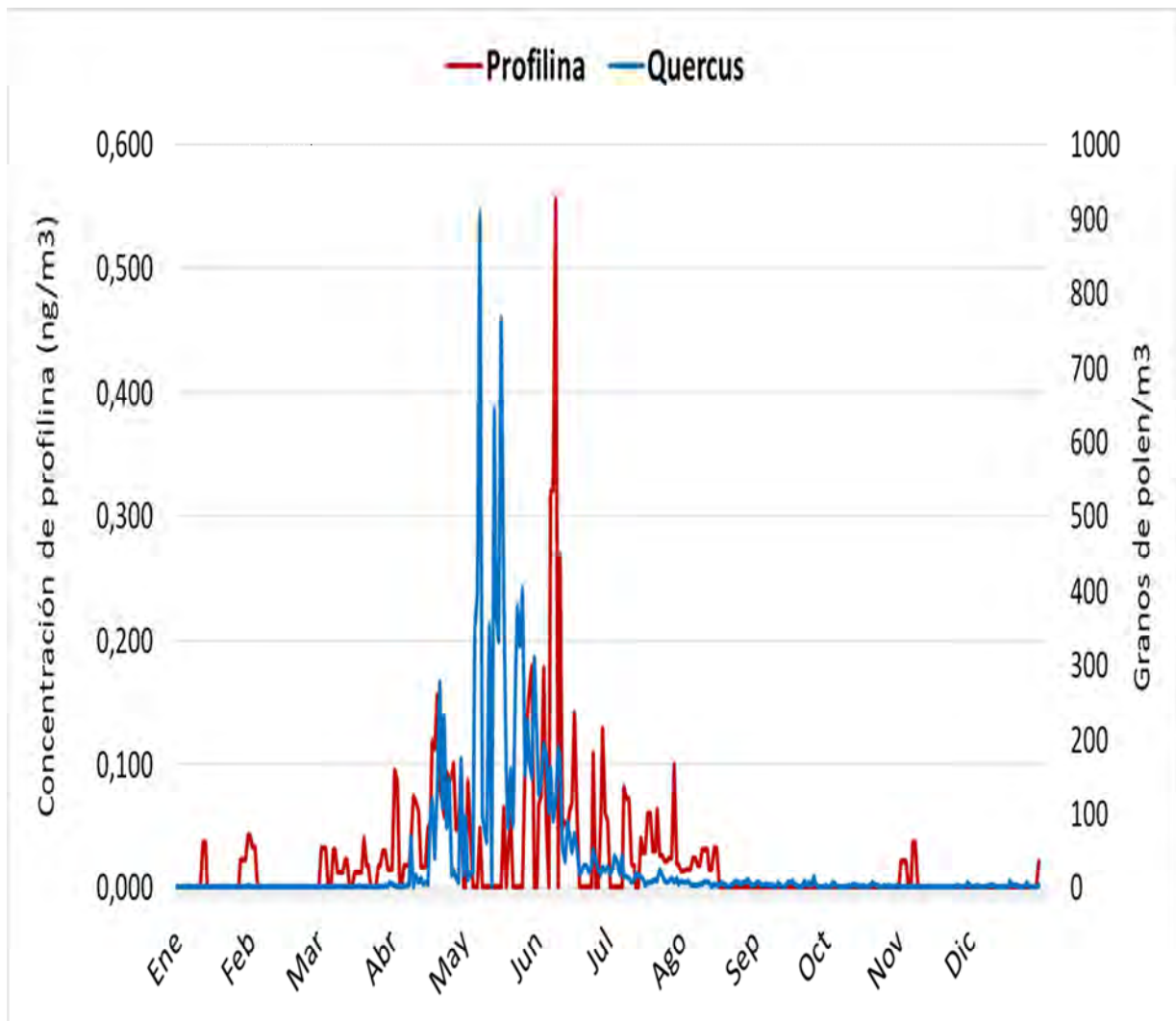


Figura V-40 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de Quercus

También se encontró una correlación entre el polen de plantago y la concentración de profilina en ambiente ($\rho=0.39$; $p<0.001$). En este caso, hubo 24 días de diferencia entre el pico máximo de concentración de profilina y el pico de plantago, si bien en este caso el nivel de pólenes fue más reducido (Figura V-41).

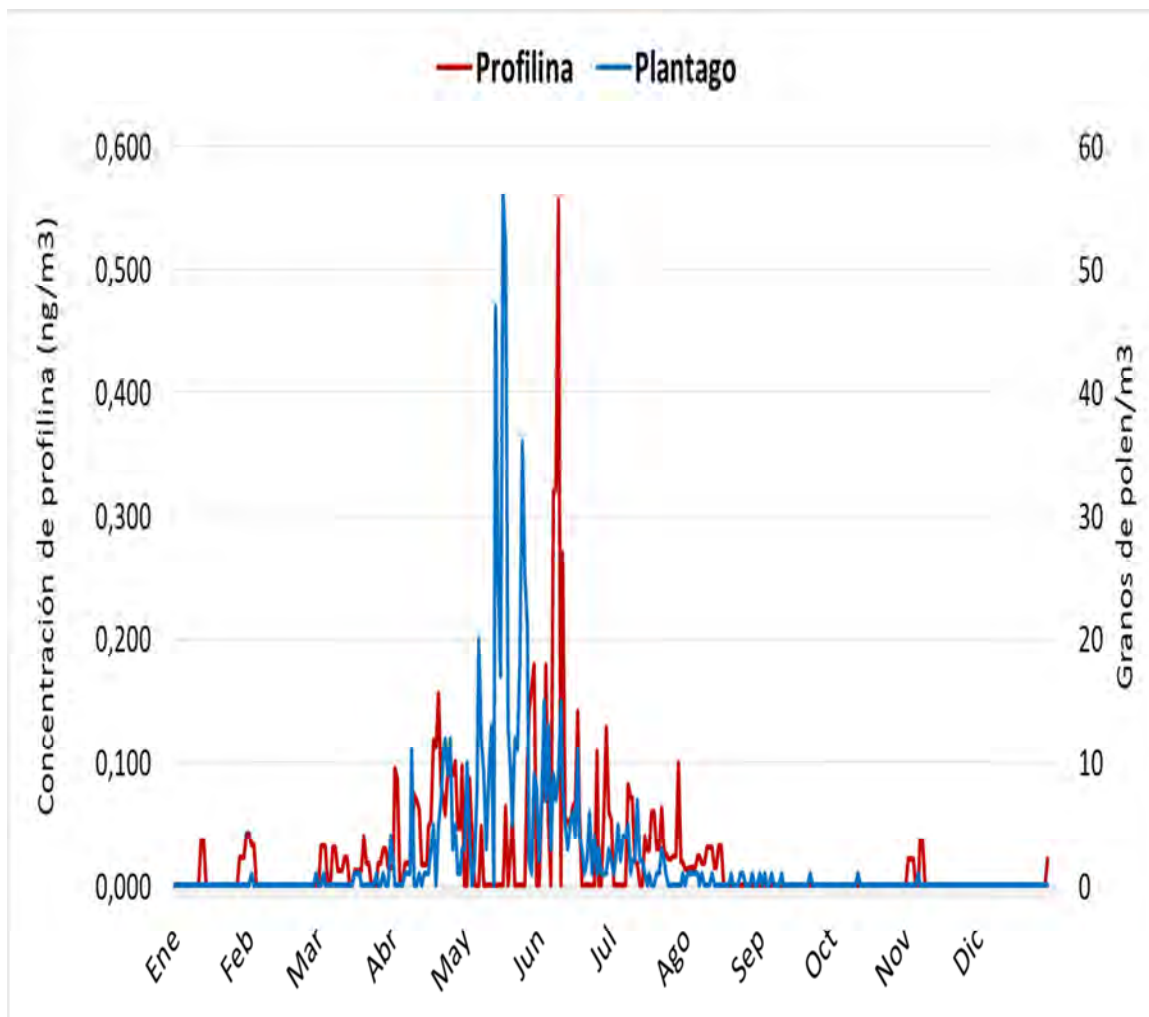


Figura V-41 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de Plantago.

En el caso de las cupresáceas no se observó una correlación con la concentración de profilina en ambiente (Figura V-42).

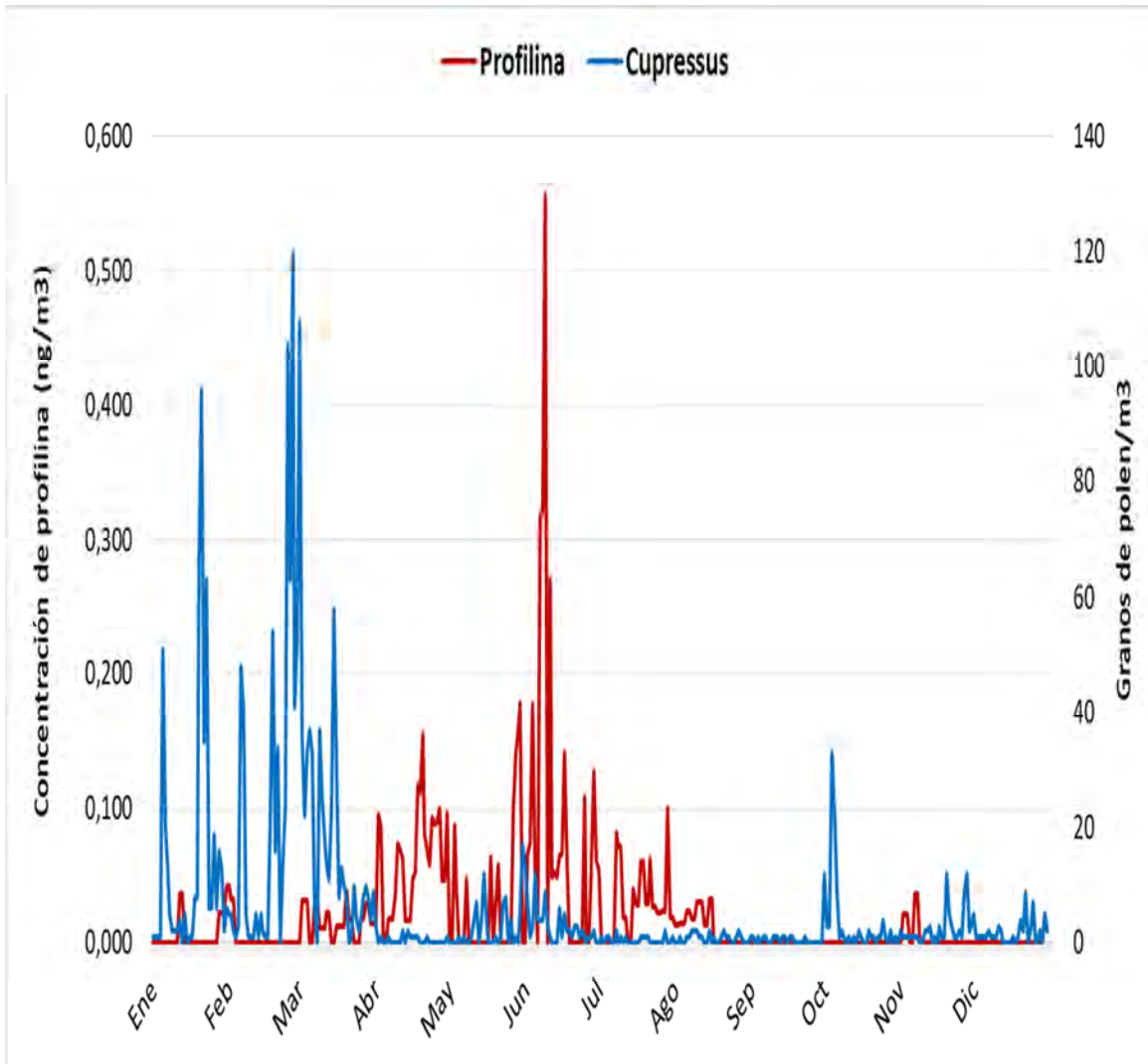


Figura V-42 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y los granos de polen de cupresáceas.

La correlación de la suma del total de pólenes con la concentración de profilina en ambiente se observa en la Figura V-43 se observó que los picos principales de profilina correspondían a los picos de gramíneas y olivo y su relación con el pico de la profilina fue la que se comentó anteriormente.

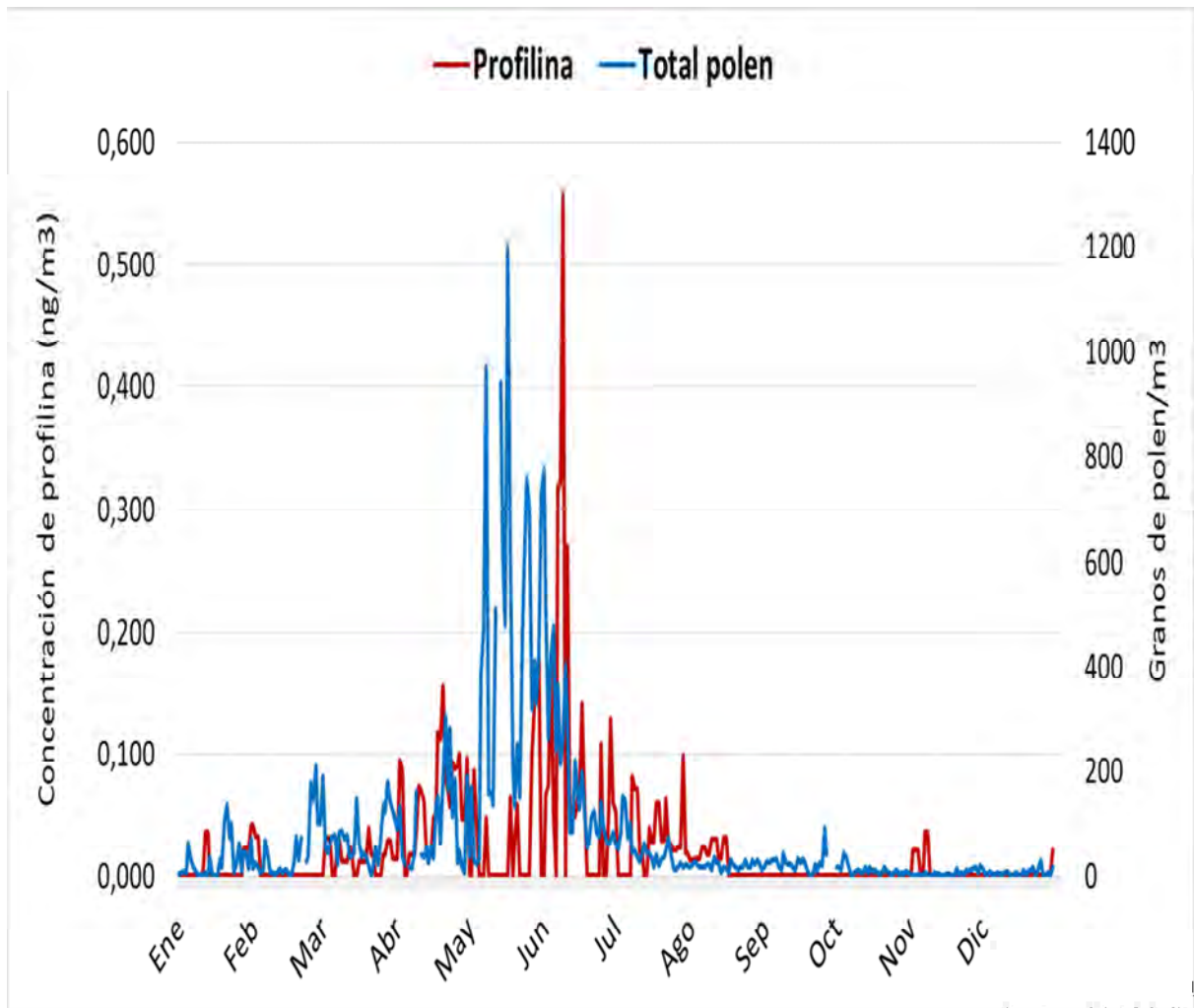


Figura V-43 Relación entre la concentración de profilina en ambiente y la suma de granos de polen.

V.5.3 Parámetros ambientales y contaminantes atmosféricos

Se recogieron los parámetros meteorológicos y contaminantes atmosféricos para intentar evaluar cómo pueden influir cada uno de ellos en la exposición ambiental de profilina

En primer lugar, no se encontró relación de la concentración de aire en profilina y la cantidad de lluvia ya que presentó un coeficiente de correlación de *Spearman* de 0,083 ($p=0,115$). Según se representa en la Figura V-44.

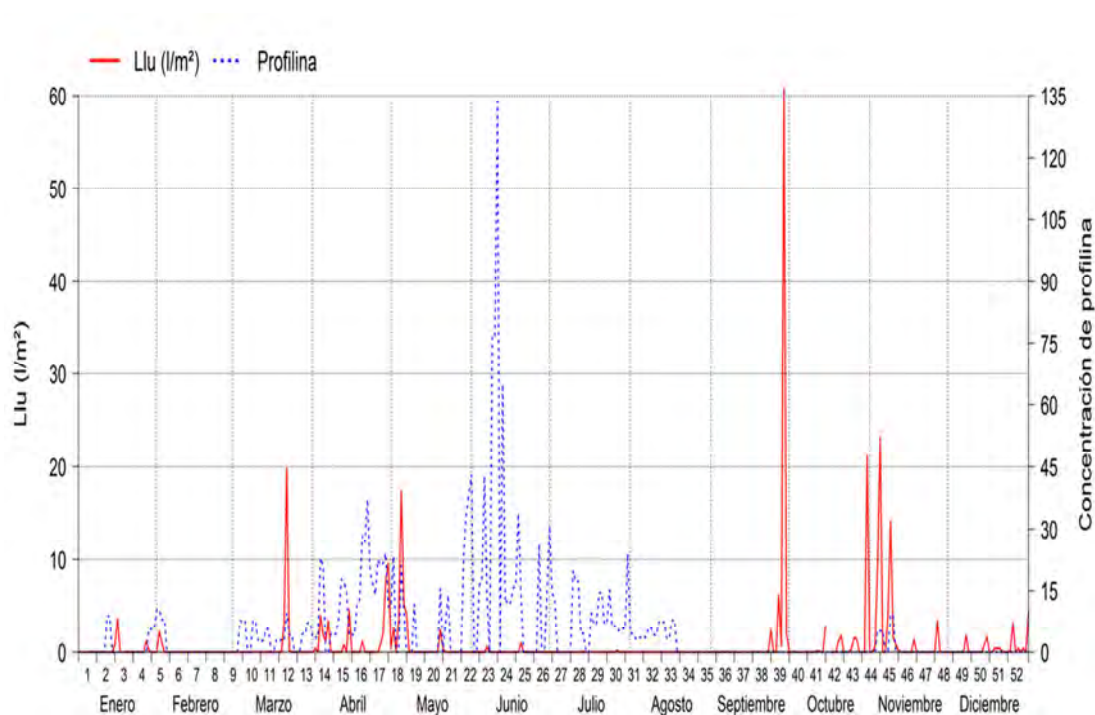


Figura V-44 Pluviosidad anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

En el caso de la Humedad sí se encontró una correlación negativa entre la humedad relativa en ambiente (HR%) y la profilina detectada, si bien, ésta fue muy reducida con un coeficiente de correlación de *Spearman* de -0,22 ($p<0,001$) (Figura V-45).

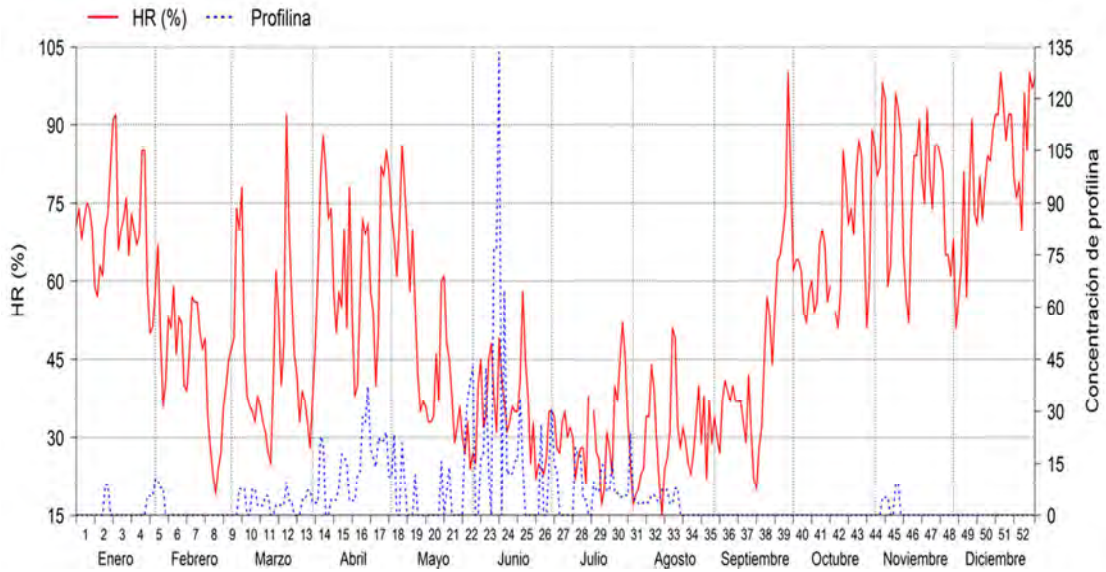


Figura V-45 Humedad Relativa anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

También se observó una cierta correlación positiva entre la temperatura (T_{mp}) y la velocidad del viento (V_v) con la concentración de profilina en ambiente, con un coeficiente de correlación de 0,22 y 0,20 respectivamente ($p > 0,001$) (Figuras V-46 y V-47).

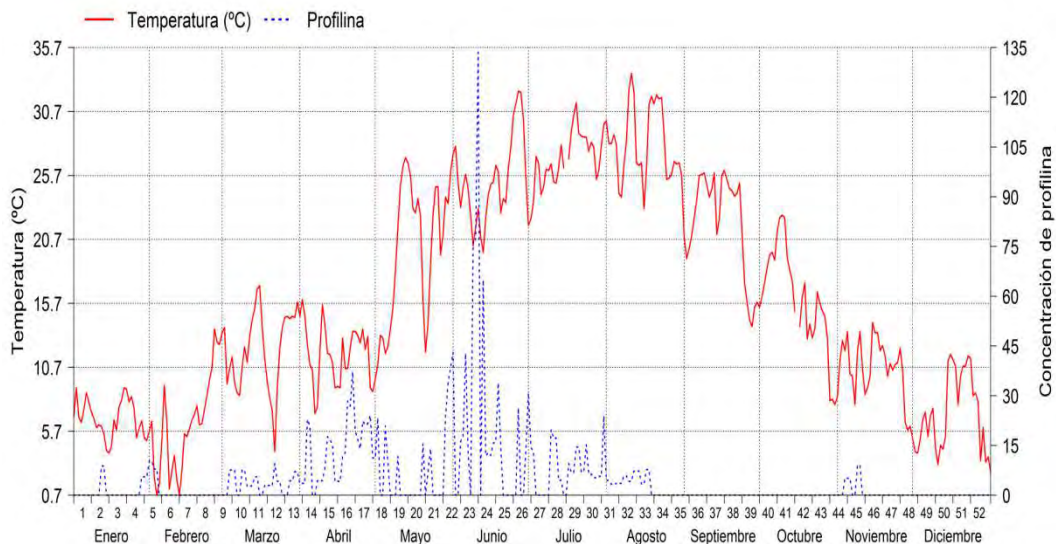


Figura V-46 Temperatura anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

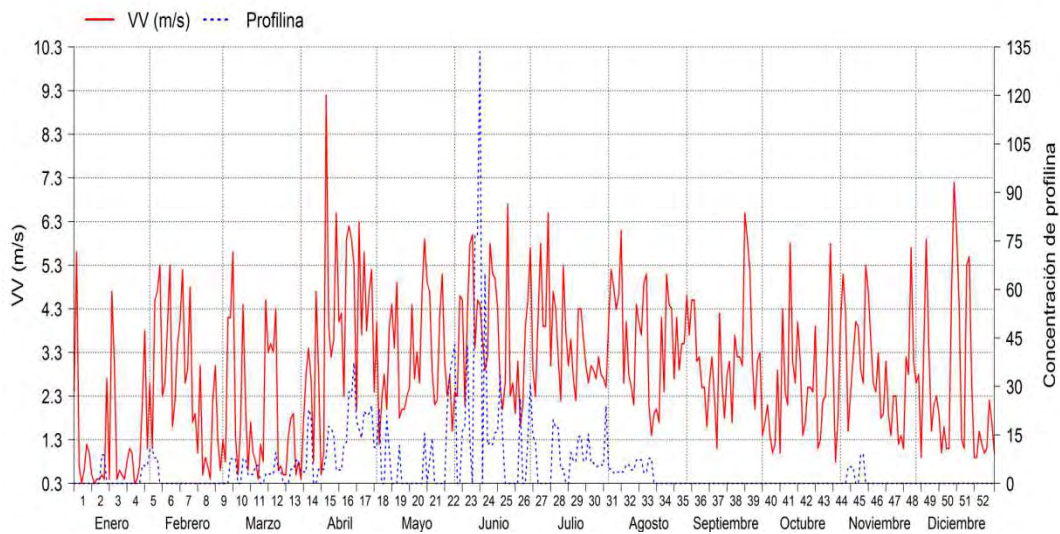


Figura V-47 Velocidad del viento anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

La relación de la concentración de profilina en ambiente con las radiaciones solares (RS) y el ozono (O3) fue más importante, de forma que el coeficiente de correlación de *Spearman* fue de 0,40 en ambos casos ($p > 0,001$) (Figuras V-48 y V-49).

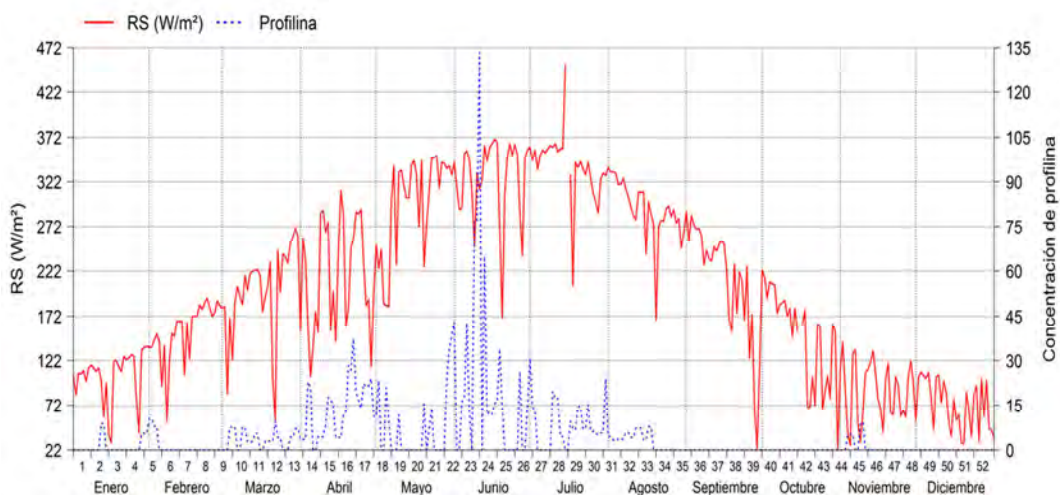


Figura V-48 Radiaciones solares a lo largo del año en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

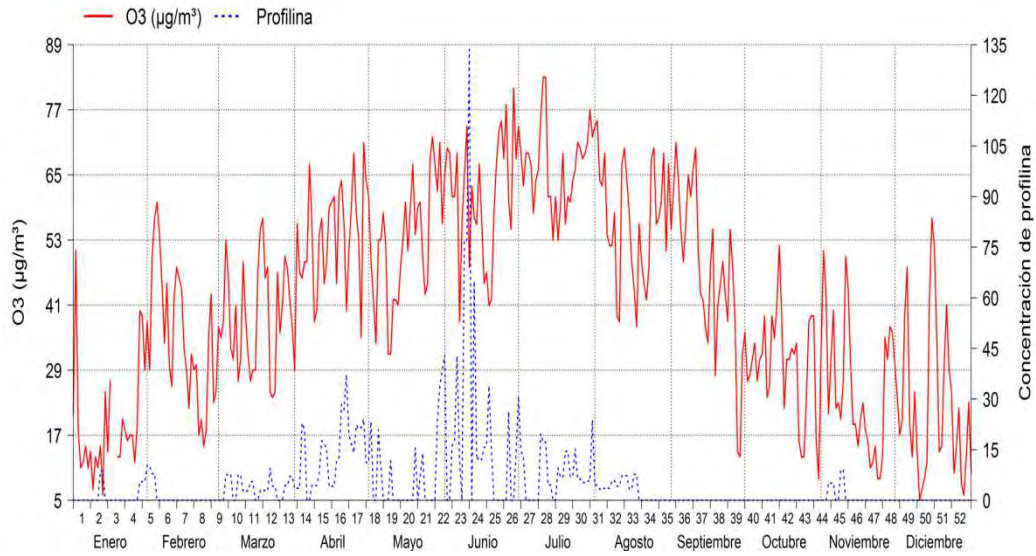


Figura V-49 Concentración de ozono anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

En el caso de las partículas en suspensión de menos de 2,5 micras (PM_{2,5}) y la presión barométrica (Pre) se encontró una cierta correlación negativa con un coeficiente de correlación de -0,31 y -0,24 respectivamente ($p < 0,001$) (Figuras V-50 y V-51)

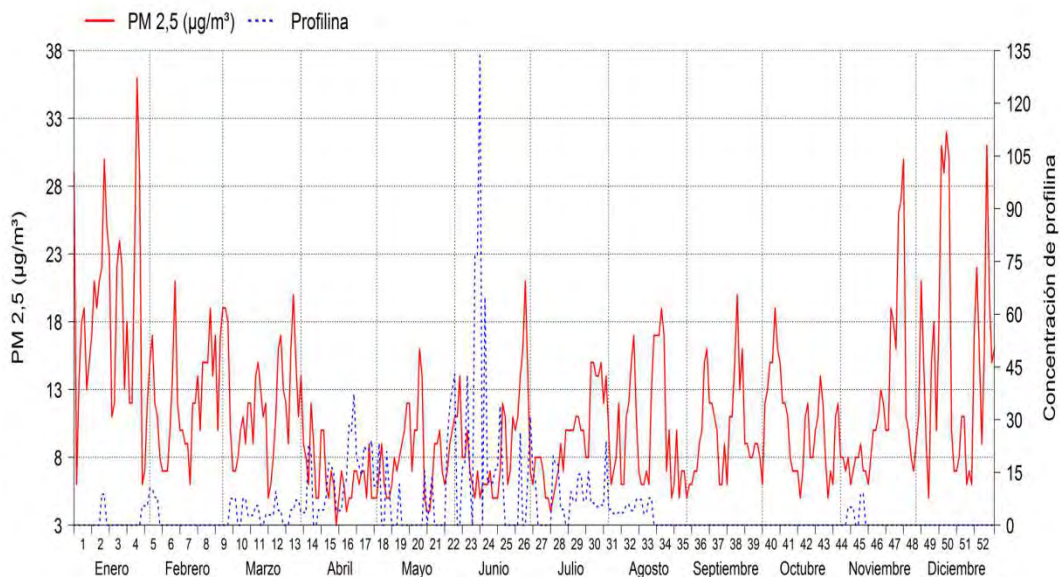


Figura V-50 Partículas en suspensión de menos de 2,5 micras anuales en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

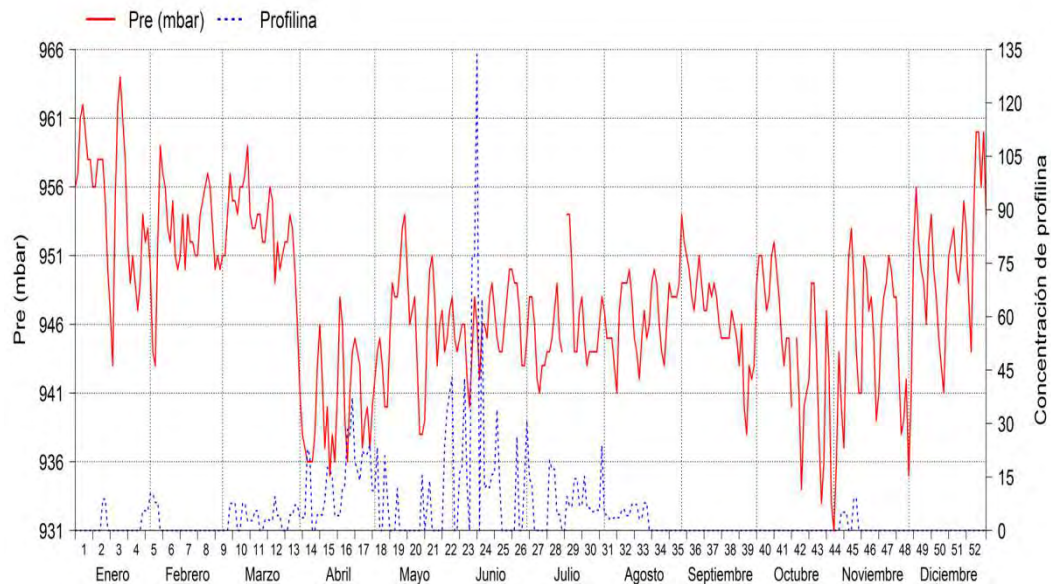


Figura V-51 Presión barométrica anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

También se encontró una cierta correlación negativa entre la concentración de profilina en ambiente con el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el monóxido de nitrógeno con un coeficiente de correlación de -0,3 y -0,31 respectivamente (Figuras V-52 y V-53).

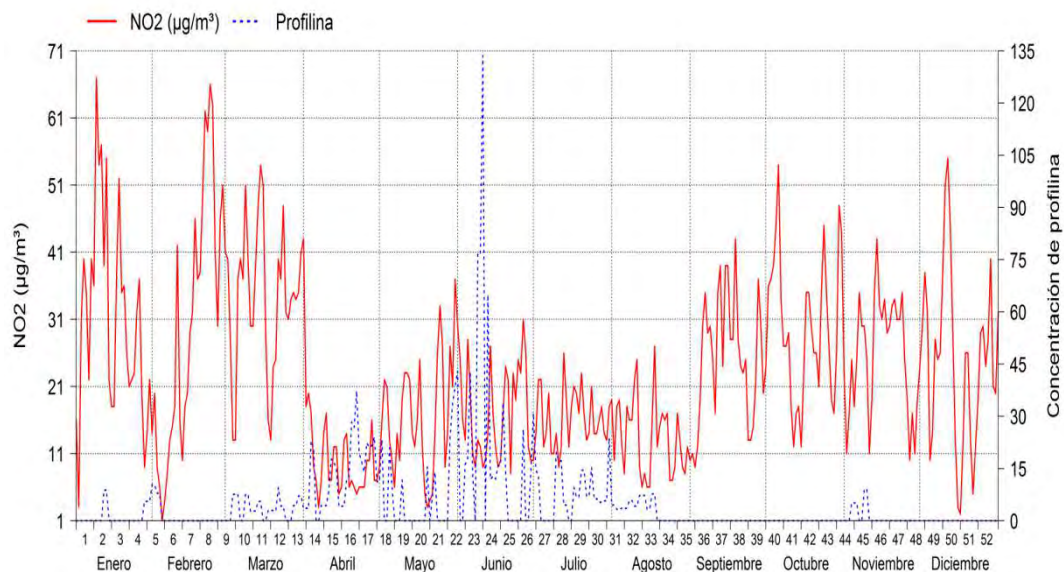


Figura V-52 Concentración de dióxido de carbono anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

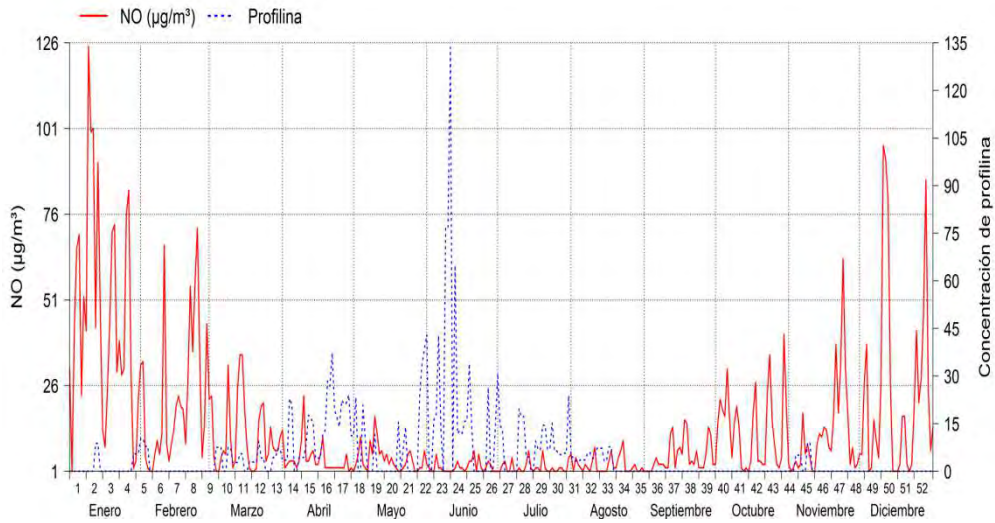


Figura V-53 Concentración de monóxido de nitrógeno anual en comparación con la concentración de profilina en ambiente en Valdemoro.

En la Tabla V-51 se encuentra el resumen de los resultados de correlación entre los distintos parámetros medioambientales y la concentración de profilina con los coeficientes de correlación de *Spearman* y sus respectivos valores de *p*.

Variable	Coef.	P
Llu - l/m ²	0.083	0.115
HR - %	-0.216	<0.001
Tmp - °C	0.225	<0.001
VV - m/s	0.205	<0.001
RS - W/m ²	0.397	<0.001
O3 - µg/m ³	0.401	<0.001
PM2,5 - µg/m ³	-0.310	<0.001
Pre - mbar	-0.238	<0.001
NO ₂ - µg/m ³	-0.307	<0.001
NO - µg/m ³	-0.312	<0.001

Tabla V-51 Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros medioambientales y concentración de profilina en ambiente.

V.6 Estudios clínicos. Registro de síntomas.

Según metodología descrita anteriormente, durante el periodo de seguimiento, durante el cual se recogieron los parámetros medioambientales, los pacientes realizaron un registro de síntomas con el fin de intentar correlacionar estos datos.

El registro de los síntomas se agrupó en síntomas oculares, síntomas nasales, síntomas bronquiales y síntomas totales. El análisis de los datos se realizó de dos formas:

- Mediante la media de la suma de las intensidades (Figura V-54).
- Mediante el porcentaje de pacientes que presentan alguno de los síntomas (Figura V-55).

Las siguientes gráficas muestran el análisis descriptivo de los resultados encontrados:

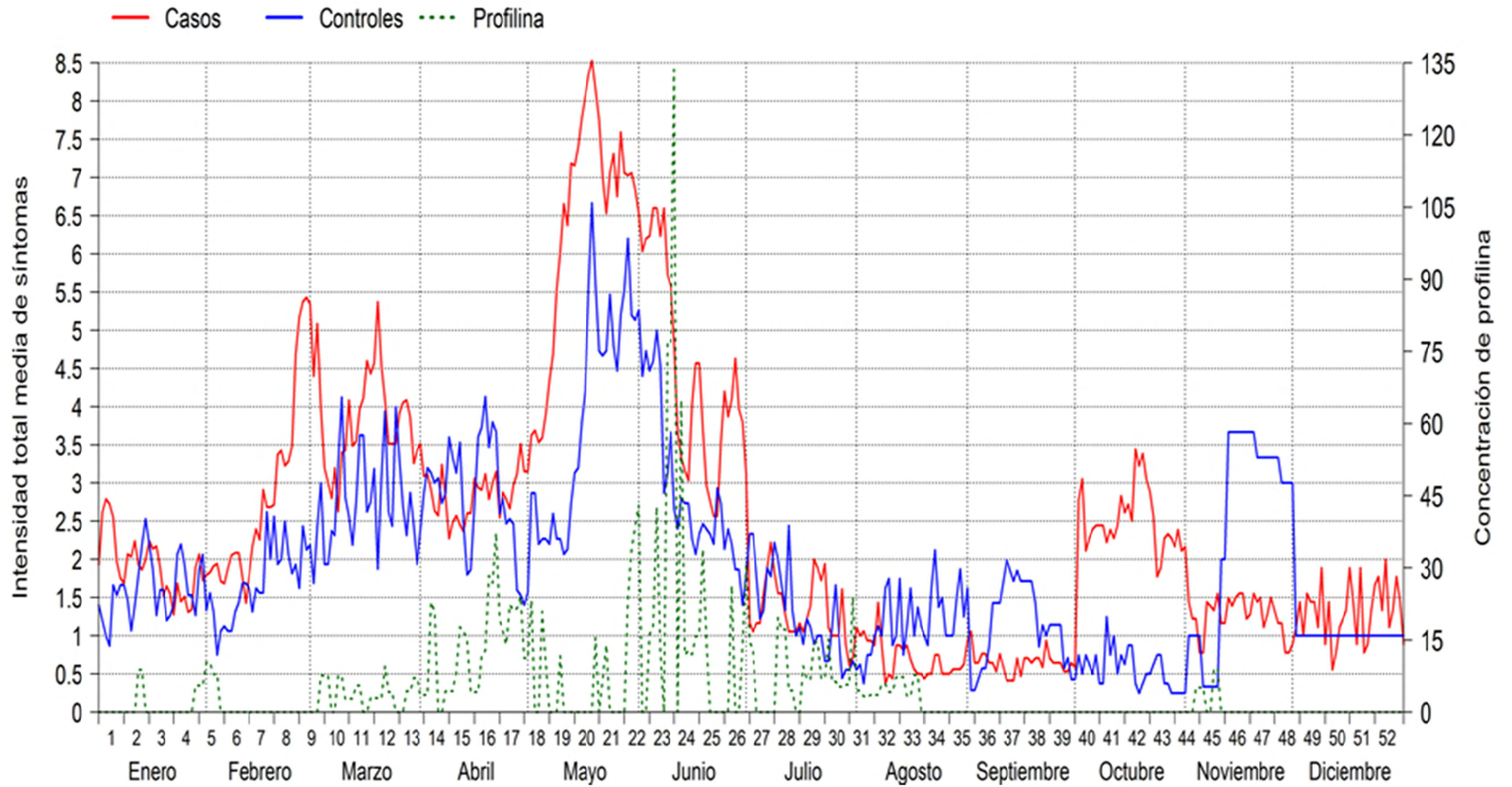


Figura V-54 Intensidad total media de todos los síntomas en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

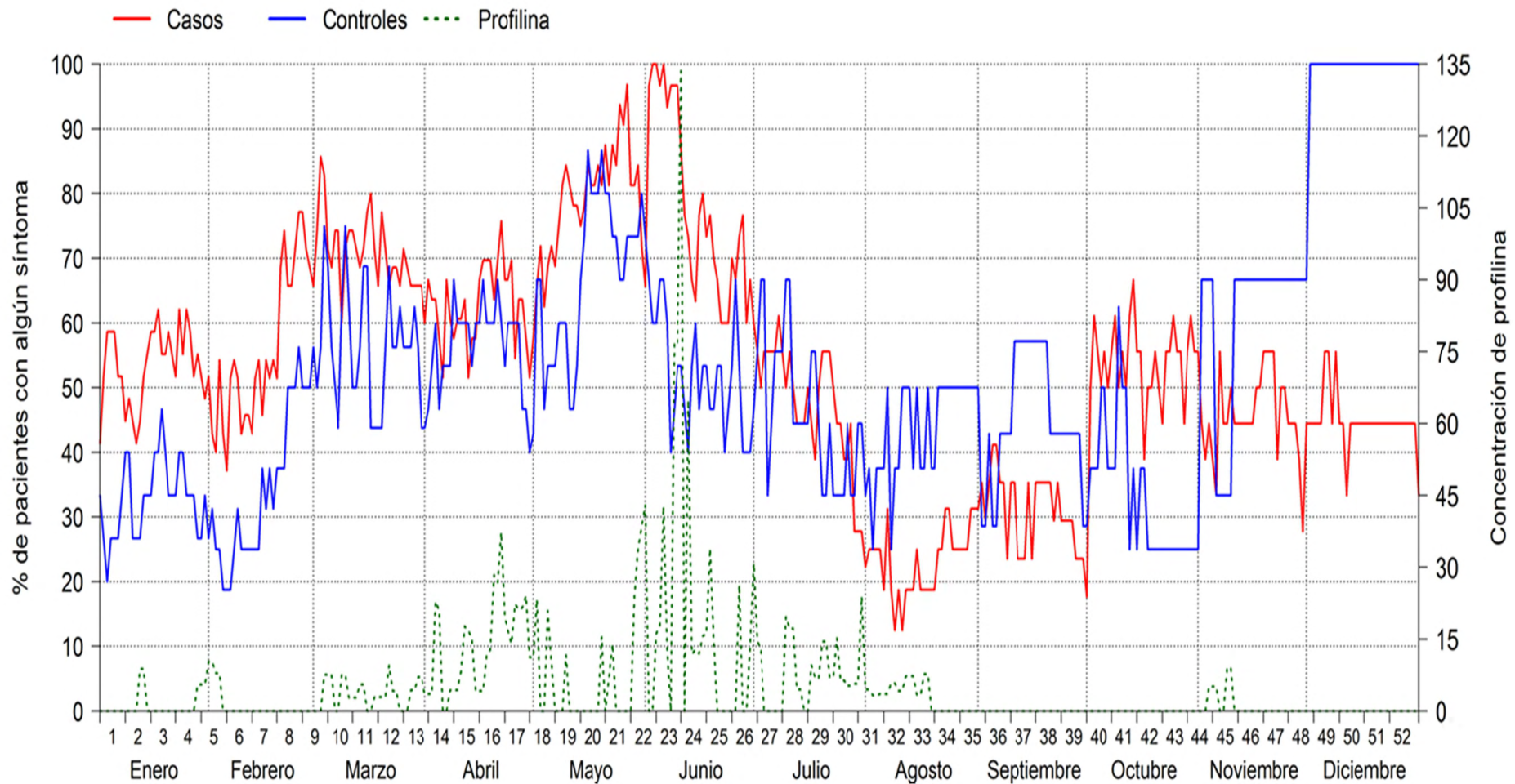


Figura V-55 Porcentaje de pacientes con algún síntoma en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

Síntomas nasales (Figuras V-56 y V-57):

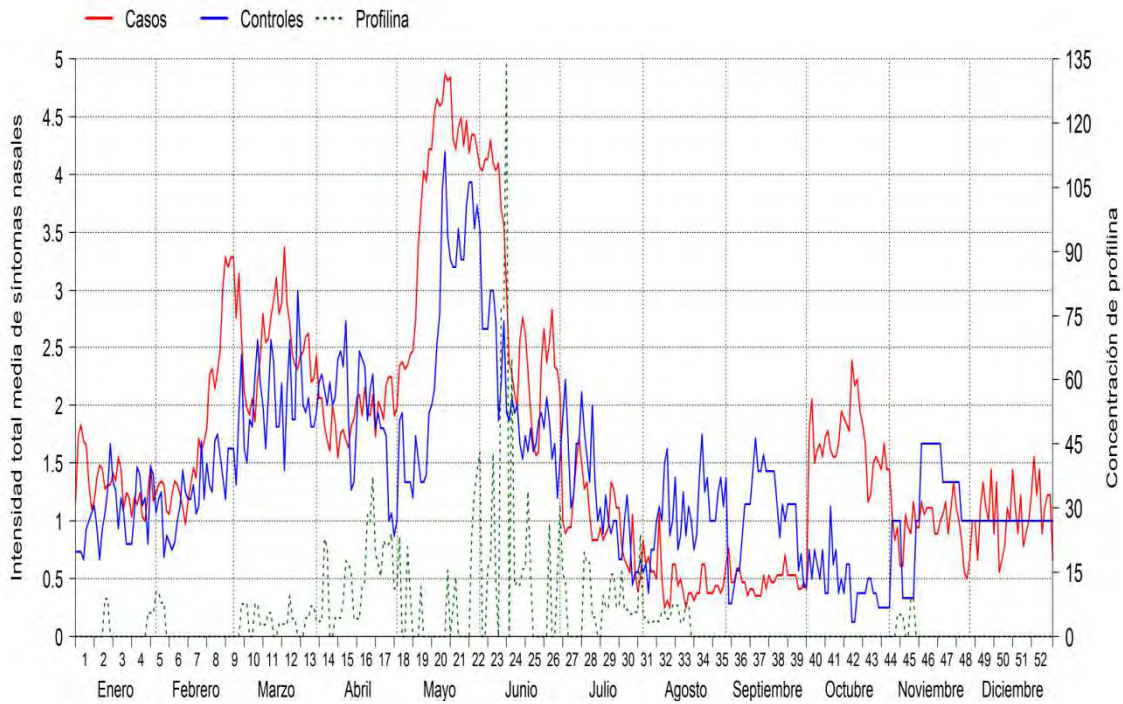


Figura V-56 Intensidad total media de los síntomas nasales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

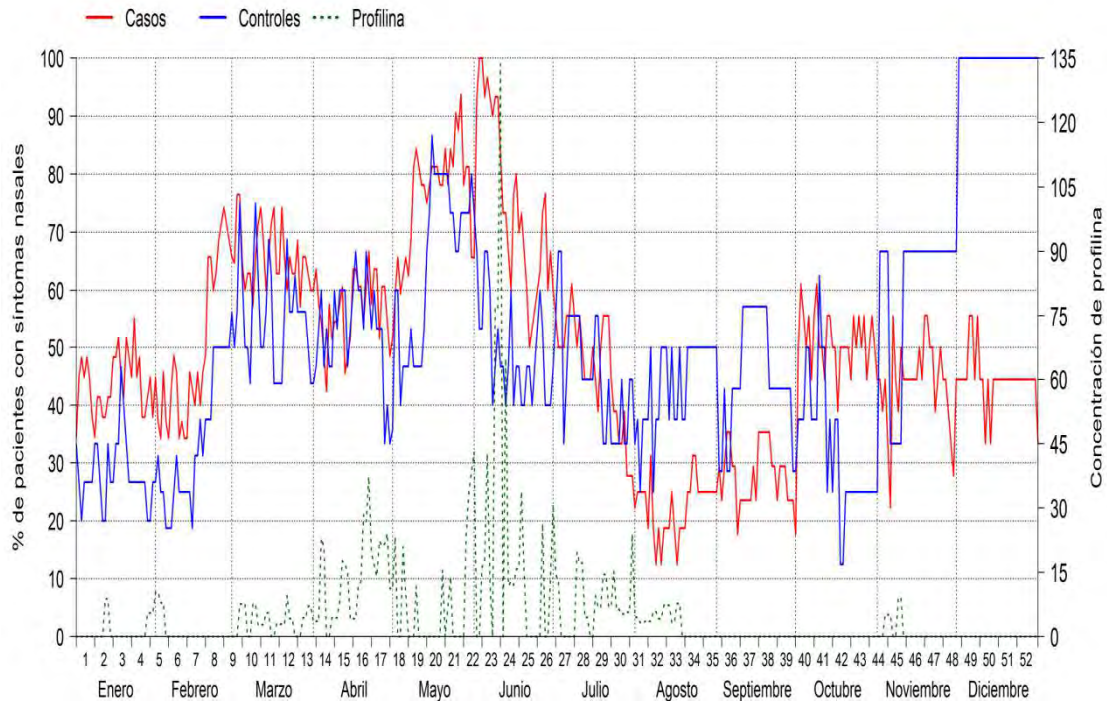


Figura V-57 Porcentaje de pacientes con síntomas nasales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

Síntomas Oculares (Figuras V-58 y V-59):

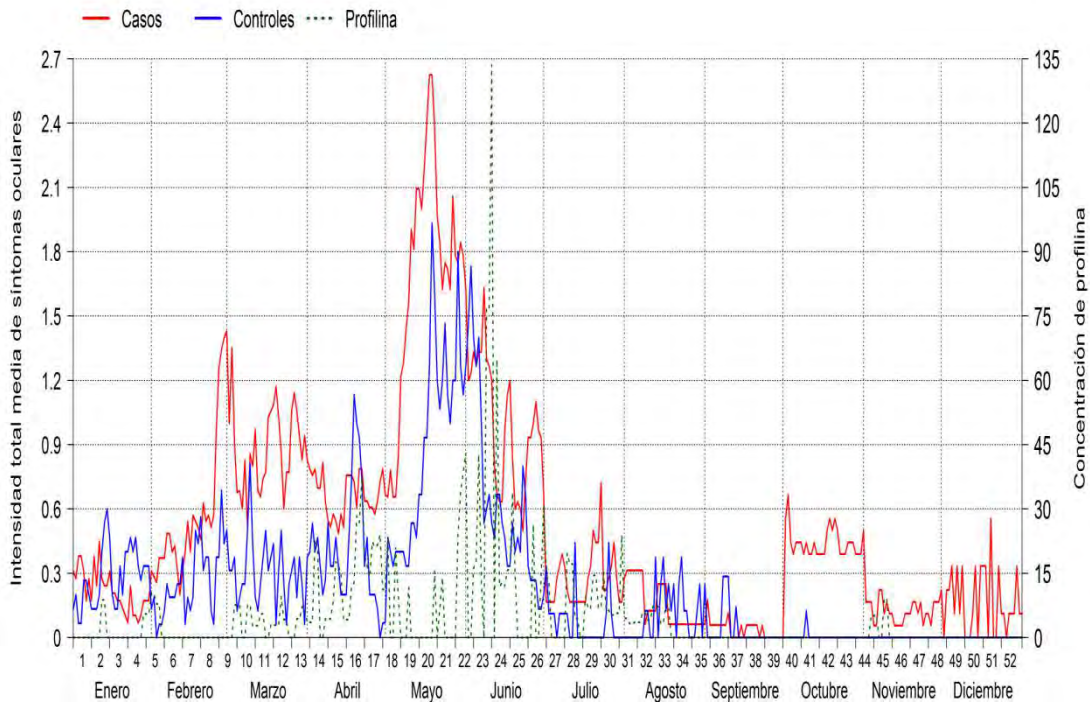


Figura V-58 Intensidad total media de los síntomas oculares en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

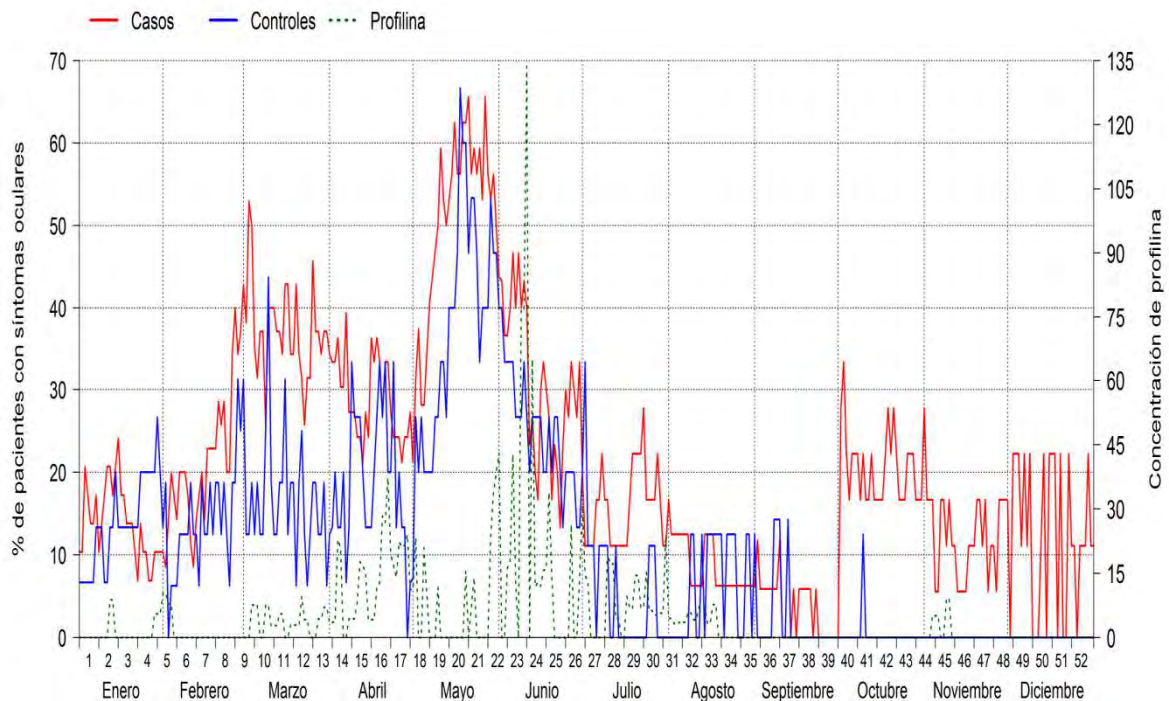


Figura V-59 Porcentaje de pacientes con síntomas oculares en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

Síntomas bronquiales (Figuras V-60 y V-61).

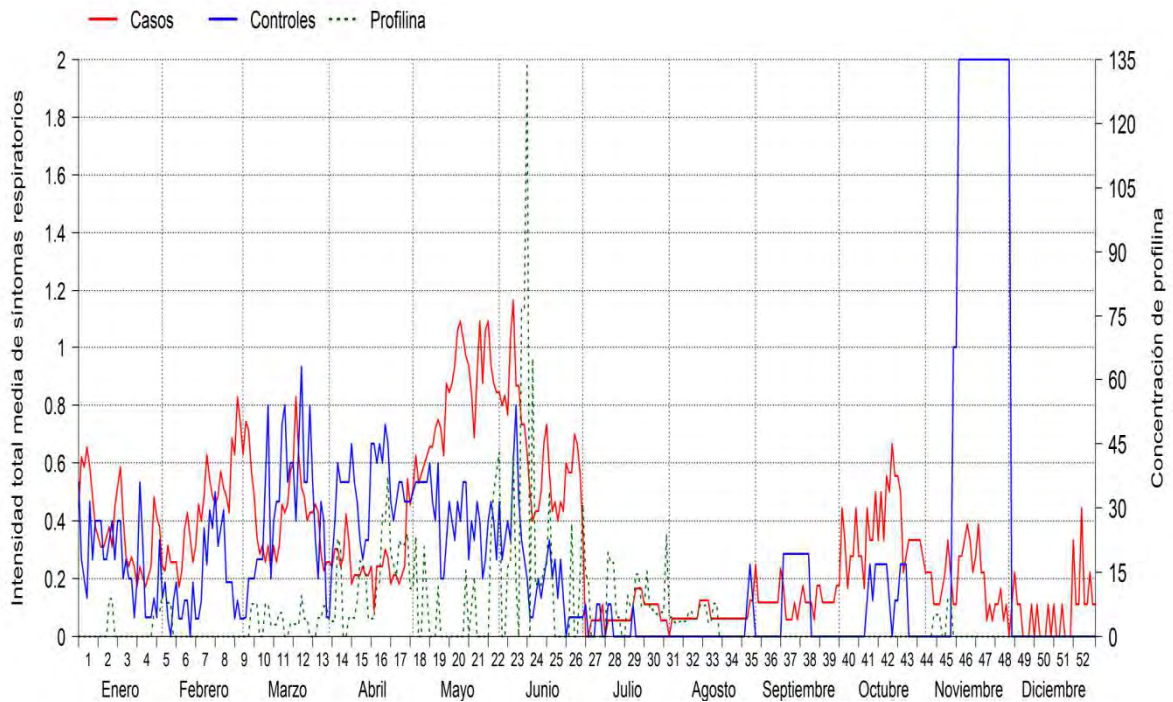


Figura V-60 Intensidad total media de los síntomas bronquiales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

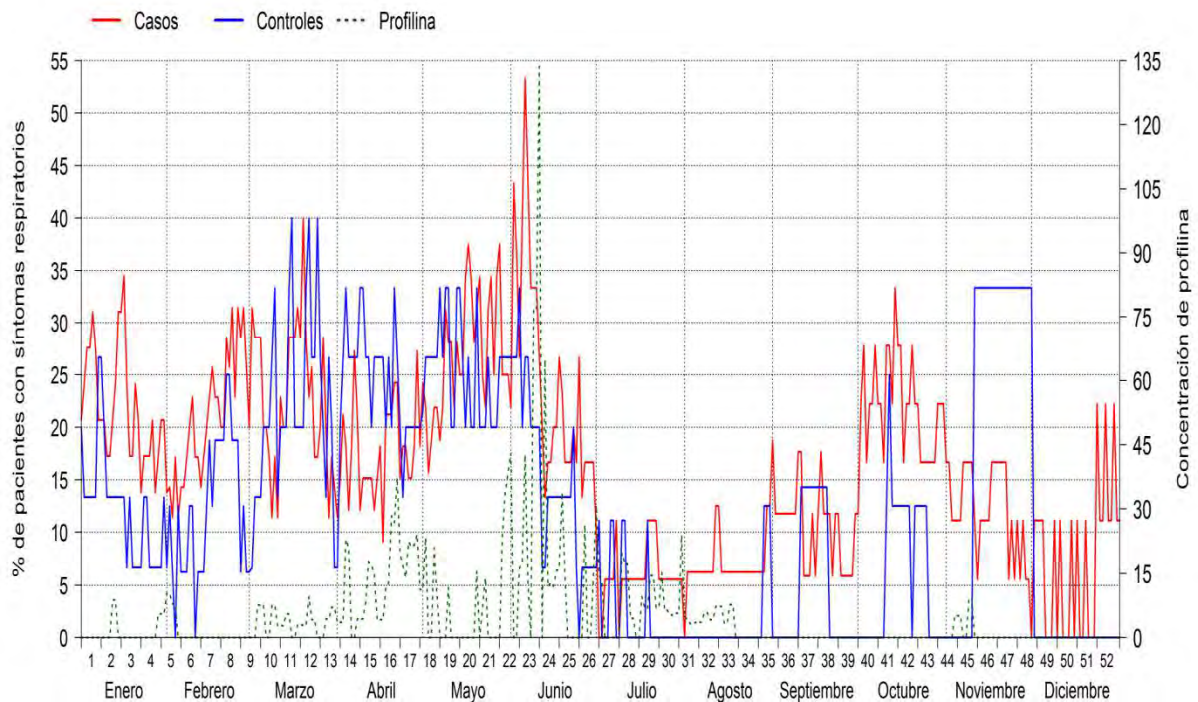


Figura V-61 Porcentaje de pacientes con síntomas bronquiales en casos y controles comparados con la concentración de profilina en ambiente.

Las comparaciones entre casos y controles se realizaron mediante modelos que tuvieran en cuenta el factor mes. De esta forma obtuvimos una comparación entre los casos y los controles independientemente del mes, y además obtuvimos una media de la evolución temporal.

Para la variable en la que se evaluaron media de la suma de las intensidades utilizamos modelos de regresión lineal, ya que esta variable se asemejaba a una variable cuantitativa.

En el caso intensidad total media de síntomas se observó un coeficiente de 0,56 con un IC95% 0.43-0.70. Lo que significa que independientemente del mes del año, la intensidad media de los síntomas en los casos fue en promedio 0.56 puntos superior al de los controles, siendo esta diferencia ES ($p < 0.001$).

La media de la intensidad de los síntomas nasales en los casos fue 0,26 puntos superior, independientemente del mes del año con IC95% 0.18-0.34 ($p < 0.001$).

Los síntomas oculares, también presentaron de media de intensidad 0,27 puntos más en los casos que en los controles independientemente del mes con IC95% 0.23-0.31 ($p < 0.001$)

Los síntomas bronquiales no presentaron una intensidad media estadísticamente superior en los casos que en los controles

Estos datos se resumen en la Tabla V52.

	Coef.	(IC 95%)	P
Total de síntomas	0.56	(0.43, 0.70)	<0.001
Síntomas nasales	0.26	(0.18, 0.34)	<0.001
Síntomas oculares	0.27	(0.23, 0.31)	<0.001
Síntomas bronquiales	0.03	(-0.02, 0.07)	0.229

Tabla V-52 Coeficientes de regresión lineal de la media de intensidad de síntomas de los casos con respecto a los controles.

Se realizó un análisis para estudiar si los pacientes presentaban o no cada uno de los síntomas en cada uno de los días del año, por lo que se expresó en una variable mediante el porcentaje de pacientes que presentan alguno de los síntomas. En este

caso se utilizaron modelos de regresión logística, ya que la variable era una binomial. Los datos aparecen resumidos en la Tabla V-53

En este sentido se observó que el riesgo de que un paciente presentara alguno de los síntomas independientemente del mes fue un 20% superior en los casos que en los controles OR 1,20 IC 95%: 1.12- 1.28 ($p<0.001$) (Tabla V-53).

Los casos presentaron 15% más días síntomas nasales que los controles, OR 1,15 1.08- 1.23 ($p<0.001$)

Los casos presentaron un 62% más de riesgo de presentar síntomas oculares que los controles, independientemente del mes del año con OR 1,62 IC95% 1.47, 1.79 ($p<0.001$)

Por último, los casos tuvieron un riesgo de presentar síntomas bronquiales superior al de los casos con una OR 1.32 IC95% 1.19-1.46 ($p<0.001$).

	OR	(IC 95%)	P
Total de síntomas	1.20	(1.12, 1.28)	<0.001
Síntomas nasales	1.15	(1.08, 1.23)	<0.001
Síntomas oculares	1.62	(1.47, 1.79)	<0.001
Síntomas bronquiales	1.32	(1.19, 1.46)	<0.001

Tabla V-53 Coeficientes de correlación logística en la comparación de presencia de síntomas en casos y controles.

V.6.1 Relación síntomas con profilina en ambiente.

Con la intención de valorar si la profilina en el ambiente era la responsable de este aumento en la intensidad o en riesgo de presentar síntomas, se introdujo la profilina como variable explicativa en los modelos de regresión. La idea era ver si independientemente de los otros dos factores (tipo de paciente y mes) la concentración de profilina se asociaba con la intensidad de los síntomas o con la probabilidad de presentar alguno de los síntomas.

En el caso de la profilina como variable cuantitativa se observó que no existe una relación ES entre la concentración de profilina y las respuestas (intensidad total media y proporción de pacientes con síntomas) (Tabla V-54)

	Intensidad total media			Presencia de síntomas		
	Coef.	(IC 95%)	P	OR	(IC 95%)	P
Total de síntomas	0.00	(-0.00, 0.01)	0.270	1.00	(1.00, 1.00)	0.566
Síntomas nasales	0.00	(-0.00, 0.00)	0.140	1.00	(1.00, 1.00)	0.535
Síntomas oculares	0.00	(-0.00, 0.00)	0.297	1.00	(1.00, 1.01)	0.355
Síntomas bronquiales	0.00	(-0.00, 0.00)	0.838	1.00	(1.00, 1.00)	0.559

Tabla V-54 Estadística de correlación entre la concentración de profilina en ambiente con la intensidad media de los síntomas y la presencia de síntomas.

En este sentido, se estudió una posible correlación de los síntomas de los pacientes con la profilina como variable cualitativa, para evaluar si la presencia de profilina en el ambiente puede explicar el aumento de síntomas de los pacientes. No se encontró una correlación estadísticamente significativa. Tampoco cuando los estudios se hicieron con niveles medios o altos de profilina, es decir, mayor de 5 ng y 10 ng de profilina en el filtro respectivamente (0,02 y 0,04 ng / m³ de aire).

Presencia de Profilina (sí/no)						
	Intensidad total media			Presencia de síntomas		
Total de síntomas	-0.17	(-0.36, 0.01)	0.065	0.95	(0.88, 1.03)	0.193
Síntomas nasales	-0.08	(-0.19, 0.03)	0.141	0.96	(0.89, 1.03)	0.261
Síntomas oculares	-0.01	(-0.06, 0.04)	0.662	0.97	(0.87, 1.07)	0.523
Síntomas bronquiales	-0.08	(-0.14, -0.02)	0.008	0.91	(0.81, 1.02)	0.120
Profilina (>5 ng /filtro)						
	Intensidad total media			Presencia de síntomas		
Total de síntomas	-0.17	(-0.35, 0.01)	0.059	0.97	(0.91, 1.05)	0.477
Síntomas nasales	-0.09	(-0.19, 0.02)	0.103	0.97	(0.90, 1.04)	0.371
Síntomas oculares	-0.01	(-0.06, 0.03)	0.558	0.98	(0.89, 1.08)	0.741
Síntomas bronquiales	-0.07	(-0.12, -0.01)	0.021	0.95	(0.85, 1.06)	0.326
Profilina (>10 ng /filtro)						
	Intensidad total media			Presencia de síntomas		
Total de síntomas	0.08	(-0.16, 0.32)	0.516	1.02	(0.93, 1.11)	0.709
Síntomas nasales	0.06	(-0.08, 0.20)	0.404	1.02	(0.93, 1.12)	0.651

Síntomas oculares	0.01	(-0.06, 0.07)	0.872	0.98	(0.87, 1.10)	0.727
Síntomas bronquiales	0.01	(-0.06, 0.09)	0.746	1.00	(0.86, 1.14)	0.944

Tabla V-55 Estadística de correlación entre la profilina como variable cualitativa con la intensidad media de los síntomas y la presencia de síntomas.

Teniendo en cuenta que los casos presentan mayor media de síntomas que los controles, se realizó un estudio estadístico para evaluar el efecto de la profilina y el mes en la diferencia entre los síntomas totales medios de casos y controles, Para lo que se tomó como variable la media diaria de los casos menos la media diaria de los controles, y como variables explicativas la profilina y el mes. En este caso, nuevamente se hicieron varios modelos tomando la profilina en modo cuantitativo y en modo cualitativo, en modo cualitativo se tomó la presencia/ausencia de profilina, por encima o debajo de 5 y profilina por encima o debajo de 10 (Tabla V-56).

Profilina cuantitativo/ síntomas			
Intensidad total media			
	Coef.	(IC 95%)	P
Total de síntomas	0.00	(-0.01, 0.01)	0.759
Síntomas nasales	0.00	(-0.01, 0.00)	0.838
Síntomas oculares	0.00	(0.00, 0.00)	0.275
Síntomas bronquiales	0.00	(0.00, 0.00)	0.711
Presencia de Profilina (sí/no)			
	Intensidad total media		
Total de síntomas	0.07	(-0.17, 0.3)	0.589
Síntomas nasales	0.01	(-0.13, 0.15)	0.858
Síntomas oculares	-0.05	(-0.12, 0.02)	0.128
Síntomas bronquiales	0.10	(0.02, 0.19)	0.020
Profilina (>5 ng /filtro)			
	Intensidad total media		
Total de síntomas	-0.04	(-0.26, 0.19)	0.752
Síntomas nasales	-0.04	(-0.18, 0.09)	0.549
Síntomas oculares	-0.09	(-0.16, -0.03)	0.007
Síntomas bronquiales	0.10	(0.01, 0.18)	0.023
Profilina (>10 ng /filtro)			

	Intensidad total media		
Total de síntomas	-0.16	(-0.47, 0.14)	0.298
Síntomas nasales	-0.02	(-0.20, 0.16)	0.846
Síntomas oculares	-0.10	(-0.19, -0.01)	0.026
Síntomas bronquiales	-0.04	(-0.15, 0.07)	0.476

Tabla V-56 Estadística de correlación entre la profilina como variable cuantitativa/cualitativa con la diferencia en la intensidad media de los síntomas de casos y controles.

En este caso solo se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en los síntomas respiratorios, de forma que en presencia de profilina en ambiente la diferencia en la intensidad de los síntomas respiratorios entre casos y controles fue mayor que en su ausencia una media de 0,10 puntos IC95%:0.02-0.19 p=0.020. Estos resultados se corroboraron cuando la profilina en ambiente era superior a 0,02 ng / m³ de aire, de forma que, en este caso, los síntomas bronquiales de los casos tuvieron una intensidad media 0,10 superior a los de los casos con IC: 0.01-0.18 (p=0.023)

También se obtuvo una diferencia ES en los síntomas oculares, en este caso la presencia de profilina en ambiente mayor de 0,02 y mayor de 0,04 se asoció con una mayor intensidad de los síntomas oculares en los controles que en los casos una media de 0,9 y 0,10 puntos respetivamente (Tabla V-56).

Se estudió el efecto de las variables medioambientales en la diferencia entre los síntomas nasales totales medios de casos y controles. Se tomó como variable respuesta la media diaria de los casos menos la media diaria de los controles, y como variables explicativas el mes y cada una de las variables medioambientales. El objetivo de estos análisis fue estudiar si alguna de las variables medioambientales se asociaba con una mayor o menor diferencia entre casos y controles, en relación con la intensidad de los síntomas. En la Tabla V-57 se presentan los resultados, de forma que no se encontraron resultados estadísticamente significativos

	Coef.	(I.C. 95%)	P
Llu - l/m²	0.001	(-0.002, 0.005)	0.427
HR - %	0.000	(-0.001, 0.001)	0.438
Tmp - °C	0.004	(0.000, 0.008)	0.057
VV - m/s	0.008	(-0.001, 0.017)	0.079
RS - W/m²	0.000	(0.000, 0.000)	0.367

O₃ - µg/m³	0.000	(-0.001, 0.001)	0.857
PM_{2,5} - µg/m³	-0.002	(-0.004, 0.001)	0.218
Pre - mbar	0.001	(-0.002, 0.005)	0.410
NO₂ - µg/m³	0.000	(-0.002, 0.001)	0.559
NO - µg/m³	0.000	(-0.001, 0.001)	0.856

Tabla V-57 Correlación de las variables medioambientales en la diferencia entre los síntomas nasales totales medios de casos y controles.

Por último, se intentó correlacionar la intensidad de los síntomas con los niveles de rPhl p 12 y rBet v 2 de cada uno de los casos sin que se detectara relación ES.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio se realizó un abordaje integral de la relevancia de la profilina en pacientes con alergia respiratoria producida por polen, abarcando cuatro dimensiones: estudios *in vitro*, *in vivo*, estudios aerobiológicos y clínicos obteniendo resultados en estos cuatro aspectos que aportan luz al respecto.

El estudio se desarrolla en pacientes con rinoconjuntivitis con o sin asma por alergia a pólenes con sensibilización a profilina comparado con un grupo control no sensibilizado a este panalérgeno, mediante una prueba cutánea en *prick*, en los que:

- Se ha confirmado ***in vitro*** la presencia de IgE específica sérica frente a distintas profilinas.
- Se ha confirmado, ***in vivo***, que en estos pacientes sensibilizados, las profilinas son capaces de producir una respuesta alérgica específica en órganos diana como son los bronquios y la conjuntiva.
- Se evidencia que la respuesta alérgica específica se puede producir en la vida diaria de los pacientes, ya que se detectó la **presencia de profilina en el ambiente** a lo largo del año en el **estudio aerobiológico** de la zona estudiada.
- Por último, de acuerdo a las características clínicas que se detectaron en los pacientes del estudio, se puede decir que **los pacientes sensibilizados a profilina presentaron una mayor intensidad de los síntomas respiratorios, conjuntivales, nasales y bronquiales, con una mayor frecuencia de los mismos**, pudiendo ser la sensibilización cutánea en *prick* a profilina un marcador de gravedad clínica en pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma alérgica.

Todo ello nos permite afirmar que se ha completado un estudio que abarca de forma integral la relevancia clínica de la profilina en pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes. Partiendo de una prueba que demuestra sensibilización a profilina de una forma sencilla, accesible y fácilmente reproducible como es el *prick*, se obtiene un marcador de gravedad de enfermedad que puede ser muy relevante en el manejo clínico de estos pacientes (Figura VI-1).

Según la bibliografía revisada, es la primera vez que la capacidad de profilina para inducir síntomas alérgicos se ha demostrado en pacientes con alergia al polen en la vida real. Esto se consiguió cuantificando los niveles de profilina en el medio ambiente y correlacionándolos con los síntomas clínicos de los pacientes alérgicos al polen. En

este estudio se demuestra que la profilina ambiental es capaz de inducir una respuesta alérgica específica a nivel respiratorio evidenciada por las provocaciones bronquiales y conjuntivales. Además, los pacientes sensibilizados a este alérgeno mostraron más síntomas y eran más propensos a tener síntomas. Por lo tanto, la sensibilización a la profilina puede considerarse un marcador de gravedad en pacientes con rinoconjuntivitis y asma por alergia al polen(198).

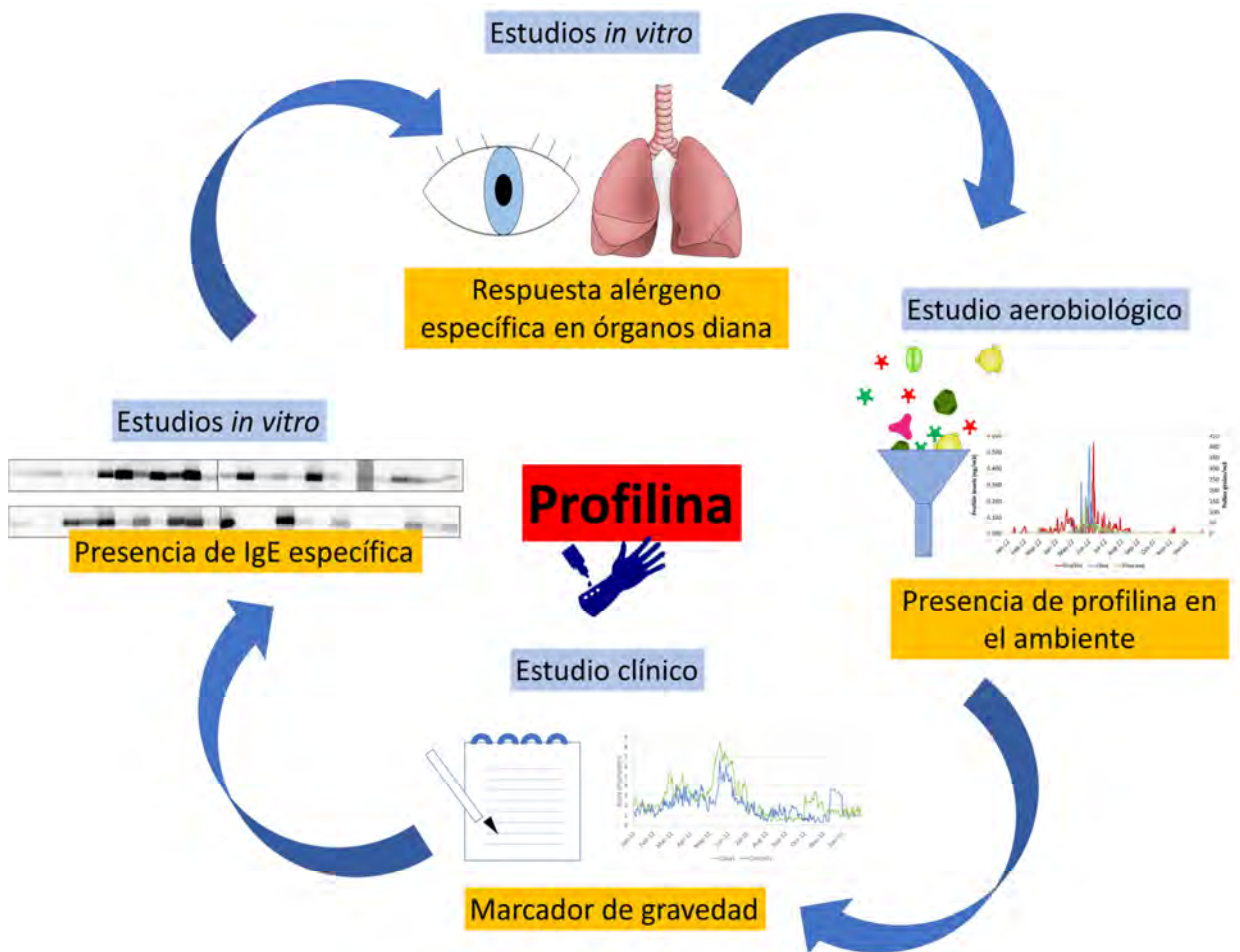


Figura VII-1 Secuencia metodológica del estudio de relevancia clínica de la profilina.

VII.1 Importancia de la secuencia metodológica del estudio

La secuencia metodológica es coherente con los objetivos del estudio y sigue la trayectoria necesaria para asegurar que una proteína es capaz de producir una respuesta alérgica IgE específica con relevancia clínica en los pacientes con polinosis.

En primer lugar es necesario corroborar que la profilina se comporta como un aeroalérgeno, es decir, si puede ser reconocida por el sistema inmune de pacientes alérgicos al polen y presentan anticuerpos IgE específicos frente a la profilina. Para lo que será necesario el **estudio *in vitro***, con determinación de IgE específica frente a distintas profilinas.

Pero, la presencia de IgE específica frente a una fuente alergénica no siempre es clínicamente relevante, de hecho la concentración de IgE específica de alérgeno no está estrechamente relacionada con la respuesta clínica tal y como se observó en un estudio realizado con pruebas de provocación nasal y conjuntival con polen de gramíneas en el que no se pudo establecer una relación dosis-respuesta (176). De esta forma tal y como sugieren algunos autores, las determinaciones serológicas no son diagnósticas de alérgica, los anticuerpos IgE son necesarios, pero no suficientes para la manifestación de síntomas alérgicos, ya que, pueden existir múltiples variables asociadas con el medio ambiente (heterogeneidad de alérgenos y niveles de exposición) o con el paciente (heterogeneidad de respuesta inmune) que puedan influir en la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos en un paciente alérgico, por lo que la determinación de IgE específica en sangre, por sí sola no es suficiente para predecir enfermedad alérgica sintomática(177). Teniendo esto en cuenta, son necesarios estudios *in vivo*.

De esta forma los **estudios *in vivo*** son necesarios para conocer si ese aeroalérgeno es capaz de producir una respuesta clínica en pacientes sensibilizados. Para ello se realizaron tanto las provocaciones conjuntivales como las bronquiales con extracto de profilina.

Una vez conocida la alergenicidad de una proteína es necesario demostrar el grado de exposición que los pacientes tienen a la misma, por lo que el siguiente paso sería el **estudio aerobiológico**, con el que se estudia si en el ambiente hay profilina procedente de los pólenes. Los alérgenos de los pólenes se pueden detectar en la

atmósfera independientemente de los pólenes, aunque su procedencia principal son estos. También pueden desprenderse de fragmentos de plantas, orbículas o anteras(82). De esta forma, el contenido antigénico de estos alérgenos en la atmósfera puede variar mucho y estar influenciado por las condiciones climáticas, por lo que es importante detectar y cuantificar los aeroalérgenos para poder estudiar su capacidad de causar polinosis(178).

Una vez conocido que en el ambiente existe una proteína que tiene capacidad de producir una respuesta alérgica en pacientes alérgicos al polen, es necesario conocer qué papel presenta en estos pacientes. En este sentido, al realizar los **estudios clínicos**, se tiene el objetivo de conocer si en la vida real los pacientes sensibilizados a profilina presentan peculiaridades clínicas en relación con su exposición en el ambiente y qué importancia relativa tiene en la clínica real de los pacientes. Por lo que se realizó un seguimiento de los síntomas de estos pacientes a lo largo de un año, cerrando así el círculo de la relevancia de la profilina(198) (Figura VI-1).

VII.2 Relevancia de los resultados *in vitro*.

El estudio *in vitro* demostró sensibilización a profilina (presencia de IgE específica) en el grupo de los casos y ausencia de la misma en todos los controles, de forma que, diferentes técnicas para medir IgE específica a diferentes profilinas dieron resultados muy similares, lo que implica una buena selección de los pacientes sensibilizados a profilina.

La detección de IgE específica frente a profilina se llevó a cabo por cuatro técnicas de laboratorio, en tres casos por ensayo de *ImmunoCAP*® frente a tres profilinas distintas, profilina de abedul, profilina de *Phleum* y profilina de palmera (rBet v 2, rPhl p 12 y Pho d 2 marcada con biotina respectivamente). Además, se realizó *immunoblot* frente a profilina.

Se encontró gran concordancia tanto a nivel cualitativo como cuantitativo en las 4 pruebas realizadas, encontrándose una correlación dos a dos en cada una de las pruebas de entre el 78 y el 94%. Además en el *Immunoblot* todos los pacientes Bet v 2 positivos reconocieron una banda en torno a 14 kD correspondiente a Pho d 2.

Hubo 7 de los casos (13,7%) en los que no se detectó IgE específica a profilina por ninguna de las 4 técnicas *in vitro* que se realizaron. Así como algunas discrepancias entre los diagnósticos, probablemente explicados por las limitaciones de las técnicas *in vitro*.

Por otra parte, en ninguno de los sueros de los controles se detectó IgE específica a rPhl p 12, rBet v 2 ni a Pho d 2 y tampoco se observó ninguna banda en el *immunoblot* de estos pacientes.

La relevancia del estudio *in vitro* de esta investigación no radica en la innovación de la misma, ya que se ha descrito previamente presencia de IgE específica a múltiples profilinas(119–122). La importancia de la inclusión de este apartado de la investigación en el proyecto se encuentra en la corroboración del diagnóstico de los pacientes de la muestra. Ya que en el estudio, la selección de la muestra se realizó únicamente mediante una prueba cutánea en *prick* con extracto de profilina. Era necesario corroborar que este método se correlacionaba cuando era positivo con los pacientes sensibilizados a profilina *in vitro* y cuando era negativo con pacientes no sensibilizados. Además, debido a la alta reactividad cruzada entre las distintas profilinas, solo sería necesario testar una de ellas para comprobar sensibilización a profilinas en un paciente(172,199). En este caso, diferentes profilinas dieron resultados muy similares, lo que implica una buena selección de los pacientes sensibilizados a profilina

Por lo tanto, tras este estudio *in vitro*, se puede inferir, que las pruebas cutáneas con profilina purificada puede ser una buena herramienta para seleccionar a los pacientes sensibilizados a estos alérgenos.

VII.3 Relevancia de los resultados *in vivo*.

Las provocaciones conjuntivales y bronquiales han demostrado que la profilina tiene capacidad para producir una respuesta alérgeno específica a nivel local

La capacidad de la profilina como alérgeno respiratorio de producir síntomas a nivel de la mucosa conjuntival y respiratoria, ha sido escasamente estudiada. Este estudio es consistente con estudios previos.

Previamente solo existe un estudio en el que se realizaron provocaciones conjuntivales con profilina, el estudio fue llevado a cabo en Lugo (España) por Núñez y col.(160) y obtuvieron provocaciones conjuntivales positivas con nPho d 2 en el 65% (11/17) de los pacientes sensibilizados a profilina. Este estudio tiene semejanzas y diferencias con el nuestro. Realizaron la prueba de provocación conjuntival con nPho d 2 con una metodología similar a este estudio en 17 casos (sensibilizados a profilina) y en 14 controles (no sensibilizados a profilina). En este caso la selección de los pacientes se hizo por prueba cutánea o determinación de IgE sérica a profilina. En el nuestro la selección es exclusivamente por prueba cutánea, aunque luego se realizó el estudio in vitro, pero el criterio de inclusión fue la prueba cutánea. Las concentraciones utilizadas fueron de desde 0,5 µg/mL a 50 µg/mL, siendo positivos 3 pacientes a 5 µg/mL y 8 pacientes a 50 µg/mL. Hubo 6 pacientes sensibilizados a profilina cuya provocación conjuntival se consideró negativa, aunque 4 de ellos tuvieron síntomas con la última dosis, no llegaron a alcanzar puntuación para considerar la prueba positiva. En cambio, en nuestro estudio las concentraciones utilizadas fueron de desde 0,003 µg/mL a 3 µg/mL. Fue positiva en 9 de los 10 casos sensibilizados a profilina siendo la mediana de la concentración que alcanzó la positividad de 0,3 µg/mL. Las provocaciones conjuntivales con profilina fueron negativas tanto en los controles no sensibilizados del estudio de Núñez y col. como en el nuestro.

No existe en la literatura científica otros artículos que hayan demostrado la capacidad de la profilina de producir síntomas a nivel ocular mediante pruebas de provocación conjuntival. Por lo que nuestro estudio corrobora los datos en pacientes de áreas poblacionales distintas y con extracto distinto, lo que da una importante robustez a este hallazgo. En nuestro estudio se obtienen mayor porcentaje de positivities con menor concentración de profilina, lo que puede indicar una mejor preparación y purificación del extracto o, menos probable, una mayor gravedad de los pacientes incluidos en nuestra muestra.

En cuanto a las pruebas de provocación bronquial específica (PPBE) con profilina, también existe un estudio previo, el realizado por Ruiz-García y col.(150) en Madrid (España) en el que observaron provocaciones bronquiales con nPho d 2 positivas en el 77% de los pacientes sensibilizados. Nuevamente se encuentran diferencias y semejanzas con nuestro estudio. En este caso el extracto utilizado también fue distinto, tratándose en este caso de Pho d 2 fabricado por ALK-Abelló®, a una concentración 50 mg/mL(200). La metodología empleada también fue distinta, las

provocaciones bronquiales se realizaron mediante nebulización por dosímetro a una concentración máxima de profilina Pho d 2 de 100 mg/mL y por mascarilla facial por lo que registraron tanto la respuesta nasal como bronquial, por rinomanometría y espirometría respectivamente. En nuestra investigación, la PPBE se realizó por el método de respiración a volumen corriente con generación continua de aerosol mediante un nebulizador a través de una pieza bucal. Siendo la concentración máxima de profilina Pho d 2 utilizada en nuestro caso de 20 mg/mL.

En el estudio de Ruiz-García y col.(150). realizaron la PPBE con profilina en 23 pacientes sensibilizados a profilina y en 5 controles no sensibilizados. Encontraron resultados positivos en 17 casos (77%) con un valor medio de PC20 de $4,52 \pm 2,56$ mg/ml. Además 8 de estos 17 pacientes también tuvieron un resultado positivo a nivel nasal con la rinomanometría. Por último 2 pacientes (9%) tuvieron solo resultados positivos en la provocación nasal. En nuestro estudio la PPBE con profilina fue positiva en el 95% de los casos, la media de la PC20 fue de 10,55 µg/mL con una DE de 11,87. Aunque la nebulización se produjo a través de una pipeta bucal hubo 8 pacientes (40% de los casos) que tuvieron síntomas nasales en la prueba de provocación. En este caso, las diferencias encontradas en la concentración de profilina que es capaz de producir broncoespasmo pueden deberse a las diferentes técnicas empleadas, aunque también pudo influir el extracto y la gravedad de los pacientes.

En ambos estudios las PPBE con profilina en pacientes no sensibilizados fue negativa en todos los pacientes.

Nuevamente, previa a la publicación de nuestro estudio(198) no existían más datos de PPBE con profilina que el estudio de Ruiz-García(150). Por lo que nuestro estudio obtiene resultados similares con extractos distintos y en poblaciones distintas, corroborando la hipótesis de que la profilina es capaz de producir una respuesta alérgica específica a nivel de la mucosa respiratoria.

Por lo tanto, la relevancia de las provocaciones *in vivo* de nuestro estudio radica en corroborar los resultados obtenidos en respectivos estudios de provocación conjuntival(160) y bronquial(150) demostrando la capacidad de la profilina de producir una respuesta alérgica específica a nivel local en pacientes sensibilizados.

VII.4 Relevancia de los resultados aerobiológicos.

Una vez que se demostró, primero, la capacidad de la profilina para sensibilizar a los pacientes y, luego, su capacidad de producir una respuesta alérgica específica, era necesario conocer si esa profilina se encontraba en el ambiente. En este estudio se demostró la presencia de profilina en el ambiente a lo largo del año. Además es importante relacionar esta cantidad de profilina con los pólenes que había en el ambiente en ese momento así como las condiciones ambientales, meteorológicas y de contaminación. Una de las grandes fortalezas de este estudio es que se objetivó, por primera vez, la presencia de profilina en el ambiente mediante un captador de partículas. Además, se detectó cierta cantidad de profilina en el ambiente en más de la tercera parte de los días del año, sin que se limitara a los meses de primavera ya que existía profilina en ambiente a lo largo de 8 de los meses del año. Junio fue el mes con la concentración más alta de profilina, seguido de mayo y abril. Aunque el periodo principal de profilina en ambiente (periodo que recoge el 90% de la profilina anual) se extendió a lo largo de 155 días, desde el 8 de marzo al 9 de agosto. El día en el que se encontró mayor concentración de profilina en ambiente, fue el 10 de junio con 133,6 ng de profilina en el filtro equivalente a 0,56 ng de profilina por m³ de aire.

Aunque se dividieron los días en función de las concentraciones bajas, medias y altas de profilina, esta separación es arbitraria, ya que, por el momento, no se ha establecido la cantidad de profilina en el ambiente a la que los pacientes sensibilizados comienzan a presentar sintomatología. Únicamente tenemos los datos de provocación conjuntival y bronquial. De forma que en nuestro estudio la mediana de profilina con capacidad de producir sintomatología ocular fue de 0,3 µg/mL, en el estudio de Núñez(160) a concentraciones de 0,5 µg/mL a 50 µg/m. A nivel bronquial la PD20 fue desde 4,52 µg/mL en el estudio de Ruiz-García(150) a 10,55 µg/mL en nuestro estudio. Por lo que se puede decir que las concentraciones que produjeron síntomas *in vivo* fueron muy superiores a las concentraciones encontradas en el ambiente. Quedaría por dilucidar, por tanto, si esta diferencia es consecuencia de la técnica utilizada para la extracción de profilina del ambiente, o si realmente la profilina no alcanza niveles suficientes en ambiente como para producir síntomas alérgicos en pacientes sensibilizados.

El siguiente paso coherente en la investigación era intentar averiguar de dónde provenía la profilina que se detectó en el ambiente, ya que, son varios los pólenes que

contienen profilina entre sus proteínas. Existen estudios previos que habían correlacionado la presencia de alérgenos principales con sus respectivos pólenes(201–204) .

En el diseño del estudio, inicialmente, se barajó la posibilidad de utilizar los resultados de las estaciones de la Red Palinológica de la Comunidad de Madrid más cercanas, que en este caso eran Aranjuez y Getafe, que se encontraban a una distancia de 12 y 19 km respectivamente. Finalmente se decidió poner un captador de pólenes en el propio hospital, al lado del captador de partículas, obteniéndose resultados mucho más fiables. Pensamos que fue una decisión acertada, ya que, se encontraron grandes diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en los pólenes de las 3 estaciones. Como ocurrió en el estudio realizado en Detroit, Michigan en el que encontraron gran variabilidad de los tipos polínicos en las muestras recogidas en distintos puntos de la ciudad(205).

La cantidad total de polen en Valdemoro fue casi el doble que en la estación de Getafe y excedía en más de la tercera parte al polen de la estación de Aranjuez. La concentración máxima y la duración de la polinización también fueron superiores en Valdemoro. El día pico fue un poco anterior en Valdemoro que en las otras dos estaciones y el número de días sin nada de polen fue inferior en Valdemoro. Cualitativamente también fueron distintos ya que en Valdemoro el polen más frecuentemente encontrado fue el *Quercus* seguido de la *Olea* y *Gramineae*. En Getafe los pólenes más frecuentes por orden de concentración fueron *Platanus*, *Cupresaceas* y *Quercus*. Mientras que en Aranjuez se encontró *Quercus* por encima de *Cupresacea* y *Gramineae*. Pero incluso si nos centramos sólo en la cuantificación del polen de gramíneas (polen con mayor concentración de profilina(150)) Valdemoro presentó un índice de polinización anual más del doble del que se obtuvo en la estación de Getafe y un 22, 7 % más que la estación de Aranjuez. La duración del periodo principal de polinización de las gramíneas también fue mayor en Valdemoro (167 días), que en Aranjuez (130 días) y Getafe (122 días).

Por lo tanto, es importante tener en cuenta los pólenes presentes en el ambiente tanto de forma cuantitativa como cualitativa a la hora de interpretar los resultados de profilina en el aire y su influencia en la clínica de los pacientes. Estudios futuros en los que se analice la presencia de profilina en el ambiente deberían aportar también la composición aerobiológica de su zona de forma simultánea.

Al correlacionar los pólenes y la concentración de profilina detectados en el ambiente se observó que los picos principales de profilina correspondían a los picos de *Gramineae* y *Olea* aunque con un decalaje de 16 y 9 días respectivamente. También se encontró cierta correlación de la profilina con *Platanus*, y *Quercus*, *Plantago* y *Cupresus*, aunque puede que estos fueran responsables de picos menores de profilina a lo largo del año.

La presencia variable de profilina en ambiente a lo largo del año puede deberse a que son varios los pólenes que contienen profilina entre sus proteínas. Pero la concentración de profilina y su porcentaje relativo con respecto al total de proteínas es muy diferente en cada uno de los pólenes según el estudio realizado por Ruiz-García(150), en este estudio, los extractos de polen en los que se encontró más profilina fueron las gramíneas, con *Lolium* y *Phleum* con 75 y 41,6 µg respectivamente, seguidos del *Olea* 4,9 µg, *Salsola* 4,8 µg *Chenopodium* 2,5 µg *Plantago* 1,8 µg y *Bétula* 1,1 µg. Si comparamos estos resultados con la cantidad total de proteínas del extracto se observó que la cantidad relativa de proteínas era muy baja. Por ejemplo, en el extracto de *Lolium* la cantidad total de proteína era de 8, 17 mg, por lo que la profilina representaba solo el 0,9% del total de proteína. De forma similar ocurría con el *Phleum* (0,7%) y en un rango todavía más bajo con el resto de pólenes: *Olea* (0,1%) *Bétula* (0,05%) *Chenopodium* y *Salsola* (0,04%) y *Plantago* (0,01%). Hay que tener en cuenta que estos resultados se refieren a la cantidad de profilina en extractos comerciales y que pueden no correlacionarse con las proteínas de la fuente natural al igual que ocurría con el estudio en el que no encontraron Pru p 4 en varios extractos de melocotón(169).

Otra posible explicación de la presencia de profilinas a lo largo de todo el año, sería la que sugieren en el estudio realizado por Feo Brito y col.(206) en el que detectaron aeroalérgenos de gramíneas, fuera de la estación polínica en otoño e invierno que además correlacionaron con la clínica de los pacientes. Ellos hipotetizan que los aeroalérgenos una vez liberados de los granos de polen pueden estar presentes en el ambiente en periodos en los que los propios granos no están, incluso plantean que otras estructuras vegetales diferentes de los granos de polen podrían ser el origen de estos aeroalérgenos como las flores, hojas, tallos o semillas. Ha habido otros autores que han detectado presencia de alérgenos fuera de la estación polínica respectiva en el caso de gramíneas, encina, abedul (83) o del polen del olivo(207). De

forma similar, la profilina podría permanecer en el ambiente fuera de la estación polínica de las gramíneas o provenir de otras estructuras de las plantas.

Por lo expuesto anteriormente, se puede inferir que los pólenes de gramíneas pueden ser los mayores contribuidores a la presencia de profilina en el ambiente. Puede que en la zona donde se realizó el estudio se obtuvieran estos resultados por la cantidad de polen de gramíneas presente en el ambiente. Estos resultados pueden explicar el por qué la sensibilización a profilina se ha asociado al polen de gramíneas en varios estudios(172,208) con una correlación de la sensibilización a profilina con la presencia de IgE específica a Phl p 1 y Phl p 5. Además, se ha detectado una variación geográfica de sensibilización a profilina que se relaciona con la cantidad de polen de gramíneas en el ambiente(106,133). También se encuentra una variación geográfica norte sur en Europa en la sensibilización a profilina en los pacientes con alergia a alimentos(209,210), en posible relación con la mayor frecuencia de sensibilización a gramíneas.

En este sentido sería interesante realizar el estudio de cantidad de profilina en zonas con diferente concentración de profilina. Como, por ejemplo, en Extremadura, donde la presencia de clínica alérgica grave tras la ingesta de alimentos con profilina se ha correlacionado con la mayor concentración de gramíneas en el ambiente(165), o en Arabia Saudí donde encontraron que la profilina de palmera, Pho d 2 se comportaba como alérgeno mayor(146).

En cuanto al decalaje que transcurre desde el pico de gramíneas hasta el pico de profilina requiere una explicación, ya que, en el estudio realizado por Lund y col.(122) de la cinética de liberación a lo largo del tiempo de la profilina del polen de *Phleum* (Phl p 12) junto con los alérgenos mayores observaron que la cinética de liberación y las cantidades molares de Phl p 1 y Phl p 12 fueron comparables entre ellas, aunque claramente inferiores a Phl p 5. Si bien, en otros estudios se han encontrado diferencias en los picos de polen de gramíneas y aeroalérgenos(206) o del polen del olivo y sus alérgenos(94).

También podría darse la hipótesis de que la profilina requiera de ciertas condiciones meteorológicas para que esta sea liberada de los granos de polen y detectada en el ambiente como ocurrió en los estudios llevados a cabo por Feo Brito con los alérgenos de gramíneas en los que la mayor temperatura y en alto grado de humedad se ha correlacionado con niveles más altos de alérgenos en el ambiente(206).

Para intentar buscar una correlación con la liberación de profilina en el ambiente se estudiaron los parámetros ambientales y meteorológicos en la zona de Valdemoro durante el periodo de observación ambiental. En este sentido se encontró una leve relación con algunos parámetros, de forma que la presencia de profilina en el ambiente se correlacionaba con menor humedad y presión barométrica, así como mayor temperatura, velocidad del viento y radiaciones solares. Previamente se ha descrito que los granos de polen tienden a liberarse cuando desciende la humedad relativa, se mantienen en el aire durante más tiempo, con baja humedad a bajas velocidades de viento y alta presión atmosférica(211–213). La lluvia puede eliminar temporalmente las partículas y los aeroalérgenos del aire, aunque algunos granos de polen pueden volver a suspenderse después(214,215). En el caso de los aeroalérgenos se ha observado una correlación de la temperatura y la humedad con la presencia de Ole e 1 en ambiente y con la sintomatología de los pacientes(94). En el caso de la profilina son necesarios más estudios que puedan mostrar resultados en zonas geográficas distintas para intentar valorar la influencia de las variables meteorológicas en su presencia en el ambiente.

En nuestro estudio, también se obtuvieron correlaciones con algunos contaminantes ambientales, encontrándose una correlación positiva entre la concentración de profilina en ambiente con el ozono y negativa con el dióxido de nitrógeno (NO₂), el monóxido de nitrógeno (NO) y las partículas en suspensión de menos de 2,5 micras (PM_{2,5}). La contaminación del aire puede aumentar la capacidad alérgica del polen(216–219). En un estudio reciente en el que compararon las proteínas expresadas por el polen de *Lolium* en dos poblaciones con niveles de contaminación distintos (Madrid y Ciudad Real) durante dos años consecutivos en el que observaron que niveles altos de NO₂ y SO₂ se relacionaron con la expresión de genes en Madrid que aumentan la capacidad alérgica del *Lolium*(220). De forma paralela, la expresión y posterior liberación de profilina en los pólenes podría relacionarse con la contaminación atmosférica, si bien, parecen necesarios nuevos estudios para valorar la influencia real de cada uno de los contaminantes atmosféricos en la presencia de profilina en el ambiente.

VII.5 Relevancia de los resultados de los estudios clínicos.

Los pacientes sensibilizados a profilina presentaron una intensidad de síntomas totales, nasales y oculares estadísticamente superior a los pacientes no sensibilizados.

Además el riesgo de presentar síntomas medido por el porcentaje de pacientes que presentaban alguno de los síntomas cada día también fue superior en los pacientes sensibilizados a profilina. Este es uno de los mayores hallazgos de este estudio. Hasta ahora no había sido comunicado con anterioridad. De forma que es la primera vez que se ha demostrado la capacidad de la profilina de producir síntomas alérgicos en la vida real.

Aunque es frecuente que la exposición a alérgenos desarrolle síntomas alérgicos, no siempre ocurre. De forma que la detección de IgE específica a determinados alérgenos, no siempre equivale a relevancia clínica. Por lo que, actualmente se recomienda que la evaluación diagnóstica debe guiarse principalmente por los síntomas clínicos(221). En este sentido, es importante intentar correlacionar la clínica de los pacientes con la exposición al alérgeno en el ambiente.

Sin embargo, no hemos encontrado publicaciones que hayan estudiado la capacidad de la profilina de producir síntomas clínicos en la vida real de los pacientes, solo hay publicados casos puntuales de pacientes sensibilizados(222,223). Por lo tanto es necesario que se pueda correlacionar la cantidad de alérgeno del ambiente con los síntomas que presentan nuestros pacientes en la vida real, tal y como se ha hecho con otros alérgenos(206,224).

En nuestro estudio se observó que los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia al polen que estaban sensibilizados a profilina presentaban una mayor intensidad de síntomas alérgicos tanto en su conjunto como de forma individual con cada uno de ellos, sobre todo, en el caso de los síntomas nasales y oculares. En el caso de los síntomas bronquiales las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en presencia de profilina en el ambiente. Además estos pacientes también tuvieron mayor riesgo de padecer síntomas bronquiales, nasales y conjuntivales con un OR de 1,15 IC del 95% (1,08, 1,23) ($P < 0,001$) y OR de 1,62 IC del 95% (1,47; 1,79) ($p < 0,001$), respectivamente. Por lo que queda demostrado que estos pacientes presentan una mayor gravedad de la enfermedad alérgica respiratoria y una mayor multimorbilidad.

Estudios previos han intentado dar un umbral de reactivación, concentración de aeroalérgeno en ambiente, a partir del cual los pacientes sensibilizados a ese alérgeno presentan síntomas, de forma similar a los granos de polen. De esta forma, puede existir un rango para gramíneas de entre 10-50 granos/m³ de aire y de Olea entre

153-400 granos/m³ en el umbral en el que la mayoría de los pacientes sensibilizados desarrollan síntomas alérgicos(94,95,206,225). En caso de los aeroalérgenos, en el estudio realizado por Feo Brito y col. la presencia en ambiente de 1,84 µg / m³ de alérgenos de gramíneas fueron suficientes para inducir síntomas(206). Los mismos autores, también estudiaron el umbral de reactivación con los alérgenos del olivo encontrando que 0,9 ng/m³ era suficiente para desencadenar síntomas en pacientes monosensibilizados(94). Otros autores en un estudio simultáneo en Córdoba y Évora (Portugal) encontraron 3,9 pg de Ole e1(226).

No se conocen pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma alérgica monosensibilizados a profilina, por lo que es difícil conocer la carga clínica que se le puede atribuir a este alérgeno con respecto a otros alérgenos del mismo polen que se van a liberar de forma simultánea. Además la cantidad relativa de la profilina parece ser inferior a la de los alérgenos mayores. En el estudio realizado en extractos alérgicos(150) la cantidad profilina (75 µg) representaba solo el 6,15% de la cantidad de Lol p 5 (1220 µg), por lo que puede que su contribución a la clínica del paciente también sea menor. En el caso del Plantago la profilina (1.8 µg) fue del 5,5% del Pla I 1 (33 µg). En la Olea la profilina (4.9 µg) solo es un 0,2% del Ole e 1(2473 µg)(150). Por lo que puede ser difícil dar un umbral de reactivación de profilina.

Las implicaciones clínicas de pequeñas cantidades de profilina siguen siendo desconocidas, aunque diferentes estudios han sugerido que la profilina puede aumentar la inflamación alérgica(227). Por lo que la profilina sí podría contribuir con un efecto potenciador de la respuesta alérgica que resultaría sumatoria a la de otros alérgenos principales de los pólenes, de forma similar a la disminución del umbral de reactivación que presentan los pacientes a lo largo de la estación polínica (efecto *priming*)(228). También la profilina podría contribuir a la clínica de los pacientes alérgicos a pólenes aumentando la frecuencia y/o la intensidad de la sintomatología en los pacientes sensibilizados.

VII.6 Relevancia clínica de la profilina.

La contribución de este estudio al conocimiento de la relevancia clínica de la profilina es uno de sus mayores logros, ya que se ha demostrado no solo que existe profilina en el ambiente, capaz de producir una respuesta específica a nivel

respiratoria, sino también que los pacientes sensibilizados a la misma presentan una mayor gravedad de enfermedad respiratoria en la vida real.

A la profilina, inicialmente se le atribuyó un papel poco relevante en la patología alérgica respiratoria, siendo un alérgeno menor en la mayoría de los pólenes, se le ha identificado como un alérgeno responsable de la reactividad cruzada entre pólenes, alertando que su sensibilización podría significar un factor de confusión a la hora de interpretar los causantes reales de la clínica de los pacientes(129,131,171). En la guía de uso de diagnóstico molecular que realiza la EAACI(221) se clasifica a las distintas moléculas en 4 tipos: moléculas de baja abundancia y / o estabilidad débil, moléculas asociadas al riesgo o la gravedad, indicador de reactividad cruzada y marcador de sensibilización genuina (específica de la especie), encuadrando a las profilinas como indicadores de reactividad cruzada. Tal y como se ha visto en este estudio además de reactividad cruzada podrían ser un marcador de gravedad de enfermedad respiratoria alérgica.

En los últimos años han surgido autores que se plantean la posible relevancia de la profilina. Fue Domingo Barber uno de los primeros que plantea la posibilidad de que en función de la prevalencia de sensibilización alérgica en un área determinada se pueda predecir el potencial de inflamación alérgica asociado a la polinosis de gramíneas, hipotetizando que la profilina podría ser el responsable del aumento de prevalencia y gravedad de enfermedad alérgica en los últimos años, o cuanto menos, ser "el canario en las minas de carbón" que predice la posible evolución de los pacientes con enfermedades alérgicas(173). Rodríguez del Río, ahonda en este mensaje de cambio de concepto o paradigma que atribuye a la profilina escasa relevancia y propone nuevos estudios que ayuden a una correcto abordaje de la estrategia terapéutica de estos pacientes(172). Estas percepciones se basan en publicaciones, como los estudios epidemiológicos realizados en España en los que se ha observado que la profilina podría ser un marcador tanto de gravedad como de polisensibilización en pacientes con alergia al polen de gramíneas(106,124,133). También ha demostrado importancia en los pacientes con alergia al polen del olivo, de forma que la sensibilización a Ole e 2 se asoció de forma estadísticamente significativa con la presencia de asma en estos pacientes(140). En otro estudio transversal realizado en Italia en niños polínicos, hasta el 23 % ya estaban sensibilizados a profilina y se relacionó con un aumento de la duración de la enfermedad, así como una mayor

prevalencia de asma.(174). Otra muestra de la relevancia de la profilina es que se ha asociado a mayor riesgo de reacciones alérgicas tras la inmunoterapia(175).

En la alergia alimentaria, la profilina también puede presentar relevancia, tanto en la frecuencia de sensibilización como en la posible gravedad de los síntomas, tal y como demostró Alvarado con la posibilidad de producir reacciones alérgicas graves(165). La sensibilización a profilina se ha demostrado como un factor de riesgo de alergia alimentaria en varios estudios(116,221). En otro estudio multicéntrico realizado en varios países de Europa en pacientes con rinoconjuntivitis por alergia al polen observó que la mayoría de los pacientes estaban sensibilizados a profilina(229). En otro estudio realizado en Madrid(150) el 45,8% de los pacientes sensibilizados a profilina presentaban síndrome de alergia oral por frutas.

Sin embargo, hay otros estudios que siguen atribuyendo a la profilina un papel menos relevante, como el estudio trasversal realizado en Italia en el que la sensibilización a profilina se asoció a menor presencia de asma en pacientes sensibilizados a parietaria y a gramíneas(128) o el realizado en Baviera, Alemania, en el que sugieren que la sensibilización a profilina no presente relevancia clínica, ya que en 86 pacientes sensibilizados a profilina y polcalcina todos presentaban una cosensibilización a un alérgeno mayor al que atribuyen la relevancia clínica(142). Aunque el que presente una cosensibilización no quiere decir que la profilina no pueda contribuir aunque sea de una forma relativa a la clínica del paciente.

Las discrepancias encontradas en los distintos estudios podrían explicarse por las diferentes concentraciones de profilina en el ambiente en las distintas zonas, ya que es conocido que en función del grado de exposición de cada una de las zonas la sensibilización y la gravedad de los síntomas pueden variar(106,165).

En nuestro estudio, realizado en de forma prospectiva y longitudinal, se encontró que pacientes sensibilizados a profilina presentaban una intensidad significativamente mayor de síntomas que los pacientes no sensibilizados, aunque ambos grupos presentaban polisensibilización frecuente. También se observó un mayor riesgo de desarrollar síntomas oculares, nasales y bronquiales en pacientes con prueba cutánea positiva a profilina. Por lo tanto en nuestro estudio, intensidad y riesgo de multimorbilidad corroboran la idea de que la profilina puede ser un marcador de gravedad.

Por otro lado, también se podría pensar que la mayor gravedad de la enfermedad alérgica que presentaron los pacientes sensibilizados a profilina no se atribuya directamente a la acción de la profilina, sino que ésta actuase con un marcador indirecto de evolución de la enfermedad alérgica. En nuestro estudio los pacientes sensibilizados a profilina mostraron el doble de tiempo de evolución de los síntomas de asma que los controles. Estos resultados podrían ser coherentes con observaciones anteriores que sugieren la importancia de la profilina como un marcador de evolución(106).

También se ha sugerido que la sensibilización a profilina pueda ser secundaria en pacientes que experimentan una sensibilización sucesiva a varios alérgenos dentro de un mismo polen, lo que se conoce como "propagación molecular" o "*molecular spreading*", término que se refiere a la evolución de la sensibilización de un paciente desde la monosensibilización, en la mayoría de los casos desde el alérgeno principal hacia la oligo o polisensibilización en la que se incluyen otros alérgenos minoritarios y panalérgenos con el paso de los años(230).

Aunque si la profilina fuera simplemente un marcador de evolución, la frecuencia de sensibilización en niños sería muy baja o inexistente. En cambio en el estudio realizado por Asero(174), se encontró que afectaba al 23 % de los niños, siendo un 16% en edad preescolar, de forma que estos autores sugieren que la sensibilización temprana a profilina podría ser un marcador de predisposición atópica e historia clínica de alergia al polen más grave.

De esta forma, esta evolución, también se puede dar de forma muy precoz en los niños, como muestra el estudio realizado en Alemania por Hatzler et al.(231). Se trata de un estudio longitudinal en el que siguieron a niños desde su nacimiento hasta los 13 años de edad. Observaron que en los 177 niños que desarrollaron rinitis alérgica estacional presentaban en su mayoría una progresión desde una monosensibilización hacia una oligo o polisensibilización. Phl p 1 fue el primer alérgeno en el 75% de los casos, estando presente en la mayoría de los casos en una fase preclínica de la enfermedad. En cambio, la presencia de IgE específica en suero frente a la profilina Phl p 12 apareció en la fase postclínica y frecuentemente en las últimas etapas de la evolución. La secuencia general fue primero Phl p 1, seguido de Phl p 4 y Phl p 5, luego Phl p 2 y Phl p 6, finalmente Phl p 11, Phl p 12 y Phl p 7.

Otros estudios serán necesarios para aclarar el papel real de la profilina en los pacientes con enfermedad alérgica, si puede ser un marcador precoz de gravedad; si pudiera ser responsable directo o indirecto de la intensidad de los síntomas; o si es un marcador de evolución de la enfermedad. Aunque con los datos disponibles hasta ahora se debería hacer un seguimiento estrecho de los pacientes que presenten una prueba cutánea positiva a profilina por el mayor riesgo de intensidad de síntomas y presencia de multimorbilidad.

VII.7 Impacto clínico y aplicabilidad de la investigación

Los resultados obtenidos en este estudio pueden cambiar el enfoque y abordaje clínico de los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma alérgico en la práctica diaria de las consultas de alergología, ya que, se da un marcador biológico de gravedad de estos pacientes de muy fácil acceso para todos los alergólogos, con una metodología estandarizada, fácilmente reproducible y en un periodo muy corto de tiempo. Con una prueba cutánea en *prick* con extracto de profilina se puede valorar la posibilidad de que el paciente presente una mayor intensidad de los síntomas nasales, conjuntivales y bronquiales con un mayor riesgo de presencia de los mismos. Por lo tanto, el tratamiento propuesto para estos pacientes debe tener en cuenta estos aspectos. El seguimiento posiblemente deberá ser más estrecho.

Hasta ahora la positividad a profilina en una prueba cutánea, se planteaba únicamente como un posible factor de confusión, al ser responsable de la reactividad cruzada entre pólenes, con lo que llevaba a la necesidad de buscar la sensibilización relevante de cada uno de los pólenes a los que está sensibilizado el paciente, buscar otros alérgenos principales mediante el diagnóstico molecular e intentar correlacionarlo con la clínica^(221,232).

Con la realización de este estudio, además de mejorar el conocimiento del alérgeno de la profilina; corroborar su capacidad de inducir una respuesta alérgica órgano específica a nivel local conjuntival y bronquial; demostrar que existe en el ambiente en periodos a lo largo de todo el año, incluso fuera de la estación polínica de las gramíneas, se ofrece una herramienta útil como identificador de pacientes con una mayor gravedad de enfermedad alérgica respiratoria, se presenta, por tanto, como un

marcador biológico de fácil aplicación en la práctica clínica de la alergología en un porcentaje alto de pacientes.

VII.8 Limitaciones del estudio

Son varios los puntos de mejora del actual proyecto, que podrían abarcar los cuatro puntos cardinales de la investigación: los estudios *in vitro*, *in vivo*, estudio medioambiental y estudios clínicos.

En primer lugar en el estudio *in vitro* se podría haber profundizado en los perfiles de sensibilización molecular de los pacientes sensibilizados a profilina para conocer los alérgenos de cada polen a los que estaba sensibilizado y la comparación con los pacientes no sensibilizados a profilina en nuestra área. Si bien, este no era uno de los objetivos del estudio.

Las pruebas de provocación *in vivo* demostraron la capacidad de la profilina para producir una respuesta específica a nivel local, pero las concentraciones de profilina que produjeron síntomas *in vivo* fueron muy superiores a las concentraciones encontradas en el ambiente. Por lo que con estos resultados no se podría aseverar la relevancia clínica de la profilina en el ambiente.

El método de cuantificación de profilina en ambiente mediante el captador de partículas *Sentine*[®] y el análisis de los filtros con el método de ELISA inhibición con sueros policlonales de conejo específicos a profilina presentó buenos resultados, si bien, el método utilizado puede influir en los niveles de alérgeno detectado(233,234). No existe un método único y estandarizado para detectar partículas en ambiente, la utilización de diferentes técnicas de muestreo y técnicas de inmunoensayo complica la comparación de resultados(235). Sería necesario un protocolo de consenso estandarizado y validado que pudiera ser útil en la estimación de la interacción dosis-respuesta frente a la exposición a este alérgeno. La sintomatología de los pacientes sensibilizados a profilina en vida real podría correlacionarse con la presencia de profilina en el ambiente, pero no se conocen pacientes monosensibilizados a profilina, por lo que es difícil cuantificar el porcentaje relativo de los síntomas que pudiera ser achacable a la profilina, teniendo en cuenta además que la cantidad relativa de profilina con respecto a los alérgenos mayores es baja. En este sentido, en base a al presente estudio se puede decir que la sensibilización a profilina puede ser un

marcador de gravedad de enfermedad alérgica pero no es posible cuantificar la relevancia intrínseca de la profilina en esta gravedad.

VII.9 Programa de desarrollo de investigación

Son varios los puntos en los que se puede progresar la investigación en la relevancia clínica de la profilina y su aplicabilidad de la clínica.

Sería interesante profundizar en los endotipos de los pacientes sensibilizados a profilina, de forma que se podría estudiar el patrón de sensibilización molecular de los pacientes sensibilizados a profilina, así como estudiar el papel de la profilina en la cronología de sensibilización a alérgenos o propagación molecular. Por lo que serían necesarios nuevos estudios longitudinales similares al realizado Hatzler et al.(231) en los que se realice un seguimiento de pacientes desde estadios preclínicos con determinaciones serológicas periódicas que permitan establecer el papel de la profilina en los patrones cronológicos de sensibilización en pacientes polínicos.

Un estudio pendiente sería la cuantificación de profilina en distintas zonas para poder establecer relación con los distintos pólenes presentes en cada una de ellas así como con la influencia de las condiciones aerobiológicas. De forma similar al estudio realizado por Jato y col. (236) que analizaron Par j 1 y Par j 2 en dos áreas geográficas diferentes de España, en Ourense y Cartagena, observando menor cantidad de polen en Cartagena pero mayor de aeroalérgeno. Además, si se pudiera correlacionar la profilina en el ambiente con la sintomatología de los pacientes en diferentes zonas y en diferentes tiempos se podría llegar a establecer los niveles de profilina a partir de los cuales los pacientes sensibilizados podrían comentar a presentar sintomatología alérgica.

Para conocer la evolución de los pacientes sensibilización a profilina sería necesario estudios de cohortes longitudinales que evaluaran la sintomatología de los pacientes con el paso de los años.

También sería importante conocer la relevancia de la profilina en población infantil. En el estudio realizado por Asero(174), se observó que hasta el 23 % de los niños estaban sensibilizados a profilina, por lo que sería interesante conocer la relevancia de la profilina en estos niños y la evolución que presentan en comparación con los niños no sensibilizados a profilina.

Otra línea de desarrollo de la investigación sería la posibilidad de tratamiento de Inmunoterapia con extracto de profilina al igual que se ha realizado con el panalérgeno de LTP(237,238). En caso de la profilina la experiencia es mucho más limitada. En el estudio de Nucera y col.(239) realizaron tratamiento con Inmunoterapia sublingual de profilina en 7 pacientes con alergia alimentaria a profilina (en su mayoría síndrome de alergia oral) de forma que obtuvieron un aumento de los alimentos tolerados en todos ellos. Quedaría por corroborar en estudios doble ciego controlados con placebo la eficacia de la Inmunoterapia con profilina en alergia a alimentos y valorar la posibilidad de su eficacia en pacientes con patología alérgica respiratoria.

IX. CONCLUSIONES

1. Se detectó profilina en el ambiente en 133 días (36,5% del año) siendo el periodo de principal del 8 de Marzo al 9 de Agosto, el día pico el 10 de Junio con 0,56 ng de profilina por m³ de aire.
2. La profilina es capaz de desarrollar una respuesta alérgica específica a nivel bronquial y conjuntival en pacientes sensibilizados a dicha proteína, comprobada mediante provocación bronquial y conjuntival respectivamente.
3. Los pacientes sensibilizados a profilina presentaron una mayor intensidad de los síntomas totales, respiratorios, nasales y oculares y mayor riesgo de presentarlos.
4. Los pacientes sensibilizados a profilina presentan mayor frecuencia de polisensibilización y mayor frecuencia de sensibilización a *Cynodon*, *Plátanus* y *Parietaria*.
5. La presencia de síndrome de alergia oral por frutas se asoció con los pacientes sensibilizados a profilina, siendo el melón la fruta que con más frecuencia la producía.
6. Se obtuvo una concordancia elevada entre las pruebas cutáneas y serológicas con profilina, así como entre las pruebas *in vitro* entre sí.
7. En Valdemoro el polen más frecuentemente encontrado fue del género *Quercus* seguido de los pólenes de *Olea* y *Poaceae*. Tanto el polen total encontrado, como el índice polínico anual de gramíneas fueron superiores en Valdemoro que en las estaciones de Getafe y Aranjuez.
8. Se observó una relación entre la cantidad de profilina en ambiente y los pólenes de *Olea* y *Poaceae*. Sin embargo, el pico de profilina apareció unos días después del pico de polen de estas especies.
9. No se observó una relación entre los niveles séricos de anticuerpos frente a la profilina y el grado de respuesta bronquial, conjuntival ni con la intensidad de los síntomas de los pacientes sensibilizados a profilina.
10. No se encontró una relación significativa entre la concentración de profilina y la intensidad de los síntomas de los pacientes. Sin embargo, en presencia de profilina en el ambiente la diferencia de síntomas conjuntivales y bronquiales entre pacientes sensibilizados y no sensibilizados a profilina fue mayor.
11. La presencia de profilina en el ambiente se correlacionó con menor humedad y presión barométrica, así como, mayor temperatura,

velocidad del viento y radiaciones solares. Los contaminantes ambientales presentaron una correlación positiva con la concentración de profilina en ambiente en el caso del ozono y negativa con el dióxido de nitrógeno, el monóxido de nitrógeno y las partículas en suspensión de menos de 2,5 micras.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Roitt IM, Rondonone S, Delves PJ. *Inmunología: fundamentos*. 2014
2. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc* 2019;**40**:470–473.
3. Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical aspects of immunology*. 2nd ed. Oxford, Edinburgh: Blackwell Scientific 1968
4. M.N. Longo Areso, M. López Hoyos. Las reacciones de hipersensibilidad. El complemento. In: *Tratado de alergología. 2ª Edición*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
5. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;**18**:693–704.
6. Palomares O, Akdis M, Martín-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev* 2017;**278**:219–236.
7. Morita H, Moro K, Koyasu S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;**138**:1253–1264.
8. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity* 2015;**43**:175–186.
9. Dávila González IJ, Jauregui Presa, Olaguibel Rivera, Zubeldia Ortuño. *Tratado de alergología*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
10. Romano MR, James S, Farrington E, Perry R, Elliott L. The impact of perennial allergic rhinitis with/without allergic asthma on sleep, work and activity level. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2019;**15**:81.
11. Bousquet J, Hellings PW, Agache I, Bedbrook A, Bachert C, Bergmann KC et al. ARIA 2016: Care pathways implementing emerging technologies for predictive medicine in rhinitis and asthma across the life cycle. *Clin Transl Allergy* 2016;**6**:47.
12. Muñoz-Cano R, Ribó P, Araujo G, Giralt E, Sanchez-Lopez J, Valero A. Severity of allergic rhinitis impacts sleep and anxiety: results from a large Spanish cohort. *Clin Transl Allergy* 2018;**8**:23.
13. Yaghoubi M, Adibi A, Zafari Z, FitzGerald JM, Aaron SD, Johnson KM et al. Cost-effectiveness of implementing objective diagnostic verification of asthma in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2019;:S0091674919316343.
14. Nurmamagambetov T, Kuwahara R, Garbe P. The Economic Burden of Asthma in the United States, 2008–2013. *Ann Am Thorac Soc* 2018;**15**:348–356.

15. Lyons SA, Burney PGJ, Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Barreales L, Clausen M et al. Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019;**7**:1920-1928.e11.
16. Tan H-TT, Sugita K, Akdis CA. Novel Biologicals for the Treatment of Allergic Diseases and Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;**16**:70.
17. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V et al. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014;**69**:62–75.
18. Panesar SS, Javad S, de Silva D, Nwaru BI, Hickstein L, Muraro A et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy* 2013;**68**:1353–1361.
19. Rönmark E, Bjerg A, Perzanowski M, Platts-Mills T, Lundbäck B. Major increase in allergic sensitization in schoolchildren from 1996 to 2006 in northern Sweden. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**124**:357-363.e15.
20. Armentia Medina, Almaraz Gomez, Sacristan Salgado, Rodrigo Calabia. Epidemiología e historia natural de las enfermedades alérgicas. In: *Tratado de alergología. 2ª Edición*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
21. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**140**:950–958.
22. Barranco Sanz P. *GEMA 4.4: Guía Española para el Manejo del Asma*. Madrid: Luzán 5 2019
23. Wheatley LM, Togias A. Allergic Rhinitis. *N Engl J Med* 2015;**372**:456–463.
24. Meltzer EO, Blaiss MS, Derebery MJ, Mahr TA, Gordon BR, Sheth KK et al. Burden of allergic rhinitis: Results from the Pediatric Allergies in America survey. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**124**:S43–S70.
25. Salo PM, Calatroni A, Gergen PJ, Hoppin JA, Sever ML, Jaramillo R et al. Allergy-related outcomes in relation to serum IgE: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**127**:1226-1235.e7.
26. Yonekura S, Okamoto Y, Horiguchi S, Sakurai D, Chazono H, Hanazawa T et al. Effects of Aging on the Natural History of Seasonal Allergic Rhinitis in Middle-Aged Subjects in South Chiba, Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;**157**:73–80.
27. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel J, Chivato T. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018;**28**:151–164.
28. Tran NP, Vickery J, Blaiss MS. Management of Rhinitis: Allergic and Non-Allergic. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;**3**:148.

29. Akhouri S, House SA. Allergic Rhinitis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2019<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538186/> (accessed 5 Jan2020).
30. GEMA 5.0. Guía Española para el Manejo del Asma. Editorial luzan5. Madrid 2020. ISBN: 978-84-17372-97-2. Depósito Legal: M-11218-2020. Disponible en: www.gemasma.com.
31. Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM, Monclús L, Martí-Guadaño E et al. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**120**:359–365.
32. Valero A, Ferrer M, Baró E, Sastre J, Navarro AM, Martí-Guadaño E et al. Discrimination between moderate and severe disease may be used in patients with either treated or untreated allergic rhinitis: Moderate and severe rhinitis discrimination. *Allergy* 2010;**65**:1609–1613.
33. Montoro J, Del Cuvello A, Mullol J, Molina X, Bartra J, Dávila I et al. Validation of the modified allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) severity classification in allergic rhinitis children: the PEDRIAL study. *Allergy* 2012;**67**:1437–1442.
34. Valero A, Muñoz-Cano R, Sastre J, Navarro AM, Martí-Guadaño E, Dávila I et al. The impact of allergic rhinitis on symptoms, and quality of life using the new criterion of ARIA severity classification. *Rhinology* 2012;**50**:33–36.
35. Varshney J, Varshney H. Allergic Rhinitis: an Overview. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2015;**67**:143–149.
36. Colás C, Brosa M, Antón E, Montoro J, Navarro A, Dordal MT et al. Estimate of the total costs of allergic rhinitis in specialized care based on real-world data: the FERIN Study. *Allergy* 2017;**72**:959–966.
37. Vandenplas O, Vinnikov D, Blanc PD, Agache I, Bachert C, Bewick M et al. Impact of Rhinitis on Work Productivity: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;**6**:1274-1286.e9.
38. Bielory L. Allergic Conjunctivitis and the Impact of Allergic Rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;**10**:122–134.
39. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**109**:419–425.
40. Shaaban R, Zureik M, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J et al. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *The Lancet* 2008;**372**:1049–1057.
41. Cruz AA, Popov T, Pawankar R, Annesi-Maesano I, Fokkens W, Kemp J et al. Common characteristics of upper and lower airways in rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA² LEN. *Allergy* 2007;**62**:1–41.

42. Petricek I, Prost M, Popova A. The Differential Diagnosis of Red Eye: A Survey of Medical Practitioners from Eastern Europe and the Middle East. *Ophthalmologica* 2006;**220**:229–237.
43. Fauquert J. Diagnosing and managing allergic conjunctivitis in childhood: The allergist's perspective. *Pediatr Allergy Immunol* 2019;**30**:405–414.
44. Smith AF, Pitt AD, Rodruiguez AE, Alio JL, Marti N, Teus M et al. The Economic and Quality of Life Impact of Seasonal Allergic Conjunctivitis in a Spanish Setting. *Ophthalmic Epidemiol* 2005;**12**:233–242.
45. Palmares J, Delgado L, Cidade M, Quadrado MJ, Filipe HP. Allergic Conjunctivitis: A National Cross-Sectional Study of Clinical Characteristics and Quality of Life. *Eur J Ophthalmol* 2010;**20**:257–264.
46. Quirce S. Asthma in Alergológica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;**19 Suppl 2**:14–20.
47. Leonardi A, Bogacka E, Fauquert JL, Kowalski ML, Groblewska A, Jedrzejczak-Czechowicz M et al. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy* 2012;**67**:1327–1337.
48. Johansson SGO, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T et al. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;**56**:813–824.
49. Sánchez-Hernández MC, Montero J, Rondon C, Benitez del Castillo JM, Velázquez E, Herreras JM et al. Consensus document on allergic conjunctivitis (DECA). *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015;**25**:94–106.
50. Friedlaender MH. Ocular allergy: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;**11**:477–482.
51. Owen CG, Shah A, Henshaw K, Smeeth L, Sheikh A. Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. *Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract* 2004;**54**:451–456.
52. O'Brien TP. Allergic conjunctivitis: an update on diagnosis and management. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;**13**:543–549.
53. Miyazaki D, Fukagawa K, Fukushima A, Fujishima H, Uchio E, Ebihara N et al. Air pollution significantly associated with severe ocular allergic inflammatory diseases. *Sci Rep* 2019;**9**:18205.
54. Albatineh E, Al-Zayadneh E, Al-Shagahin H, AL Soloman A, Altarawneh A, Aldmour I. Asthma Control and Its Predictive Factors in Adult Asthma Patients. *J Clin Med Res* 2019;**11**:807–817.
55. Backman H, Räsänen P, Hedman L, Stridsman C, Andersson M, Lindberg A et al. Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016—results from three population surveys. *Clin Exp Allergy* 2017;**47**:1426–1435.

56. The global asthma report 2018. Auckland: The Global Asthma Network; 2018. Available from: www.globalasthmanetwork.org[cited 2020 Ene 10].
57. Akmatov MK, Holstiege J, Steffen A, Bätzing J. Trends and regional distribution of outpatient claims for asthma, 2009–2016, Germany. *Bull World Health Organ* 2020;**98**:40–51.
58. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 2004;**59**:469–478.
59. Gupta RP, Mukherjee M, Sheikh A, Strachan DP. Persistent variations in national asthma mortality, hospital admissions and prevalence by socioeconomic status and region in England. *Thorax* 2018;**73**:706–712.
60. Krstić G. Asthma Prevalence Associated with Geographical Latitude and Regional Insolation in the United States of America and Australia. *PLoS ONE* 2011;**6**:e18492.
61. Timm S, Frydenberg M, Janson C, Campbell B, Forsberg B, Gislason T et al. The Urban-Rural Gradient In Asthma: A Population-Based Study in Northern Europe. *Int J Environ Res Public Health* 2015;**13**:93.
62. Gern JE. The Urban Environment and Childhood Asthma Study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:545–549.
63. Urrutia I, Aguirre U, Sunyer J, Plana E, Muniozguen N, Martínez-Moratalla J et al. Cambios en la prevalencia de asma en la población española del Estudio de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea (ECRHS-II). *Arch Bronconeumol* 2007;**43**:425–430.
64. Arnedo-Pena A, García-Marcos L, Carvajal Urueña I, Busquets Monge R, Morales Suárez-Varela M, Miner Canflanca I et al. Contaminación del aire y síntomas recientes de asma, rinitis alérgica y eccema atópico en escolares de 6 y 7 años. *Arch Bronconeumol* 2009;**45**:224–229.
65. Carvajal-Urueña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suárez-Varela M, García de Andoin N, Batlles-Garrido J et al. [Geographic variation in the prevalence of asthma symptoms in Spanish children and adolescents. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3, Spain]. *Arch Bronconeumol* 2005;**41**:659–666.
66. Martínez-Moratalla J, Almar E, Sunyer J, Ramos J, Pereira A, Payo F et al. Estudio Europeo del Asma. Identificación y tratamiento de individuos con criterios epidemiológicos de asma en adultos jóvenes de cinco áreas españolas. *Arch Bronconeumol* 1999;**35**:223–228.
67. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2019. Available in www.ginasthma.org Visited 2020,Jan,11.

68. Peters SP, Jones CA, Haselkorn T, Mink DR, Valacer DJ, Weiss ST. Real-world Evaluation of Asthma Control and Treatment (REACT): Findings from a national Web-based survey. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**:1454–1461.
69. Accordini S, Corsico AG, Braggion M, Gerbase MW, Gislason D, Gulsvik A et al. The Cost of Persistent Asthma in Europe: An International Population-Based Study in Adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;**160**:93–101.
70. Jaakkola MS, Ieromnimon A, Jaakkola JJK. Are atopy and specific IgE to mites and molds important for adult asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:642–648.
71. Peat JK, Tovey E, Gray EJ, Mellis CM, Woolcock AJ. Asthma severity and morbidity in a population sample of Sydney schoolchildren: Part II - Importance of house dust mite allergens. *Aust N Z J Med* 1994;**24**:270–276.
72. Sarpong SB, Karrison T. Skin Test Reactivity to Indoor Allergens as a Marker of Asthma Severity in Children with Asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;**80**:303–308.
73. Inouye T, Tarlo S, Broder I, Corey P, Davies G, Leznoff A et al. Severity of asthma in skin test-negative and skin test-positive patients. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**75**:313–319.
74. Ediger D, Günaydin FE, Erbay M, Şeker Ü. Trends of sensitization to aeroallergens in patients with allergic rhinitis and asthma in Bursa City, South Marmara Sea Region of Turkey. *Turk J Med Sci* Published Online First: 7 January 2020. doi:10.3906/sag-1908-139
75. Gruzieva O, Bellander T, Eneroth K, Kull I, Melén E, Nordling E et al. Traffic-related air pollution and development of allergic sensitization in children during the first 8 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**129**:240–246.
76. Brauer M, Hoek G, Smit HA, de Jongste JC, Gerritsen J, Postma DS et al. Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J* 2007;**29**:879–888.
77. Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *The Lancet* 2014;**383**:1581–1592.
78. Subiza Garrido-Lestrache Fj, Lobera Labairu T, Alcaráz Pérez C, Lopez Ruiz C., Sacristan Salgado, Rodrigo Calabia. Recuento de pólenes. In: *Tratado de alergología. 2ª Edición*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
79. Blackley, C. H. Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus (Hay-Fever or Hay-Asthma). London: Balliere, Tindall and Cox.1873.
80. Lake IR, Jones NR, Agnew M, Goodess CM, Giorgi F, Hamaoui-Laguel L et al. Climate Change and Future Pollen Allergy in Europe. *Environ Health Perspect* 2017;**125**:385–391.

81. Jung S, Estrella N, Pfaffl MW, Hartmann S, Handelshauer E, Menzel A. Grass pollen production and group V allergen content of agriculturally relevant species and cultivars. *PLOS ONE* 2018;**13**:e0193958.
82. J. Pola Pola, FJ. Subiza Garrido-Lestrache, JM. García Menaya, SL. Porcel Carreño, Sacristan Salgado, Rodrigo Calabia. Pólenes de interés en Alergología en nuestro medio. In: *Tratado de alergología. 2ª Edición*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
83. D`Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 2007;**62**:976–990.
84. Hoffmann T, Acar Şahin A, Aggelidis X, Arasi S, Barbalace A, Bourgoin A et al. “Whole” vs. “Fragmented” approach to EAACI Pollen Season Definitions: A Multicenter Study in Six Southern European Cities. *Allergy* 2019;;all.14153.
85. Nikolaidis C, Katotomichelakis M, Nena E, Makris M, Tsakas M, Michopoulos I et al. Seasonal variations of allergenic pollen in a Mediterranean region - Alexandroupolis, north-east Greece. *Ann Agric Environ Med AAEM* 2015;**22**:685–689.
86. Lara de la Rosa, MP (2014). “Cuantificación de aeroalergenos de gramíneas y olivo y correlación entre granos de polen, aeroalergenos y síntomas en los pacientes alérgicos de Ciudad Real”. Universidad de Córdoba. Disponible en <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/12065/2014000000937.pdf?sequence=1> Consultada 5 Mayo 2016.
87. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and Immunobiology of Grass Pollen Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;**130**:87–107.
88. Davies RR, Smith LP. Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clin Htmlemt Glyphamp Asciiamp Exp Allergy* 1973;**3**:263–267.
89. Antepara I, Fernandez JC, Gamboa P, Jauregui I, Miguel F. Pollen allergy in the Bilbao area (European Atlantic seaboard climate): pollination forecasting methods. *Clin Htmlemt Glyphamp Asciiamp Exp Allergy* 1995;**25**:133–140.
90. Hyde HA. Atmospheric pollen grains and spores in relation to allergy. II. *Clin Allergy* 1973;**3**:109–126.
91. Rantio-Lehtimäki A, Koivikko A, Kupias R, Mäkinen Y, Pohjola A. Significance of sampling height of airborne particles for aerobiological information. *Allergy* 1991;**46**:68–76.
92. Gioulekas D, Papakosta D, Damialis A, Spiekma F, Giouleka P, Patakas D. Allergenic pollen records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki, Greece. *Allergy* 2004;**59**:174–184.
93. Kirmaz C, Yuksel H, Bayrak P, Yilmaz O. Symptoms of the olive pollen allergy: do they really occur only in the pollination season? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005;**15**:140–145.

94. Brito FF, Gimeno PM, Carnés J, Martín R, Fernández-Caldas E, Lara P et al. Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 2011;**106**:146–152.
95. Florido JF, Delgado PG, de San Pedro BS, Quiralte J, de Saavedra JMA, Peralta V et al. High Levels of Olea europaea Pollen and Relation with Clinical Findings. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**119**:133–137.
96. Fernández-González D, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, Valencia-Barrera RM, Camazón-Izquierdo B, De Nuntiiis P et al. Platanus pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2010;**40**:1701–1708.
97. Sabariego S, Gutiérrez Bustillo M, Cervigó P, Morales N, Cuesta P. Forecasting airborne Platanus pollen in the Madrid region. *Grana* 2008; 47:234–40.
98. Subiza J, Jerez M, Jiménez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S et al. Allergenic pollen pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol* 1995;**96**:15–23.
99. Asturias JA, Ibarrola I, Bartolome B, Ojeda I, Malet A, Martínez A. Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from Platanus acerifolia pollen. *Allergy* 2002;**57**:221–227.
100. Alcázar P, Cariñanos P, De Castro C, Guerra F, Moreno C, Dominguez-Vilches E et al. Airborne plane-tree (Platanus hispanica) pollen distribution in the city of Córdoba, South-western Spain, and possible implications on pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004;**14**:238–243.
101. Pahus L, Gouitaa M, Sofalvi T, Alagha K, Gras D, Chanez P et al. Cypress pollen allergy is responsible for two distinct phenotypes of allergic rhinitis different from other pollinosis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2018;**50**:28.
102. Sin AZ, Ersoy R, Gulbahar O, Ardeniz O, Gokmen NM, Kokuludag A. Prevalence of cypress pollen sensitization and its clinical importance in Izmir, Turkey, with cypress allergy assessed by nasal provocation. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;**18**:46–51.
103. Charpin D, Pichot C, Belmonte J, Sutra J-P, Zidkova J, Chanez P et al. Cypress Pollinosis: from Tree to Clinic. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019;**56**:174–195.
104. Villalba M, Barderas R, Mas S, Colás C, Batanero E, Rodríguez R. Amaranthaceae pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014;**24**:371–381; quiz 2 p preceding 382.
105. Pola J, Subiza J, Zapata C, Moral A, Feo F, Aerobiology Committee of the Spanish Society of Allergology and Clinical Immunology. Correlation between total annual atmospheric pollen counts for Chenopodiaceae--Amaranthaceae and the prevalence of positive skin prick tests to Chenopodium and/or Salsola pollen extracts: a multicenter study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;**19**:73–74.

106. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008;**63**:1550–1558.
107. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* 2013;**6**:17.
108. M. Villalba Díaz, D. Barber Hernández, A. Pomés, Sacristan Salgado, Rodrigo Calabia. Alérgenos. In: *Tratado de alergología. 2^a Edición*. Majadahonda, Madrid: Ergon 2016
109. Carlsson L, Nyström L-E, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 1977;**115**:465–483.
110. Lindberg U, Schutt CE, Hellsten E, Tjäder A-C, Hult T. The use of poly(L-proline)-Sephadex in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1988;**967**:391–400.
111. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NCW, Lindberg U. The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature* 1993;**365**:810–816.
112. Hansson A, Skoglund G, Lassing I, Lindberg U, Ingelman-Sundberg M. Protein kinase C-dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂). *Biochem Biophys Res Commun* 1988;**150**:526–531.
113. Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 1985;**314**:472–474.
114. Polet D, Lambrechts A, Vandepoele K, Vandekerckhove J, Ampe C. On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins. *FEBS Lett* 2007;**581**:211–217.
115. Cui Y, Yu L, Teng F, Zhang C, Wang N, Yang L et al. Transcriptomic/proteomic identification of allergens in the mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Allergy* 2016;**71**:1635–1639.
116. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol* 2010;**6**:1.
117. Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 1991;**253**:557–560.
118. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992;**175**:377–385.

119. Offermann LR, Schlachter CR, Perdue ML, Majorek KA, He JZ, Booth WT et al. Structural, Functional, and Immunological Characterization of Profilin Panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J Biol Chem* 2016;**291**:15447–15459.
120. Chruszcz M, Kapingidza AB, Dolamore C, Kowal K. A robust method for the estimation and visualization of IgE cross-reactivity likelihood between allergens belonging to the same protein family. *PLOS ONE* 2018;**13**:e0208276.
121. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Htmlemt Glyphamp Asciiamp Exp Allergy* 2006;**36**:920–929.
122. Lund G, Brand S, Ramos T, Jimeno L, Boissy P, Vega F et al. Strong and frequent T-cell responses to the minor allergen Phl p 12 in Spanish patients IgE-sensitized to Profilins. *Allergy* Published Online First: 9 November 2017. doi:10.1111/all.13351
123. Orovitg A, Guardia P, Barber D, de la Torre F, Rodríguez R, Villalba M et al. Enhanced diagnosis of pollen allergy using specific immunoglobulin E determination to detect major allergens and panallergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;**21**:253–259.
124. Barber D, Díaz-Perales A, Villalba M, Chivato T. Challenges for Allergy Diagnosis in Regions with Complex Pollen Exposures. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;**15**:496.
125. Abengozar, R. (2014). Estudio observacional para la determinación de los perfiles de sensibilización alérgica a pólenes en el área sanitaria de Toledo. Establecimiento del grado de concordancia entre diferentes técnicas diagnósticas y papel de los panalérgenos en la interpretación diagnóstica de la alergia a pólenes. Universidad de Alcalá. Disponible en: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=XOpFfmaH4Kc%3D> Consultada 23 de Marzo de 2021.
126. Panzner P, Vachová M, Vítovcová P, Brodská P, Vlas T. A Comprehensive Analysis of Middle-European Molecular Sensitization Profiles to Pollen Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;**164**:74–82.
127. Iliopoulou A, Petrodimopoulou M, Konstantakopoulou M, Pasioti M, Papadopoulou A, Mikos N et al. Profilin sensitization and its clinical relevance to a population of atopic adults in Greece. *Rev Fr Allergol* 2018;**58**:72–76.
128. Scala E, Abeni D, Guerra EC, Locanto M, Pirrotta L, Meneguzzi G et al. Cosensitization to profilin is associated with less severe reactions to foods in nsLTPs and storage proteins reactors and with less severe respiratory allergy. *Allergy* 2018;**73**:1921–1923.
129. Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, Stapel SO, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Aalberse RC et al. IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**110**:435–442.

130. Pauli G, Oster JP, Deviller P, Heiss S, Bessot JC, Susani M et al. Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: Diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J Allergy Clin Immunol* 1996;**97**:1100–1109.
131. Santos A, Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol* 2011;**155**:191–204.
132. Elfman L, Svensson M, Lidholm J, Pauli G, Valenta R. Different Profiles in Specific IgE to rBet v 1 and rBet v 2 in Patients Allergic to Birch Pollen from Six Countries. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**113**:249–251.
133. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colas C, Dávila I et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy* 2009;**39**:1764–1773.
134. Darsow U, Brockow K, Pfab F, Jakob T, Petersson CJ, Borres MP et al. Heterogeneity of molecular sensitization profiles in grass pollen allergy - implications for immunotherapy?: Allergens. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:778–786.
135. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, Macrì F, Pingitore G, Di Rienzo Businco A et al. Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: Implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**129**:834–839.e8.
136. Beitia JM, López-Matas MA, Alonso A, Vega A, Mateo B, Cárdenas R et al. Allergenic Profile to *Phleum pratense* and Immunological Changes Induced after Grass Allergen-Specific Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;**165**:9–17.
137. Movérare R, Kosunen TU, Haahtela T. Change in the pattern of IgE reactivity to timothy grass and birch pollen allergens over a 20-year period. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;**16**:274–278.
138. Ledesma A, Rodríguez R, Villalba M. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy* 1998;**53**:520–526.
139. Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Gonzalez EM, Monsalve RI, Huecas S et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002;**57**:6–16.
140. Quiralte J, Llanes E, Barral P, Arias de Saavedra JM, Sáenz de San Pedro B, Villalba M et al. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy* 2005;**60**:360–365.
141. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Aguirre M, Martínez A, Palacios R et al. Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Mol Immunol* 1998;**35**:469–478.
142. San Nicolás M, Braun T, Eder K, Berghaus A, Gröger M. Clinical Relevance of IgE to Profilin and/or Polcalcin in Pollen-Sensitized Patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;**169**:101–107.

143. Muehlmeier G, Maier H. Polysensitisation to pollen due to profilin and calcium-binding protein: distribution of IgE antibodies to marker allergens in grass and birch pollen allergic rhinitis patients in southern Germany. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;**271**:719–725.
144. Barderas R, Villalba M, 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 immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**113**:1192–1198.
145. Vallverdú A, García-Ortega P, Martínez J, Martínez A, Esteban MI, de Molina M et al. *Mercurialis annua*: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**112**:356–364.
146. Kwaasi AAA, Harfi HA, Parhar RS, Saleh S, Collison KS, Panzani RC et al. Cross-reactivities between date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polypeptides and foods implicated in the oral allergy syndrome. *Allergy* 2002;**57**:508–518.
147. Feo F, Martinez J, Martinez A, Galindo PA, Cruz A, Garcia R et al. Occupational allergy in saffron workers. *Allergy* 1997;**52**:633–641.
148. Nouri HR, Sankian M, Vahedi F, Afsharzadeh D, Rouzbeh L, Moghadam M et al. Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:3169–3178.
149. Vallverdú A, Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J et al. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin)★1★2★3★4★5★6★7★8. *J Allergy Clin Immunol* 1998;**101**:363–370.
150. Ruiz-García M, García Del Potro M, Fernández-Nieto M, Barber D, Jimeno-Nogales L, Sastre J. Profilin: a relevant aeroallergen? *J Allergy Clin Immunol* 2011;**128**:416–418.
151. Tordesillas L, Pacios LF, Palacín A, Cuesta-Herranz J, Madero M, Díaz-Perales A. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins: B epitopes of melon profiling. *Clin Exp Allergy* 2009;**40**:174–181.
152. Lopez-Torrejon G, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Sanchez-Jimenez M, Alvarez J, Rodriguez J et al. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Immunol Immunopathol* 2005;**35**:1065–1072.
153. Crespo JF, Retzek M, Foetisch K, Sierra-Maestro E, Cid-Sanchez AB, Pascual CY et al. Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Mol Nutr Food Res* 2006;**50**:282–290.
154. Lopez-Torrejon G, Ibanez MD, Ahrazem O, Sanchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M et al. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy* 2005;**60**:1424–1429.

155. Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Pérez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M et al. Identification of Major Allergens in Watermelon. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;**149**:291–298.
156. Cases B, Pastor-Vargas C, Gil Dones F, Perez-Gordo M, Maroto AS, de las Heras M et al. Watermelon Profilin: Characterization of a Major Allergen as a Model for Plant-Derived Food Profilins. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;**153**:215–222.
157. Kapingidza AB, Pye SE, Hyde N, Dolamore C, Pote S, Schlachter CR et al. Comparative structural and thermal stability studies of Cuc m 2.0101, Art v 4.0101 and other allergenic profilins. *Mol Immunol* 2019;**114**:19–29.
158. Maity S, Bhakta S, Bhowmik M, Sircar G, Bhattacharya SG. Identification, cloning, and immunological studies on a major eggplant (*Solanum melongena* L.) allergen Sola m 1: A new member of profilin allergen family. *Mol Immunol* 2020;**118**:210–221.
159. Rodríguez-Perez R, Crespo JF, Rodríguez J, Salcedo G. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:634–639.
160. Núñez R, Carballada F, Lombardero M, Jimeno L, Boquete M. Profilin as an aeroallergen by means of conjunctival allergen challenge with purified date palm profilin. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;**158**:115–119.
161. Poncet P, Sénéchal H, Charpin D. Update on pollen-food allergy syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2020;**16**:561–578.
162. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015;**70**:1079–1090.
163. Gadermaier G, Wopfner N, Wallner M, Egger M, Didierlaurent A, Regl G et al. Array-based profiling of ragweed and mugwort pollen allergens. *Allergy* 2008;**63**:1543–1549.
164. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles. *Allergy* 2003;**58**:929–932.
165. Alvarado MI, Jimeno L, De La Torre F, Boissy P, Rivas B, Lázaro MJ et al. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. *Allergy* 2014;**69**:1610–1616.
166. Far J, Wuthrich B, Vieths S. Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;**25**:1018–1023.

167. Brandi SL, Poulsen LK, Garvey LH. The Clinical Relevance of Natural Rubber Latex-Specific IgE in Patients Sensitized to Timothy Grass Pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2019;**178**:345–354.
168. Gürlek F, Ünsel M, Ardeniz Ö, Peker Koc Z, Gülbahar O, Sin AZ et al. Misleading Allergens in the Diagnosis of Latex Allergy: Profilin and Cross-Reactive Carbohydrate Determinants. *Int Arch Allergy Immunol* 2018;**176**:1–7.
169. Pitsios C, Iliopoulou A, Kontogianni M, Papagregoriou G. Detection of profilin in SPT extracts that are supposed to contain it. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2019;**47**:12–15.
170. Segura N, Abos T, Compaired JA, Compés E, Guallar I, Morales M et al. Influence of profilin on sensitisation profiles determined by cutaneous tests and IgE to major allergens in polysensitized patients. *Clin Transl Allergy* 2016;**6**:23.
171. Asero R, Wopfner N, Gruber P, Gadermaier G, Ferreira F. Artemisia and Ambrosia hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2006;**36**:658–665.
172. Rodríguez Del Río P, Díaz-Perales A, Sánchez-García S, Escudero C, Ibáñez MD, Méndez-Brea P et al. Profilin, a Change in the Paradigm. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018;**28**:1–12.
173. Barber Hernández D. Could Profilin Be a ‘Canary in a Coal Mine’ of the Increasing Allergy Epidemic? *Int Arch Allergy Immunol* 2015;**168**:1–2.
174. Asero R, Tripodi S, Dondi A, Di Rienzo Businco A, Sfika I, Bianchi A et al. Prevalence and Clinical Relevance of IgE Sensitization to Profilin in Childhood: A Multicenter Study. *Int Arch Allergy Immunol* 2015;**168**:25–31.
175. Sastre J, Rodríguez F, Campo P, Laffond E, Marín A, Alonso MD. Adverse reactions to immunotherapy are associated with different patterns of sensitization to grass allergens. *Allergy* 2015;**70**:598–600.
176. Huss-Marp J, Darsow U, Brockow K, Pfab F, Weichenmeier I, Schober W et al. Can immunoglobulin E-measurement replace challenge tests in allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2011;**41**:1116–1124.
177. Hamilton RG. Provocation tests with objective measures remain more diagnostic than surrogate immunoglobulin E antibody measures of sensitization: Provocation tests remain more diagnostic than surrogate IgE antibody measures. *Clin Exp Allergy* 2011;**41**:1048–1049.
178. García-Sánchez J, Trigo M del M, Recio M. Extraction and quantification of Ole e 1 from atmospheric air samples: An optimized protocol. *Chemosphere* 2019;**225**:490–496.
179. Moya R, Rubio V, Beitia JM, Carnés J, López-Matas MA. Purification and immunochemical characterization of Pla 1 2, the profilin from *Plantago lanceolata*. *Mol Immunol* 2017;**83**:100–106.

180. Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001;**56**:478–490.
181. Fauquert J-L, Jedrzejczak-Czechowicz M, Rondon C, Calder V, Silva D, Kvenshagen BK et al. Conjunctival allergen provocation test : guidelines for daily practice. *Allergy* 2017;**72**:43–54.
182. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, Comité Científico, Novartis Farmacéutica. *Manual SEPAR de procedimientos*. Barcelona: Doyma 2005
183. Heinzerling L, Frew AJ, Bindslev-Jensen C, Bonini S, Bousquet J, Bresciani M et al. Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe - a survey from the GA2LEN network*. *Allergy* 2005;**60**:1287–1300.
184. Möller C, Björkstén B, Nilsson G, Dreborg S. The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy* 1984;**39**:37–41.
185. Kopferschmitt-Kubler MC, Bessot JC, Pauli G. [The pertinence of bronchial provocation tests to allergens]. *Rev Mal Respir* 1993;**10**:209–215.
186. Moscato G, Pala G, Barnig C, De Blay F, Del Giacco SR, Folletti I et al. EAACI consensus statement for investigation of work-related asthma in non-specialized centres. *Allergy* 2012;**67**:491–501.
187. Yan K, Salome C, Woolcock AJ. Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. *Thorax* 1983;**38**:760–765.
188. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O’Byrne PM, Anderson SD et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993;**16**:53–83.
189. Hendeles L, Harman E. Use of allergen bronchoprovocation to screen drugs for anti-asthma activity. *Pharmacotherapy* 1997;**17**:39S-49S.
190. Melillo G, Bonini S, Cocco G, Davies RJ, de Monchy JG, Frølund L et al. EAACI provocation tests with allergens. Report prepared by the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee on provocation tests with allergens. *Allergy* 1997;**52**:1–35.
191. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975;**56**:323–327.
192. Frølund L. Bronchial allergen challenge methodological studies. *Allergy* 1996;**51**:1–41.
193. Diamant Z, Gauvreau GM, Cockcroft DW, Boulet L-P, Sterk PJ, de Jongh FHC et al. Inhaled allergen bronchoprovocation tests. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**132**:1045-1055.e6.

194. Swanson MC, Agarwal MK, Reed CE. An immunochemical approach to indoor aeroallergen quantitation with a new volumetric air sampler: studies with mite, roach, cat, mouse, and guinea pig antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**76**:724–729.
195. Fernandez-Caldas E, Swanson MC, Pravda J, Welsh P, Yunginger JW, Reed CE. Immunochemical Demonstration of Red Oak Pollen Aeroallergens outside the Oak Pollination Season. *Grana* 1989;**28**:205–209.
196. Gabaldón Arguisuelas, Antonia. Estudio aerobiológico del municipio de Las Rozas de Madrid y aplicación de resultados al control del polen alergénico. Universidad Complutense de Madrid. 2016. Disponible en <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38617/1/T37555.pdf> Consultada 17 de Diciembre de 2018.
197. Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, Martín-Martín R, Fernández-Caldas E, Galindo PA et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;**22**:154–159.
198. Ruiz-Hornillos J, López-Matas MA, Berges Jimeno P, Henríquez A, Blanco S, Seoane-Rodríguez M et al. Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases. *Allergy* 2020;**75**:853–861.
199. Villalta D, Asero R. Sensitization to the pollen pan-allergen profilin. Is the detection of immunoglobulin E to multiple homologous proteins from different sources clinically useful? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;**20**:591–595.
200. Asturias JA, Ibarrola I, Fernández J, Arilla MC, González-Rioja R, Martínez A. Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2005;**35**:374–381.
201. Behrendt H, Becker WM. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol* 2001;**13**:709–715.
202. Taylor PE, Jacobson KW, House JM, Glovsky MM. Links between pollen, atopy and the asthma epidemic. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;**144**:162–170.
203. De Linares C, Nieto-Lugilde D, Alba F, Díaz de la Guardia C, Galán C, Trigo MM. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2007;**37**:125–132.
204. De Linares C, Díaz de la Guardia C, Nieto Lugilde D, Alba F. Airborne study of grass allergen (Lol p 1) in different-sized particles. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;**152**:49–57.
205. Katz DSW, Batterman SA. Urban-scale variation in pollen concentrations: A single station is insufficient to characterize daily exposure. *Aerobiologia* 2020;**36**:417–431.

206. Feo Brito F, Mur Gimeno P, Carnés J, Fernández-Caldas E, Lara P, Alonso AM et al. Grass pollen, aeroallergens, and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;**20**:295–302.
207. Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, García-Sánchez A, Vergara N, Asturias JA et al. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 2006;**96**:858–864.
208. Rossi RE, Melioli G, Monasterolo G, Harwanegg C, Rossi L, Canonica GW et al. Sensitization profiles in polysensitized patients from a restricted geographical area: further lessons from multiplexed component resolved diagnosis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2011;**43**:171–175.
209. Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M et al. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;**17 Suppl 1**:11–16.
210. Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:481–488.
211. Barnes C, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J. Hourly variation of airborne ragweed pollen in Kansas City. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 2001;**86**:166–171.
212. Sierra-Heredia C, North M, Brook J, Daly C, Ellis AK, Henderson D et al. Aeroallergens in Canada: Distribution, Public Health Impacts, and Opportunities for Prevention. *Int J Environ Res Public Health* 2018;**15**. doi:10.3390/ijerph15081577
213. Bishan C, Bing L, Chixin C, Junxia S, Shulin Z, Cailang L et al. Relationship between airborne pollen assemblages and major meteorological parameters in Zhanjiang, South China. *PloS One* 2020;**15**:e0240160.
214. Solomon WR. Airborne pollen: a brief life. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**109**:895–900.
215. Barnes C, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J. The effect of temperature, relative humidity and rainfall on airborne ragweed pollen concentrations. *Aerobiologia* 2001;**17**:61–68.
216. Alfaya T, Feo Brito F, García Rodríguez C, Pineda F, Lucas JA, Gutiérrez Mañero FJ et al. *Lolium perenne* pollen from a polluted city shows high allergenic potency and increased associated Enterobacteriaceae counts. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014;**24**:132–134.
217. Frank U, Ernst D. Effects of NO₂ and Ozone on Pollen Allergenicity. *Front Plant Sci* 2016;**7**. doi:10.3389/fpls.2016.00091

218. Ghiani A, Aina R, Asero R, Bellotto E, Citterio S. Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy* 2012;**67**:887–894.
219. Lucas JA, Gutierrez-Albanchez E, Alfaya T, Feo-Brito F, Gutiérrez-Mañero FJ. Oxidative stress in ryegrass growing under different air pollution levels and its likely effects on pollen allergenicity. *Plant Physiol Biochem* 2019;**135**:331–340.
220. Lucas JA, Gutierrez-Albanchez E, Alfaya T, Feo Brito F, Gutierrez-Mañero FJ. Search for New Allergens in *Lolium perenne* Pollen Growing under Different Air Pollution Conditions by Comparative Transcriptome Study. *Plants Basel Switz* 2020;**9**. doi:10.3390/plants9111507
221. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol* 2016;**27 Suppl 23**:1–250.
222. Metz Favre C, Pauli G, , Castro L, Valenta R de BF. Bet v 2 Responsibility in Birch-Induced Symptoms. *J Allergy Ther* 2014;**05**. doi:10.4172/2155-6121.1000169
223. Asero R, Villalta D. Profilin may be a primary airborne sensitizer: a case report. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;**23**:134–135.
224. Plaza MP, Alcázar P, Galán C. Correlation between airborne *Olea europaea* pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012-2014. *Int J Biometeorol* 2016;**60**:1841–1847.
225. Erbas B, Chang J-H, Dharmage S, Ong EK, Hyndman R, Newbiggin E et al. Do levels of airborne grass pollen influence asthma hospital admissions? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2007;**37**:1641–1647.
226. Galan C, Antunes C, Brandao R, Torres C, Garcia-Mozo H, Caeiro E et al. Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1. *Allergy* 2013;**68**:809–812.
227. Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, Rosace D, Fernández P, Martín-Antoniano IA et al. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy* Published Online First: 9 August 2018. doi:10.1111/all.13563
228. Connell JT. Quantitative intranasal pollen challenges. 3. The priming effect in allergic rhinitis. *J Allergy* 1969;**43**:33–44.
229. Lipp T, Acar Şahin A, Aggelidis X, Arasi S, Barbalace A, Bourgoin A et al. Heterogeneity of Pollen Food Allergy Syndrome in Seven Southern European Countries: the @IT.2020 Multicenter Study. *Allergy* Published Online First: 25 January 2021. doi:10.1111/all.14742
230. Matricardi PM. Molecular profile clustering of IgE responses and potential implications for specific immunotherapy: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;**13**:438–445.

231. Hatzler L, Panetta V, Lau S, Wagner P, Bergmann RL, Illi S et al. Molecular spreading and predictive value of preclinical IgE response to *Phleum pratense* in children with hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:894-901.e5.
232. Wölbing F, Kunz J, Kempf WE, Grimm C, Fischer J, Biedermann T. The clinical relevance of birch pollen profilin cross-reactivity in sensitized patients. *Allergy* 2017;**72**:562–569.
233. Hollander A, Gordon S, Renström A, Thissen J, Doekes G, Larsson PH et al. Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. I. Analysis of air samples. *Allergy* 1999;**54**:142–149.
234. Levetin E. Methods for aeroallergen sampling. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;**4**:376–383.
235. Raulf M, Buters J, Chapman M, Cecchi L, de Blay F, Doekes G et al. Monitoring of occupational and environmental aeroallergens-- EAACI Position Paper. Concerted action of the EAACI IG Occupational Allergy and Aerobiology & Air Pollution. *Allergy* 2014;**69**:1280–1299.
236. Jato V, Rodríguez-Rajo FJ, González-Parrado Z, Elvira-Rendueles B, Moreno-Grau S, Vega-Maray A et al. Detection of airborne Par j 1 and Par j 2 allergens in relation to Urticaceae pollen counts in different bioclimatic areas. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 2010;**105**:50–56.
237. Rodríguez MJ, Mascaraque A, Ramos-Soriano J, Torres MJ, Perkins JR, Gomez F et al. Pru p 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy. *Mol Nutr Food Res* 2017;**61**. doi:10.1002/mnfr.201700110
238. Gomez F, Bogas G, Gonzalez M, Campo P, Salas M, Diaz-Perales A et al. The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 2017;**47**:339–350.
239. Nucera E, Aruanno A, Rizzi A, Pecora V, Patriarca G, Buonomo A et al. Profilin desensitization: A case series. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016;**29**:529–536.
240. Brożek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:466–476.

XI. ABREVIATURAS

IgG: Inmunoglobulina G

DE: Desviación estándar

EAACI: Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica

ES: Estadísticamente significativo

FcεRI: Receptor IgE de alta afinidad

FEV1: Volumen espirado forzado en el primer segundo

GEMA: Guía Española de Manejo del Asma

GINA: Iniciativa Global para el Asma

HR%: Humedad relativa

HRB: Hiperrespuesta bronquial

HUIE: Hospital Universitario Infanta Elena

IC: Intervalo de confianza

IgE: Inmunoglobulina E

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

IPA: Índice polínico anual

IPM: Índice polínico mensual

Llu: Lluvia

LTP: Proteínas de transferencia de lípidos

NO: Monóxido de nitrógeno

NO2: Dióxido de nitrógeno

O3: Ozono

OR: Odds ratio

PC: Prueba cutánea

PC20: Concentración del extracto que induce un deterioro del FEV1 del 20%

PFAS: Síndrome de alergia alimentaria del polen

PM10: Material con tamaño de partícula superior a 10 micras

PM2,5: Material con tamaño de partícula inferior a 2,5 micras

PNI: Pólenes no identificados

PPBE: Prueba de provocación bronquial específica

PPP: Periodo de polinización principal

Pre: Presión barométrica

PT: Polen total

RA: Rinitis alérgica

RS: Radiación solar

SAO: Síndrome de alergia oral

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico

SEAIC: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

SO2: Dióxido de azufre

Th1: Linfocitos T helper tipo 1

Th2: Linfocitos T helper tipo 2

Tmp: Temperatura

VV: Velocidad del viento

XII. ANEXOS

XII.1 Anexo I Cuaderno de recogida de datos.

- DATOS EPIDEMIOLÓGICOS
 - Fecha de Nacimiento:
 - Edad:
 - Sexo: Hombre Mujer
 - Antecedentes Personales
 - Otros
 - Antecedentes Familiares Atopia (1er grado)
- Alergia Respiratoria
 - Diagnóstico y clasificación de Rinitis.
 - Tiempo de evolución (años)
 - Clasificación: (según criterios Guía ARIA(240))
 - Intermitente Leve
 - Intermitente Moderada- Grave
 - Persistente Leve
 - Persistente Moderada-Grave
 - Diagnóstico Conjuntivitis
 - Diagnóstico y severidad del Asma.
 - Tiempo de evolución (años)
 - Clasificación de la gravedad Asma Adulto según guía GEMA(30)
 - Intermitente
 - Persistente Leve
 - Persistente Moderada
 - Persistente Severa
 - Clasificación del control según guía GEMA(30):
 - Bien controlada
 - Parcialmente controlada
 - Mal Controlada
- Comorbilidades alérgicas:
 - Alergia a Alimentos:
 - Alimento implicado
 - Clínica

- SAO
- Urticaria
- AE
- Síntomas Digestivos
- Síntomas Respiratorios
- Anafilaxia
- Alergia a Medicamentos
- Urticaria aguda
- Urticaria crónica
- Dermatitis Atópica.

XII.2 Anexo II Procedimiento cambio de filtro captador *Air Sentinel*®

1. Quitar tapa



2. Sujetar filtro y tirar hacia arriba de la segunda tapa



3. Doblar filtro dos veces y guardar en bolsa de plástico



4. Coger filtro con capa rugosa hacia arriba



5. Colocarlo debajo de segunda tapa y encajar



6. Colocar tapa.



XII.3 Anexo III Aprobación del estudio por el CEIC del IIS-FJD.



INFORME DEL COMITE ÉTICO DE INVESTIGACION CLINICA

Dr. D. Javier Bécares Martínez, Secretario del COMITE ÉTICO DE INVESTIGACION CLINICA DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

CERTIFICA:

Que en la reunión del CEIC-FJD que tuvo lugar el día el 29 de marzo 2011 (acta nº 03/11) se evaluó el estudio referido a continuación y una vez resueltas las aclaraciones solicitadas, se decidió:

A P R O B A R

La propuesta para que se realice el estudio observacional titulado: **"Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes."** el cual está previsto que sea dirigido en el Hospital Infanta Elena de Valdemoro (Madrid) por el Dr. Francisco J. Ruiz Hornillos del Servicio de Alergia.

Además, hace constar que:

1. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la CAM– para que la decisión del citado CEIC sea válida.
2. El Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para la realización de este tipo de estudios.
3. El CEIC-FJD, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas BPC.
4. La composición actual del CEIC-FJD es la siguiente:

Dra. Mª José Almodóvar Carretón. *Farmacéutica de Atención Primaria*
 Dra. Carmen Ayuso García. *Médico Asistencial. Miembro Comité de Investigación.*
 Dr. Javier Bécares Martínez. (*Secretario*). *Farmacéutico de la FJD*
 Dra. Miriam Blanco Rodríguez. *Médico Asistencial*
 Dra. Macarena Bonilla Porras. (*Vicepresidenta*). *Farmacéutico de la FJD*
 Dr. Orenco Bosch Esteve. (*Presidente*). *Médico Asistencial*
 Dr. Emilio Calvo Crespo (*Presidente en funciones*). *Médico Asistencial.*
 Dr. Angel Campos Ginés. *Médico Asistencial*
 Dña. Teresa Castillo Sánchez. *DUE*
 Dr. Ricardo Fernández Roblas. *Médico Asistencial*
 Dr. Raimundo Gutiérrez Fonseca. *Médico Asistencial.*
 Dra. Ana León Carbonero. *Médico Asistencial*
 D. Jose Angel Martínez Peláez. *Lego no vinculado a la Institución*
 D. Manuel Matamoros Fernández. *Lego no vinculada a la Institución*
 D. Luis Ortega Alba. *Abogado*
 Dr. Javier Plaza Arranz. *Médico Asistencial*
 Dr. Germán Peces Barba. *Médico Asistencial. Miembro Comité de Investigación*
 Dra. Francisca Rodríguez Hervás. *Médico de Atención Primaria*
 Dr. Francisco Javier Ruiz Hornillos. *Médico Asistencial*
 Dra. Aranzazu Sancho López. *Farmacóloga Clínico*
 Dr. Fernando Suárez Sipmann. *Médico Asistencial*

7. Asimismo, hacemos constar que no existe contraprestación económica para el centro ni para el investigador.

Lo que firmo en Madrid a 16 mayo de 2011

Dr. Javier Bécares Martínez



Vº Bº

Juan Antonio Alvaro de la Parra
Gerente HIE



XII.4 Anexo IV Consentimientos informados

Anexo IVA Consentimiento informado de paciente caso

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO: Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Está diseñado para darle a usted una idea de lo que trata este estudio de investigación y de lo que le ocurrirá si usted elige participar en el mismo, esto es: el objetivo de este estudio, qué sucederá durante el estudio y cuáles son sus responsabilidades, el riesgo de padecer efectos secundarios por su participación en el estudio, la atención médica y los posibles beneficios de su participación en este estudio de investigación y las respuestas a las preguntas que pueda tener. Es necesario que usted conozca esta información para que pueda tomar la decisión correcta de participar o no en el estudio y le rogamos lea detenidamente este documento y que se tome todo el tiempo que necesite para reflexionar sobre el estudio.

Este formulario puede contener palabras, conceptos y procedimientos que quizás usted no comprenda. Por favor pida a su médico o al personal del estudio que le explique la información que usted no entienda claramente. También se le dará la oportunidad de hacer cualquier otra pregunta que tenga sobre el estudio.

Objetivos del estudio y antecedentes:

Se le ha propuesto participar voluntariamente en un estudio de investigación. Usted ha sido diagnosticado por su médico de rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes y presenta una prueba cutánea positiva a Profilina.

Las Profilinas Son proteínas que están presentes en el polen de muchas plantas (gramíneas, olivo, etc.), en algunos alimentos vegetales, y látex. Entre el 10-30% de los pacientes con alergia al polen tienen una prueba cutánea positiva a la Profilina.

Las pruebas cutáneas solo demuestran la presencia de IgE específica (anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas) pero no establecen la relevancia clínica, es decir si esta proteína es la causante de los síntomas del paciente.

Para saber si será capaz de producir síntomas respiratorios debemos recurrir a una historia clínica detallada que correlacione los síntomas con la presencia de esta proteína en el ambiente y, en el caso de la alergia respiratoria a pruebas de Provocación Bronquial para garantizar el diagnóstico correcto.

El objetivo del estudio es conocer la relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes para establecer si estas proteínas son capaces de reproducir los síntomas que el paciente presenta y por lo tanto establecerlas como causa de los mismos.

Procedimientos del Estudio:

Los procedimientos que se le van a realizar a lo largo del estudio son procedimientos habituales que se hacen a otros pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma y probablemente se le practicarían también aunque no entren en el estudio.

Si decidiera participar en el estudio su participación consistiría en cuatro puntos fundamentales:

- Se extraerá una **muestra de sangre** para estudio en laboratorio. Las muestras de sangre se utilizan únicamente para los fines de este estudio clínico. Las muestras de sangre serán conservadas por el laboratorio durante 5 años, luego serán destruidas
- **Prueba de provocación conjuntival** con extracto de profilina: la prueba consiste en la aplicación de unas gotas en el ojo, con concentraciones crecientes de profilina, cada 15 minutos hasta que se obtiene una respuesta positiva o se administra la dosis de mayor concentración del alérgeno.
- **Prueba de Provocación Bronquial Específica** con extracto de profilina, es una técnica que consiste en la inhalación de concentraciones crecientes de profilina en aerosol, controlando la función pulmonar mediante espirometrías.
- Rellenar un **diario de síntomas y consumo de medicación**. El paciente rellenará en un registro de síntomas a lo largo de un año, que será semanal a lo largo del periodo de seguimiento excepto durante los meses de mayor polinización (Enero a Junio) que será diario. En este registro se recogerá la presencia o no de síntomas según una escala de severidad de 0 a 3. Con el fin de poderlo correlacionar con la cantidad de polen y profilina que haya en el ambiente en ese momento.

Riesgos y Beneficios:

Estas pruebas no suponen ningún riesgo adicional al que supone el estudio habitual de su patología, aunque no están exentas de riesgo. Las pruebas de provocación pueden ser positivas, produciendo los síntomas de menor, igual o mayor intensidad que la que motivó la consulta (tos, dificultad para respirar, congestión nasal, enrojecimiento ocular, picor, urticaria, vómitos, fiebre, mareo, anafilaxia). Estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico pero excepcionalmente pueden llegar a requerir otros procedimientos de urgencia.

Las pruebas serán realizadas por personal sanitario especializado en las mismas y durante su realización usted recibirá continuamente la asistencia médica necesaria.

La participación en este estudio no supondrá un beneficio inmediato en su patología, pero las investigaciones que se realicen ayudarán en un futuro a mejorar el conocimiento de las herramientas de diagnóstico y tratamiento de las patologías alérgicas.

Confidencialidad

Toda la información que obtengamos de sus pruebas serán tratados de forma confidencial, se llevarán a cabo conforme a la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre sobre la protección de los datos de carácter personal. De acuerdo con la ley mencionada, puede ejercer sus derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos. Para ello, deberá dirigirse al médico del estudio.

Los datos derivados de su participación en el estudio estarán identificados mediante un sistema alfanumérico de codificación interna, nunca con datos personales, solo su médico podrá relacionar estos datos con su historia clínica.

Participación Voluntaria.

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

PARA EL PARTICIPANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo, (nombre y apellidos) _____

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____

❖ Comprendo que mi participación es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo: _____

El paciente

Fdo: _____

El investigador

Anexo IVB Consentimiento Informado para paciente control.**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE (Grupo Control)****TÍTULO: Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Está diseñado para darle a usted una idea de lo que trata este estudio de investigación y de lo que le ocurrirá si usted elige participar en el mismo, esto es: el objetivo de este estudio, qué sucederá durante el estudio y cuáles son sus responsabilidades, el riesgo de padecer efectos secundarios por su participación en el estudio, la atención médica y los posibles beneficios de su participación en este estudio de investigación y las respuestas a las preguntas que pueda tener. Es necesario que usted conozca esta información para que pueda tomar la decisión correcta de participar o no en el estudio y le rogamos lea detenidamente este documento y que se tome todo el tiempo que necesite para reflexionar sobre el estudio.

Este formulario puede contener palabras, conceptos y procedimientos que quizás usted no comprenda. Por favor pida a su médico o al personal del estudio que le explique la información que usted no entienda claramente. También se le dará la oportunidad de hacer cualquier otra pregunta que tenga sobre el estudio.

Objetivos del estudio y antecedentes:

Se le ha propuesto participar voluntariamente en un estudio de investigación. Usted ha sido diagnosticado por su médico de rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes y presenta una prueba cutánea *Negativa* a Profilina.

Las Profilinas Son proteínas que están presentes en el polen de muchas plantas (gramíneas, olivo, etc.), en algunos alimentos vegetales, y látex. Entre el 10-30% de los pacientes con alergia al polen tienen una prueba cutánea positiva a la Profilina.

Las pruebas cutáneas solo demuestran la presencia de IgE específica (anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas) pero no establecen la relevancia clínica, es decir si esta proteína es la causante de los síntomas del paciente.

Para saber si será capaz de producir síntomas respiratorios debemos recurrir a una historia clínica detallada que correlacione los síntomas con la presencia de esta proteína en el ambiente y, en el caso de la alergia respiratoria a pruebas de Provocación Bronquial para garantizar el diagnóstico correcto.

El objetivo del estudio es conocer la relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes para establecer si estas proteínas son capaces de reproducir los síntomas que el paciente presenta y por lo tanto establecerlas como causa de los mismos.

Procedimientos del Estudio:

Los procedimientos que se le van a realizar a lo largo del estudio son procedimientos habituales que se hacen a otros pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma y probablemente se le practicarían también aunque no entren en el estudio.

Si decidiera participar en el estudio su participación consistiría en cuatro puntos fundamentales:

- Se extraerá una **muestra de sangre** para estudio en laboratorio. Las muestras de sangre se utilizan únicamente para los fines de este estudio clínico. Las muestras de sangre serán conservadas por el laboratorio durante 5 años, luego serán destruidas
- **Prueba de provocación conjuntival** con extracto de profilina: la prueba consiste en la aplicación de unas gotas en el ojo, con concentraciones crecientes de profilina, cada 15 minutos hasta que se obtiene una respuesta positiva o se administra la dosis de mayor concentración del alérgeno.
- **Prueba de Provocación Bronquial Específica** con extracto de profilina, es una técnica que consiste en la inhalación de concentraciones crecientes de profilina en aerosol, controlando la función pulmonar mediante espirometrías.
- Rellenar un **diario de síntomas y consumo de medicación**. El paciente rellenará en un registro de síntomas a lo largo de un año, que será semanal a lo largo del periodo de seguimiento excepto durante los meses de mayor polinización (Enero a Junio) que será diario. En este registro se recogerá la presencia o no de síntomas según una escala de severidad de 0 a 3. Con el fin de poderlo correlacionar con la cantidad de polen y profilina que haya en el ambiente en ese momento.

Riesgos y Beneficios:

Estas pruebas no suponen ningún riesgo adicional al que supone el estudio habitual de su patología, aunque no están exentas de riesgo. Las pruebas de provocación pueden ser positivas, produciendo los síntomas de menor, igual o mayor intensidad que la que motivó la consulta (tos, dificultad para respirar, congestión nasal, enrojecimiento ocular, picor, urticaria, vómitos, fiebre, mareo, anafilaxia). Estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico pero excepcionalmente pueden llegar a requerir otros procedimientos de urgencia.

Las pruebas serán realizadas por personal sanitario especializado en las mismas y durante su realización usted recibirá continuamente la asistencia médica necesaria.

La participación en este estudio no supondrá un beneficio inmediato en su patología, pero las investigaciones que se realicen ayudarán en un futuro a mejorar el conocimiento de las herramientas de diagnóstico y tratamiento de las patologías alérgicas.

Confidencialidad

Toda la información que obtengamos de sus pruebas serán tratados de forma confidencial, se llevarán a cabo conforme a la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre sobre la protección de los datos de carácter personal. De acuerdo con la ley mencionada, puede ejercer sus derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos. Para ello, deberá dirigirse al médico del estudio.

Los datos derivados de su participación en el estudio estarán identificados mediante un sistema alfanumérico de codificación interna, nunca con datos personales, solo su médico podrá relacionar estos datos con su historia clínica.

Participación Voluntaria.

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

PARA EL PARTICIPANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo, (nombre y apellidos) _____

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____

❖ Comprendo que mi participación es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

En Madrid, a _____ de _____ de _____

Fdo: _____

El paciente

Fdo: _____

El investigador

Anexo IVC Consentimiento Informado para el Representante del paciente
Caso

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

DEL REPRESENTANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo.....Con DNI/Pasaporte.....

(Nombre y apellidos)

en calidad de

(relación con el participante, padre madre o tutor)

de.....

(Nombre del participante)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____
- Comprendo que la participación de mi hijo/hija es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en sus cuidados médicos
- En mi presencia se le ha dado a mi hijo/hija toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento. está de acuerdo en participar y presto mi conformidad con que participe en el estudio

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo: _____

Fdo: _____

El Representante (Padre, Madre o Tutor)

El investigador

Anexo IVD Consentimiento Informado del Representante del paciente control

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

DEL REPRESENTANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo.....Con DNI/Pasaporte.....

(Nombre y apellidos)

en calidad de

(relación con el participante, padre madre o tutor)

de.....

(Nombre del participante)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____
- Comprendo que la participación de mi hijo/hija es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en sus cuidados médicos
- En mi presencia se le ha dado a mi hijo/hija toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento. está de acuerdo en participar y presto mi conformidad con que participe en el estudio

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo.: _____

Fdo.: _____

El Representante (Padre, Madre o Tutor)

El investigador

Anexo IVF Hoja de Asentimiento paciente caso.**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE (15-18 años)****TÍTULO: Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Su función es que sepa por qué, para qué y cómo puede participar en este estudio y que le puede conllevar.

Este texto puede contener palabras, que quizás no comprenda. Por favor, pida a su médico o al personal del estudio que le explique la información que no entienda claramente.

Objetivos del estudio y antecedentes:

Se le ha propuesto participar voluntariamente en un estudio de investigación. Ha sido diagnosticado por su médico de rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes y presenta una prueba cutánea positiva a Profilina.

Las Profilinas son proteínas que están presentes en el polen de muchas plantas (gramíneas, olivo, etc.), en algunos alimentos. Muchos de los pacientes con alergia al polen tienen una prueba cutánea positiva a la Profilina.

Las pruebas cutáneas no establecen si esta proteína es la causante de los síntomas del paciente. Para saber si será capaz de producir síntomas respiratorios debemos recurrir a una historia clínica detallada que correlacione los síntomas con la presencia de esta proteína en el ambiente y, en el caso de la alergia respiratoria a pruebas de Provocación Bronquial.

El objetivo del estudio es conocer la importancia de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes para saber si estas proteínas son capaces de producir los síntomas que el paciente presenta.

Procedimientos del Estudio:

Los procedimientos que se le van a realizar a lo largo del estudio son procedimientos habituales que se hacen a otros pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma y probablemente se le practicarían también aunque no entren en el estudio.

Si decidiera participar en el estudio su participación consistiría en cuatro puntos fundamentales:

- Se extraerá una **muestra de sangre** para estudio en laboratorio.
- **Prueba de provocación conjuntival** con extracto de profilina: la prueba consiste en la aplicación de unas gotas en el ojo, para ver si te da alergia
- **Prueba de Provocación Bronquial Específica** con extracto de profilina, es una técnica que consiste en la respirar concentraciones crecientes de profilina en aerosol, controlando la función pulmonar mediante espirometrías.
- Rellenar un **diario de síntomas y consumo de medicación**. El paciente rellenará en un registro de síntomas a lo largo de un año, que será semanal a lo

largo del periodo de seguimiento excepto durante los meses de mayor polinización (Enero a Junio) que será diario.

Riesgos y Beneficios:

Estas pruebas no suponen ningún riesgo adicional al que supone el estudio habitual de su patología, aunque no están exentas de riesgo. Las pruebas de provocación pueden ser positivas, produciendo los síntomas de menor, igual o mayor intensidad que la que motivó la consulta (tos, dificultad para respirar, congestión nasal, enrojecimiento ocular, picor, urticaria, vómitos, fiebre, mareo, anafilaxia). Estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico pero excepcionalmente pueden llegar a requerir otros procedimientos de urgencia.

La participación en este estudio no supondrá un beneficio inmediato en su patología, pero las investigaciones que se realicen ayudarán en un futuro a mejorar el conocimiento de las patologías alérgicas.

Participación Voluntaria.

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

PARA EL PARTICIPANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo, (nombre y apellidos) _____

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____
- ❖ Comprendo que mi participación es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo.: _____

Fdo.: _____

El paciente

El investigador

Anexo IVF Hoja de Asentimiento paciente control

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE (Grupo Control) (15-18 años)

TÍTULO: Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Su función es que sepa por qué, para qué y cómo puede participar en este estudio y que le puede conllevar.

Este texto puede contener palabras, que quizás no comprenda. Por favor, pida a su médico o al personal del estudio que le explique la información que no entienda claramente.

Objetivos del estudio y antecedentes:

Se le ha propuesto participar voluntariamente en un estudio de investigación. Ha sido diagnosticado por su médico de rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes y presenta una prueba cutánea *Negativa* a Profilina.

Las Profilinas son proteínas que están presentes en el polen de muchas plantas (gramíneas, olivo, etc.), en algunos alimentos. Muchos de los pacientes con alergia al polen tienen una prueba cutánea positiva a la Profilina.

Las pruebas cutáneas no establecen si esta proteína es la causante de los síntomas del paciente. Para saber si será capaz de producir síntomas respiratorios debemos recurrir a una historia clínica detallada que correlacione los síntomas con la presencia de esta proteína en el ambiente y, en el caso de la alergia respiratoria a pruebas de Provocación Bronquial.

El objetivo del estudio es conocer la importancia de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes para saber si estas proteínas son capaces de producir los síntomas que el paciente presenta.

Procedimientos del Estudio:

Los procedimientos que se le van a realizar a lo largo del estudio son procedimientos habituales que se hacen a otros pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma y probablemente se le practicarían también aunque no entren en el estudio.

Si decidiera participar en el estudio su participación consistiría en cuatro puntos fundamentales:

- Se extraerá una **muestra de sangre** para estudio en laboratorio.
- **Prueba de provocación conjuntival** con extracto de profilina: la prueba consiste en la aplicación de unas gotas en el ojo, para ver si te da alergia
- **Prueba de Provocación Bronquial Específica** con extracto de profilina, es una técnica que consiste en la respirar concentraciones crecientes de profilina en aerosol, controlando la función pulmonar mediante espirometrías.
- Rellenar un **diario de síntomas y consumo de medicación**. El paciente rellenará en un registro de síntomas a lo largo de un año, que será semanal a lo

largo del periodo de seguimiento excepto durante los meses de mayor polinización (Enero a Junio) que será diario.

Riesgos y Beneficios:

Estas pruebas no suponen ningún riesgo adicional al que supone el estudio habitual de su patología, aunque no están exentas de riesgo. Las pruebas de provocación pueden ser positivas, produciendo los síntomas de menor, igual o mayor intensidad que la que motivó la consulta (tos, dificultad para respirar, congestión nasal, enrojecimiento ocular, picor, urticaria, vómitos, fiebre, mareo, anafilaxia). Estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico pero excepcionalmente pueden llegar a requerir otros procedimientos de urgencia.

La participación en este estudio no supondrá un beneficio inmediato en su patología, pero las investigaciones que se realicen ayudarán en un futuro a mejorar el conocimiento de las patologías alérgicas.

Participación Voluntaria.

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

PARA EL PARTICIPANTE

Título del estudio: **Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes.**

Yo, (nombre y apellidos) _____

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido
- He hablado con: (nombre del investigador) _____
- ❖ Comprendo que mi participación es voluntaria y que mi decisión de participación en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo.: _____

Fdo.: _____

El paciente

El investigador

XII.5 Anexo V: Índice de similitud (Antiplagio)

Esta tesis ha sido sometida a un *Software* antiplagio *Turnitin*® *iThenticate* obteniendo un índice de 2%. Después de haber excluido bibliografía, citas y consentimientos, tal y como se refleja en la Figura X-1

The screenshot shows the iThenticate web interface. At the top, the browser address bar displays 'app.ithenticate.com/es/dv/20210312?o=70787560&lang=es'. The page header indicates '44077 palabras • 48 coincidencias • 21 fuentes'. A red circle highlights the '2%' similarity index in the top right corner. The main content area displays the logo of Universidad Francisco de Vitoria (UFV) Madrid, the faculty name 'Facultad de Medicina', the degree 'DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS', the thesis title '“Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes”', and the author's name 'Francisco Javier Ruiz Hornillos'. On the right side, a 'Resumen de Coincidencias' table lists 12 items with their respective similarity percentages.

Item	Source	Similarity
1	Internet 277 palabras Copiado el 17-Sep-2016 kpmg.com	1%
2	Internet 178 palabras Copiado el 01-Oct-2020 khu.gov	<1%
3	Internet 157 palabras Copiado el 08-Abr-2021 netiva.com	<1%
4	Crossref 133 palabras Gentry A, Shewell, Case-Falkson. "Intra and Ocular Allergens and Pollenallergy". <i>Journal</i> 2017	<1%
5	Internet 83 palabras Copiado el 07-Oct-2017 blogspot.es	<1%
6	Internet 47 palabras Copiado el 09-Sep-2016 www.facebook.com	<1%
7	Internet 40 palabras Copiado el 08-Abr-2016 il-projekt.com	<1%
8	Internet 36 palabras Copiado el 28-Oct-2017 www.jiangshimida.com	<1%
9	Internet 33 palabras Copiado el 01-Ene-2015 repositorio	<1%
10	Internet 31 palabras Copiado el 01-Abr-2016	<1%
11	Internet 29 palabras Copiado el 25-Jul-2016 www.simgm.es	<1%
12	Internet 27 palabras Copiado el 26-Mar-2021	<1%

Figura XII-1 Software antiplagio: 2% similitud

Se detectaron similitudes. en la mayoría de los casos accidentales o citadas como se reflejan en las siguientes Figuras X-2, X3 y X3 a modo de ejemplos.

El informe completo se colgará en Zenodo®:

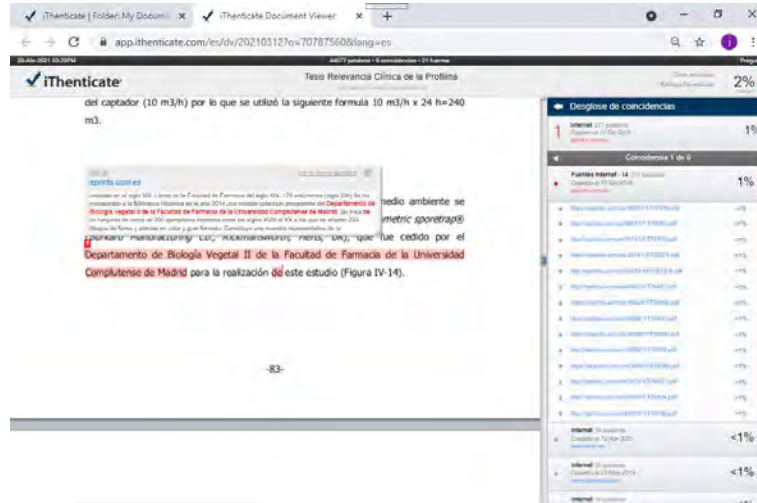


Figura XII-2 Software antiplagio. Ejemplo 1

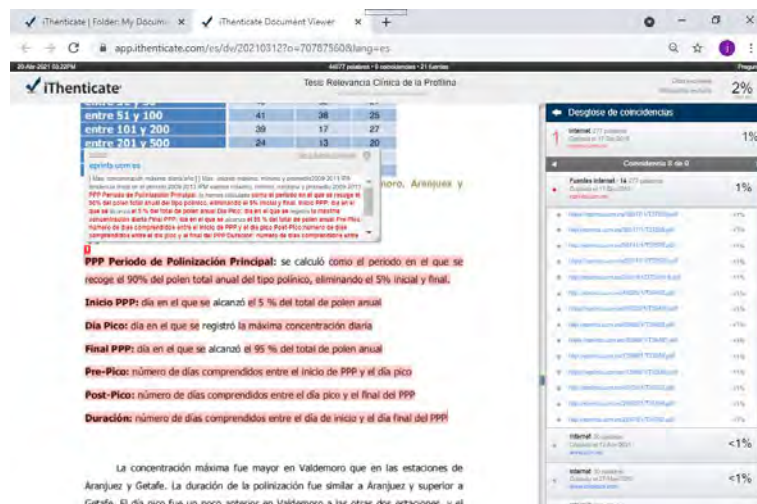


Figura XII-3 Software antiplagio. Ejemplo 2

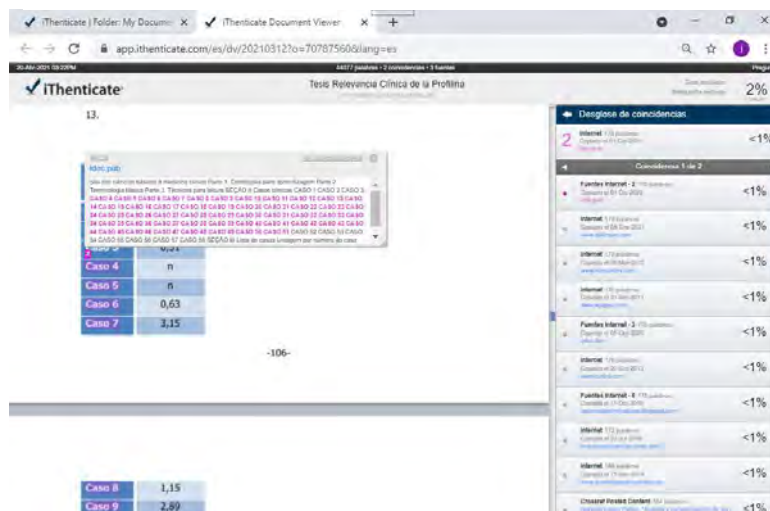


Figura XII-4 Software antiplagio. Ejemplo 3

XII.6 Anexo VI: Concesión de beca investigación Fundación SEAIC.



Barcelona, 27 de Junio de 2012

Dr. Javier Ruíz Hornillos
Hospital Infanta Elena (Valdemoro)
Unidad Alergología
Avda. Reyes Católicos, 21
28342 MADRID

Ref. Convocatoria Ayudas 2011

Estimado compañero:

Tras ser evaluado por dos expertos independientes y por el Comité de Becas de la Fundación para la Investigación de la SEAIC, su proyecto de investigación: *"Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes"*, presentado al Fondo de Investigación de la Fundación de la SEAIC, ha sido dotado con una ayuda por importe de **15.000,00 €**.

Adjuntamos el procedimiento para la liquidación de las facturas así como las normas para el envío de la memoria parcial y final del proyecto. Asimismo recordamos que en cualquier publicación que se derive de dicho proyecto deberá constar que ha sido financiado por la Fundación de la SEAIC.

Le adjuntamos los comentarios a su proyecto, por si pudiera serle de utilidad.

Cordialmente,

Dra. Victoria Cardona
Secretaria Fundación SEAIC

XII.7 Anexo VII: Premios y comunicación de resultados.

- Concesión de beca para ayuda a la investigación de la Fundación SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica) al proyecto de investigación "Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes". **Javier Ruiz Hornillos** (Anexo V).
- Premio a la mejor comunicación póster del XXVIII Congreso Nacional de la SEAIC: "Perfil Clínico de los Pacientes con Rinoconjuntivitis y/o Asma por Alergia a Pólenes con Sensibilización a Profilina." **Javier Ruiz Hornillos**, Aythamy Henríquez Santana, Sandra Blanco Bermejo, Antonio Moreno Fernández, Pilar Berges Gimeno M^a Ángeles López Matas.
- Comunicación Poster en European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, Copenhagen, Denmark. **Ruiz-Hornillos, J**; Moya, R; López-Matas, MA; Henríquez, A; Blanco, S; Moreno, A; Carnes, J. "Purified profilin for in vivo diagnosis of the sensitization to this panallergen". Allergy. 2014 Sep;69 Suppl 99(Suppl 99):138. doi: 10.1111/all.12491.
- Comunicación Oral en Simposio Internacional Aerobiología y Cambio Climático. **Javier Ruiz Hornillos**, Aythamy Henríquez Santana, Sandra Blanco Bermejo, Eva Martín Sopena, María Ángeles López Matas, Pilar Berges Gimeno. "La profilina, un alérgeno ambiental responsable de sintomatología alérgica. Estudio en 3D".
- Ponencia en I Jornada Polinosis. Tratamiento de las alergias al polen en la zona centro. Toledo. "Relevancia clínica de la profilina en los pacientes sensibilizados". Toledo Junio 2018. **Javier Ruiz Hornillos**.
- Ponencia en Curso de Alergia Molecular. Diagnóstico y tratamiento molecular. Segovia "Es realmente inocente la profilina". Segovia, Septiembre 2017. **Javier Ruiz Hornillos**.

- Ponencia en ciclo de sesiones Hospital La Paz. "Relevancia clínica de la profilina en los pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma por alergia a pólenes." Madrid 2015. **Javier Ruiz Hornillos**.
- Publicación en revista Q1/D1 en alergología (2/28) e inmunología (14/159). Factor de impacto: 8.706 según 2019 Journal Citation Reports: **Ruiz-Hornillos J**, López-Matas MA, Berges Jimeno P, Henríquez A, Blanco S, Seoane-Rodríguez M, Mahílo I, Carnés J. Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases. *Allergy*. 2020 Apr;75(4):853-861. doi: 10.1111/all.14140. (Anexo VIII)

XII.8 Anexo VIII Artículo

Received: 2 August 2019 | Revised: 5 November 2019 | Accepted: 14 November 2019
 DOI: 10.1111/all.14340



ORIGINAL ARTICLE

Rhinitis, Sinusitis, and Upper Airway Disease



Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases

Javier Ruiz-Hornillos^{1,2,3} | M. Angeles López-Matas⁴ | Pilar Berges Jimeno⁵ |
 Aythamy Henríquez^{1,2,3} | Sandra Blanco^{1,2,3} | Marta Seoane-Rodríguez^{1,2,3} |
 Ignacio Mahillo^{6,7} | Jerónimo Carnés⁴

¹Allergy Unit, Hospital Universitario Infanta Elena, Valdemoro, Madrid, Spain

²Faculty of Medicine, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain

³Health Research Institute-Fundación Jiménez Díaz University Hospital (IIS-FJD), Madrid, Spain

⁴R&D Allergy & Immunology Unit, Laboratorios LETI S.L.U., Madrid, Spain

⁵Allergology Service, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Madrid, Spain

⁶Epidemiology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

⁷Department of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERES, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence

Jerónimo Carnés, PhD, Research & Development, Laboratorios LETI S.L.U., Calle del Sol n 5, 28760 Tres Cantos. Email: jcarnes@leti.com

Funding information

Supported by a research grant of the SEAI Foundation.

Abstract

Background: The capacity of profilin to induce allergic symptoms in patients with respiratory allergy has been questioned. In this sense, the aim of this study was to investigate the correlation between profilin exposure and induction of symptoms in a prospective case-control study.

Methods: The concentration of profilin as well as pollen levels in the air was measured. A diary score of symptoms was collected from allergic patients. Seventy-nine individuals were included in the study; fifty cases and 28 controls were positive or negative to profilin, respectively. Conjunctival and bronchial provocation tests were performed with purified profilin (Pho d 2) in a subgroup of cases and controls.

Results: Profilin was detected in the environment on 133 days (maximum peak of 0.56 ng/m³). A positive correlation between profilin and pollen count of *Oleae* and *Poaceae* was observed ($p = 0.24$; $P < .001$). Intensity of total, nasal and ocular symptoms was statistically higher in cases than in controls ($P < .001$). The risk of suffering symptoms, measured by the percentage of patients who presented any of the symptoms each day, was also higher in cases than in controls. The provocation test was positive in 95% of bronchial and 90% of conjunctival challenges in cases, and negative in all controls.

Conclusions: Profilin was detected in the environment and had the ability to induce a specific allergen response. Patients sensitized to this panallergen showed more symptoms and were more likely to have symptoms. Therefore, sensitization to profilin seems to be a marker of severity in patients with rhinoconjunctivitis and asthma mediated by pollen.

KEYWORDS

aeroallergen, allergen quantification, profilin, provocation test, respiratory symptoms

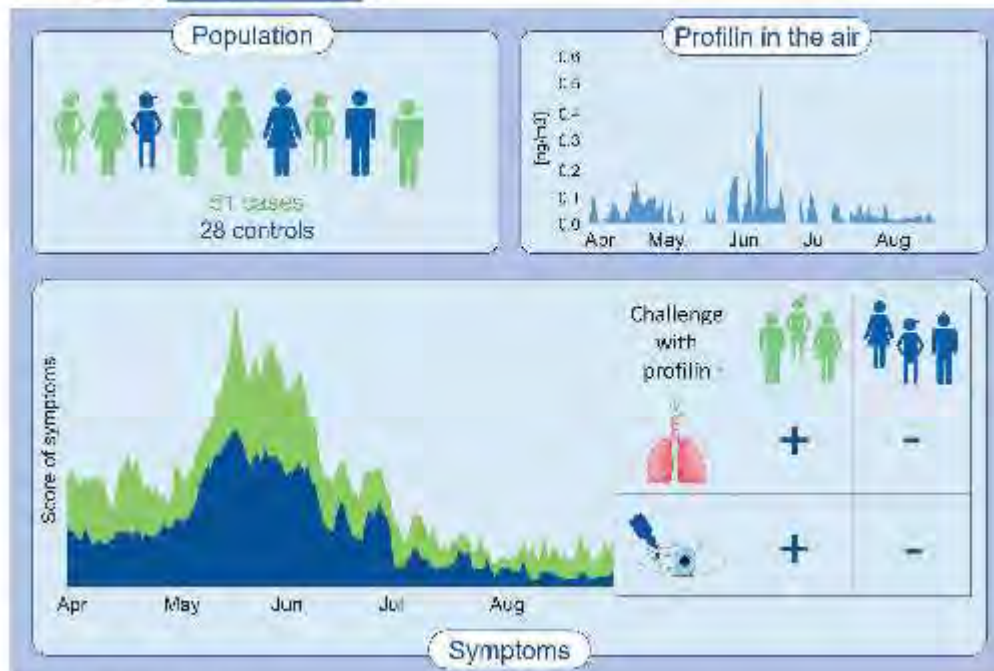
1 | INTRODUCTION

Profilin is a ubiquitous family of proteins of about 12–16 kDa present in eukaryotic cells and is involved in the control of actin polymerization.^{1,2} They have been reported as panallergens, and their similar tertiary structure, even among taxonomically separated plant species, is the cause of their high cross-reactivity.^{3,4}

The sensitization profile of patients is highly variable (20%–30% of patients with pollen allergy) and mainly depends on geographical distribution

and other concomitant and predominant allergens.^{5,6} In Central and Northern Europe, profilin sensitization has mainly been associated with respiratory allergy to birch,⁷ while in Southern Europe, it is associated with exposure to grasses, which sensitize up to 60% of patients.⁸ On the contrary, in some areas of Australia, where ragweed pollen is predominant, 50% of patients allergic to pollen are sensitized to profilin.⁹ Some authors attribute these percentages to co-recognition, or cross-reactivity.^{9,10}

On the contrary, some have recently been questioning the lack of relevance of profilin recognized so far,^{11,12} revealing that early sensitization



GRAPHICAL ABSTRACT

Profilin is detected in the environment and has the capacity to induce a specific allergen response as evidenced by bronchial and conjunctival challenges. Patients sensitized to profilin showed more and severe allergic symptoms and had more probability to develop allergic symptoms than the allergic control population negative to profilin. Sensitization to profilin seems to be a marker of severity in pollen allergic patients with rhinoconjunctivitis and asthma.

to profilin could be a marker of predisposition to more severe allergic disease.²³ The presence of profilin-specific IgE has been associated with an increased risk of sensitization to multiple pollens and the presence of food allergy,²⁴ and higher risk of allergic reactions to specific immunotherapy.²⁵

With the aim of investigating the capacity of profilin to induce allergic symptoms, the objective of this study was to establish a correlation between clinical symptoms and profilin exposure by challenging a pollen allergic population to a conjunctival and bronchial provocation test with purified profilin, in a prospective case-control study. Additionally, correlation between the concentration of profilin in the environment and severity of symptoms was also investigated.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient population

This study consists of a case-control study, with a sample population of patients older than 14 years who came to the Hospital Universitario Infanta Elena (Valdemoro, Madrid, Spain) for the first time, due to allergic respiratory pathology. Clinical cases included patients with

rhinitis, rhinoconjunctivitis and/or asthma and a positive skin prick test (SPT) to profilin, while the control group included patients with rhinitis, rhinoconjunctivitis and/or asthma but negative to profilin. Serum samples from cases and controls were collected for further studies.

All patients gave written consent to participate in the study (or parents/legal representative in the case of patients between 14 and 18 years of age). Individuals with severe atopic dermatitis, uncontrolled bronchial asthma or any other severe respiratory pathology that limits performing diagnostic tests and evaluation of the results thereof, or those who declined consent, were excluded from the study.

The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) (Number EO172011F/D).

2.2 | Symptom Diary Cards

Throughout the year, all the patients completed diary cards on which they recorded their conjunctival, nasal and bronchial symptom scores according to the following scale^{24,27}: 0, no symptoms; 1, mild symptoms

(slight nasal obstruction, slightly runny nose, or occasional sneezing or itching of the eyes); 2, moderate symptoms (moderate nasal obstruction, moderately runny nose, some sneezing and congestion, some ocular itching or mild asthma); and 3, severe symptoms (complete nasal obstruction, almost continuously runny nose, frequent sneezing or ocular symptoms or asthma attacks) (Figure S1).

2.3 | In vivo studies

2.3.1 | Skin prick tests

All individuals recruited were skin prick tested with a standard battery of biologically standardized aeroallergens including a mixture of grasses, *Lolium perenne*, *Secale cereale*, *Cynodon dactylon*, *Olea europaea*, *Cupressus arizonica*, *Platanus hybrida*, *Parietaria judaica* and *Salsola kali*, moulds (*Alternaria alternata*), mites (*Dermatophagoides pterocystinus* and *Dermatophagoides farinae*), animal epithelia (cat and dog), and with purified profilin from *Phoenix dactylifera* (Pho d 2, 50 µg/mL²⁹) (Laboratorios LETI SLU, Madrid, Spain).

2.3.2 | Conjunctival allergen challenge

Conjunctival challenges were performed according to the usual technique³⁰ with purified Pho d 2 in 5 concentrations increasing from 0.003 µg/ml to 3 µg/ml dissolved in saline solution (0.85% NaCl, phosphate buffer 7 mM), following the recently recommended evaluation criteria.³⁰ Conjunctival challenges were performed in 10 cases and 5 controls outside the symptom registration period so as not to interfere with the symptom diary card.

2.3.3 | Bronchial challenge

Specific bronchial challenge tests were performed with purified profilin²⁹ in serial dilutions (from 0.15 µg/ml to 30 µg/ml) in sterile PBS (phosphate-buffered saline) by the tidal flow method doubling concentrations of the antigen dissolved in sterile PBS from 0.15 µg/ml to 30 µg/ml, as previously reported.^{21,23} Late response with peak flow was controlled in the 24 hours after the test. Specific bronchial challenge tests were performed in 20 cases and 10 controls outside the symptom registration period for diary cards.

2.4 | In vitro studies

2.4.1 | sIgE and immunoblotting

Specific IgE (sIgE) to rPhl p 12 and rBet v 2 was measured by ImmunoCap (Thermo Fisher, Uppsala, Sweden). In addition, recognition of Pho d 2 by the patients' sera was analyzed by immunoblot as reported.²⁹

2.5 | Aerobiological studies

2.5.1 | Air sampling

A volumetric air sampler (Air Sentinel, Quan-Tec-Air Inc, Rochester, Minnesota, USA) adapted for outdoor use²⁴ was used for aeroallergen collection. The sampler was placed 8.26 m above street level in Valdemoro (coordinates: 40°11'53"N 3°41'50"W) and run continuously throughout 2012 with an air flow of 10 m³/h. Airborne particles were collected onto polytetrafluoroethylene membranes (Merck Millipore). Sampling time for each filter was 24 hours, which represents 240 m³ of air per sample, and filters were replaced at approximately the same time each day. After removal, filters were sealed in plastic bags and stored at 4°C until extraction.

2.5.2 | Filter extraction and allergen quantification

The upper layer of 220 filters was separated and individually placed in tubes containing 2 ml of 0.01 M PBS. Tubes were stirred until the filter was completely soaked and left for overnight extraction in a rotary mixer at 4°C. Afterwards, the liquid content was collected and the filter discarded.

Allergen content was measured by ELISA inhibition.¹⁴ In short, purified Pho d 2 was used as standard (from 1.95 ng to 1000 ng). Microplates were coated with profilin at 1 µg/well. Samples were incubated with polyclonal anti-Pho d 2 antibodies produced in rabbit, as previously reported¹⁴ (dilution 1:30 000). Allergen concentrations were estimated using a standard curve and were based on inhibition capacity; final results were expressed in ng/m³ of air.

2.5.3 | Pollen count

Aerobiological sampling was performed from 1st January to 31st December 2012 with a Burkard pollen collector placed in Valdemoro, one metre from the volumetric air sampler. Samples were examined under optic microscope with a 100× objective lens. Pollen concentrations were expressed as pollen grains/m³ of air.

2.6 | Statistical analysis

Fisher's exact test was used to study the relationship between study variables. The Mann-Whitney rank sum test was used to compare numerical numbers obtained for the different groups. Linear regression and logistic regression models were used to evaluate the relationship of variables to the intensity and presence of symptoms, respectively. Scatter plots were used, and the Spearman correlation coefficient was calculated to evaluate IgE concentration and symptom severity. The software GraphPad Prism 7 was used for analyses.

3 | RESULTS

3.1 | Patient population

Seventy-nine patients (mean age 30.1 ± 8.5 years) were included in the study: 51 positive to profilin (cases) and 28 negative to profilin (controls) based on SPT to Phod 2. The characteristics of the population are shown in Table 1.

All the population had rhinitis and conjunctivitis, whereas 38 cases (74.5%) and 22 controls (78.6%) also had asthma. Statistically significant differences were found in the years of evolution of asthma, with more years in the cases than in the controls (5.8 ± 4.9 years vs 2.9 ± 2.5 years; $P < .05$).

3.2 | In vivo studies (profilin diagnosis)

3.2.1 | SPT

Mean value for wheal sizes induced by profilin in the 51 cases was 38.4 ± 23.7 mm² (individual wheal sizes are shown in Figure S2).

All patients were sensitized to pollen; forty-four cases (86.3%) and 13 controls (46.4%) were sensitized to three or more pollens ($P < .001$) which indicates that patients sensitized to profilin were sensitized to more species than patients not sensitized to profilin. Most profilin-sensitized patients were sensitized to *Cynodon dactylon* (92.2%), with statistically significant differences in comparison with profilin-negative patients (53.6%) ($P < .001$). There was also a significant correlation between sensitization to profilin and to *Platanus acerifolia* (76.5% vs. 17.9%) ($P < .001$) and *Parietaria judaica* (21.6% vs. 3.6%) ($P < .05$) (Table 1).

3.2.2 | Conjunctival challenges

Conjunctival challenges were performed in 15 patients, who gave their consent for the test 10 cases and 5 controls, being positive in 9 of the 10 cases. The median concentration that induced the reaction was 0.3 µg/ml (Table 2 and Table S1); all 5 controls had a negative challenge test.

3.2.3 | Bronchial challenges

Among patients diagnosed with asthma, bronchial challenge with purified Phod 2 was performed on the first 20 cases and 10 controls who gave their consent for the test (Table 3). Nineteen cases (95%) had a positive bronchial challenge with profilin, with amounts ranging from 0.31 to 20 µg/ml, the mean PC20 (provocative concentration causing a 20% fall in Forced Expiratory Volume in the first second [FEV1]) being 10.55 ± 11.87 µg/ml. A statistically significant difference was observed ($P < .001$), both in the final FEV1 and in the percentage FEV1 decrease from baseline

when comparing cases and controls. FEV1 decreased a mean of 24.3% for cases and 5.9% for controls. A total of 60% of cases presented additional symptoms during the test, the most common being nasal symptoms (35%), cough (20%) and palatal pruritus (20%) (Table S2). There was no late response in peak flow records during the 24 hours after the test.

All controls had negative bronchial challenge with purified profilin.

3.3 | In vitro studies (sIgE and immunoblot)

sIgE to rPhl d 12 was positive in 38 cases (74.5%), with values of 4.8 ± 10 kU/l and rBet v 2 was positive in 42 cases (82.3%) with values of 6.2 ± 10.8 kU/l (Figure S2). Both profilins were negative in controls.

Forty-two of the 51 cases (82.4%) recognized nPhod 2 by immunoblot (Figure S2). Nine sera that did not recognize nPhod 2 were also sIgE negative to rPhl d 12 and rBet v 2. None of the controls recognized profilin in the immunoblots (data not shown).

3.4 | Aerobiological and clinical studies

3.4.1 | Profilin quantification on filters and correlation with the pollen count of different species

A total of 220 filters were analysed. The maximum value was obtained on 10th June with 133.4 ng of profilin in the filter (0.56 ng/m³ of air). The distribution of profilin during the year is shown in Figure 2. Profilin was detected in the environment in 133 days (36.5% of the year). For 58 days (15.9% of the year) profilin concentrations higher than 10 ng were observed in the filters (>0.04 ng/m³ of air). The month with the highest profilin content was June, but there were also other smaller peaks in April and the end of July (Figure 1).

The profilin peak appeared some days after the pollen peak of *Olea* and *Poaceae* (Figure 1A, 1B). Fifty different types of pollen were identified during the period of study. Plants with pollen counts during the whole year higher than 1000 pollen grains/m³ of air were as follows: *Cupressaceae* (2195 pollen grains/m³), *Olea* (2917), *Pinaceae* (1994), *Platanus* (1072), *Poaceae* (2504) and *Quercus* (12 747). Among them, profilin has been identified as an allergen in *Olea*, *Platanus* and *Poaceae*. The correlation coefficient was calculated for different pollens, with respect to profilin levels. *Olea* and *Poaceae* pollens showed a positive correlation ($\rho = 0.24$; $P < .001$). In the case of *Platanus* ($\rho = 0.41$; $P < .001$), the peak of pollination was two months before the peak of profilin (Figure 1C). Pollen levels of *Quercus* were significantly higher than other species and pollinated approximately one month before the highest peaks of profilin ($\rho = 0.36$; $P < .001$) (Figure 1E). Finally, in the case of *Plantago* ($\rho = 0.39$; $P < .001$), the level of pollen grains/m³ was low (Figure 1D).

TABLE 1 Description of the study population

	Total	Cases Profilin positive	Controls Profilin negative	<i>P</i> value
<i>n</i>	79	51 (64.6%)	28 (35.4%)	
Age (years \pm SD)	30.1 \pm 8.5	29.3 \pm 8.5	31.5 \pm 8.7	NS
Female <i>n</i> (%)	49 (62.0%)	33 (64.7%)	16 (57.1%)	NS
Respiratory symptoms				
Rhinitis	79 (100%)	51 (100%)	28 (100%)	NS
Years of evolution for rhinitis	8.8 \pm 5.1	9.2 \pm 4.9	6.9 \pm 5.4	NS
Conjunctivitis	79 (100%)	51 (100%)	28 (100%)	NS
Asthma	60 (75.9%)	38 (74.5%)	22 (78.6%)	NS
Years of evolution for asthma	4.7 \pm 4.4	5.8 \pm 4.9	2.9 \pm 2.5	<i>P</i> < .05
Sensitization to aeroallergens (SPT)				
Mites	24 (30.4%)	15 (29.4%)	9 (32.1%)	NS
Moulds	18 (22.8%)	12 (23.5%)	6 (21.4%)	NS
Epithelia	47 (59.5%)	31 (60.8%)	16 (57.1%)	NS
Pollen (All)	79 (100%)	51 (100%)	28 (100%)	NS
Grasses	73 (92.4%)	47 (92.3%)	26 (92.9%)	NS
Lolium perenne	74 (93.7%)	48 (94.1%)	26 (92.9%)	NS
Secale cereale	75 (94.9%)	49 (96.1%)	26 (92.9%)	NS
Cynodon dactylon	62 (78.5%)	47 (92.2%)	15 (53.6%)	<i>P</i> < .001
Olea europaea	67 (84.8%)	43 (84.3%)	24 (85.7%)	NS
Cupressus arizonica	44 (55.7%)	30 (58.8%)	14 (50.0%)	NS
Platanus ocerifolia	44 (55.7%)	39 (76.5%)	5 (17.9%)	<i>P</i> < .001
Parietaria judaica	17 (21.5%)	11 (21.6%)	1 (3.6%)	<i>P</i> < .05
Sabote kaf	26 (45.6%)	27 (52.9%)	9 (32.1%)	NS
Sensitization to 3 or more pollens	50 (73.4%)	44 (86.3%)	13 (46.4%)	<i>P</i> < .001

Abbreviations: NS, non-significant.

Percentages calculated from the "n" in each group.

TABLE 2 Conjunctival challenge to profilin

<i>θ</i>	Result	Final concentration
Case 13	Pos.	3
Case 15	Pos.	0.3
Case 20	Pos.	0.03
Case 27	Pos.	1.5
Case 31	Neg.	3 ^a
Case 33	Pos.	0.3
Case 34	Pos.	0.3
Case 38	Pos.	0.3
Case 39	Pos.	0.3
Case 46	Pos.	1.5
Control 6	Neg.	3 ^a
Control 7	Neg.	3 ^a
Control 8	Neg.	3 ^a
Control 13	Neg.	3 ^a
Control 25	Neg.	3 ^a

Abbreviations: Neg, Negative result; Pos, Positive result.

^aNo induction of positive response.

3.4.2 | Patient symptoms diary

Total (Figure 2A), bronchial (Figure 2B), nasal (Figure 2C) and conjunctival (Figure 2D) symptoms were compared between cases and controls.

It was observed that mean intensity of total symptoms, throughout the year, was on average 0.56 points higher in cases than in controls, 95% CI (0.43,0.70) *P* < .001 (Figure 2A); nasal symptoms were 0.26 points higher in cases than in controls, CI (0.18,0.34) *P* < .001 (Figure 2C); and conjunctival symptoms 0.27 points higher in cases than in controls, CI (0.23,0.31) *P* < .001 (Figure 2D).

For bronchial symptoms, statistically significant differences (*P* = .020) between cases and controls were limited to the presence of profilin (from March to August) in the environment (0.10 points; CI (0.02, 0.19)) (Figure 2B).

The risk of suffering asthma was higher in cases than in controls with OR 1.32 95% CI (1.19, 1.46) (*P* < .001). The same occurred with nasal and conjunctival symptoms, with an OR of 1.15 95% CI (1.08, 1.23) (*P* < .001) and OR of 1.62 95% CI (1.47, 1.79) (*P* < .001), respectively.

No correlation was detected between the intensity of these symptoms and sIgE levels to rPhl p 12 and rBet v 2.

TABLE 3 Bronchial challenge to profilin

Cases	FEV1 baseline (L)	FEV1 post-baseline (L)	FEV1 Final (L)	FEV1 decrease (%) from baseline	Last concentration of profilin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PC20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Result
Case 2	3.38	3.51	2.62	25.4	5.00	7.48	Pos
Case 3	1.87	1.78	1.27	28.7	5.00	6.33	Pos
Case 11	3.00	3.01	2.35	21.0	10.00	18.67	Pos
Case 13	3.14	3.02	2.17	28.1	5.00	7.32	Pos
Case 15	2.62	2.59	2.44	5.8	20.00	N/A	Neg
Case 16	2.64	2.31	1.67	27.7	2.50	3.24	Pos
Case 17	2.35	2.34	1.84	21.4	0.31	0.43	Pos
Case 21	2.86	2.9	2.09	28.0	10.00	12.86	Pos
Case 22	2.94	2.99	2.26	24.4	1.21	1.46	Pos
Case 24	3.14	3.19	2.55	20.1	20.00	39.36	Pos
Case 26	4.25	4.33	3.46	20.0	10.00	19.77	Pos
Case 27	3.02	3.07	2.16	29.7	20.00	26.96	Pos
Case 31	4.15	4.07	3.13	23.1	2.50	2.98	Pos
Case 32	3.35	3.36	2.44	27.4	2.50	3.45	Pos
Case 33	3.17	3.02	1.94	35.8	1.25	1.27	Pos
Case 34	2.88	2.27	1.75	28.5	2.50	3.96	Pos
Case 35	4.14	4.11	3.22	21.7	20.00	24.99	Pos
Case 38	2.61	2.55	2.00	21.6	1.25	2.13	Pos
Case 48	3.25	3.21	2.44	24.0	1.25	1.19	Pos
Case 51	3.96	3.92	2.94	25.2	5.00	6.65	Pos
Mean (SD)	3.11 (0.64)	3.08 (0.68)	2.34 (0.55)	24.3 (5.9)	Median: 5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10.55 (11.87)	

Controls	FEV1 baseline (L)	FEV1 post-baseline (L)	FEV1 Final (L)	FEV1 decrease (%) from baseline	Last Concentration of profilin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Total accumulated dose	Result
Control 03	3.13	3.04	2.87	5.8	20	39.83	Neg
Control 04	3.66	3.70	3.43	7.3	20	39.83	Neg
Control 08	3.88	3.71	3.71	0.0	20	39.83	Neg
Control 11	2.69	2.79	2.80	0.3	20	39.83	Neg
Control 12	3.46	3.39	3.27	5.4	20	39.83	Neg
Control 13	4.07	4.11	3.83	7.8	20	39.83	Neg
Control 15	2.59	2.51	2.50	0.4	20	39.83	Neg
Control 23	3.78	3.80	3.32	12.2	20	39.83	Neg
Control 25	2.78	2.52	2.34	7.2	20	39.83	Neg
Control 28	4.25	4.31	3.92	4.4	20	39.83	Neg
Mean (SD)	3.43 (0.6)	3.37 (0.61)	3.20 (0.55)	5.1 (3.9)			

Abbreviations: FEV1, Volume exhaled at the end of the first second of forced expiration; Neg, Negative result; N/A, Not Applicable; PC20, provocative concentration causing a 20% fall in FEV1; Pos, Positive result.

4 | DISCUSSION

Identification of allergens in the environment has become important for the control of allergic diseases and for establishing a relationship with clinical symptoms.^{14,24,25} In the present study, we quantified the profilin levels in the environment and investigated their correlation with the clinical symptoms of pollen allergic patients. In addition, the capacity of profilin to induce allergic symptoms was demonstrated. To our

knowledge, this is the first time that the capacity of profilin to induce clinical allergic symptoms has been demonstrated in patients in real life.

We set up a method for quantifying profilin in the air over the course of a year, which resulted useful for establishing a correlation with the clinical symptoms of our population. Although the methodology for extraction and quantification of profilin in the filters rendered good results, more sophisticated methods that obtain a more accurate concentration would provide more exact data.

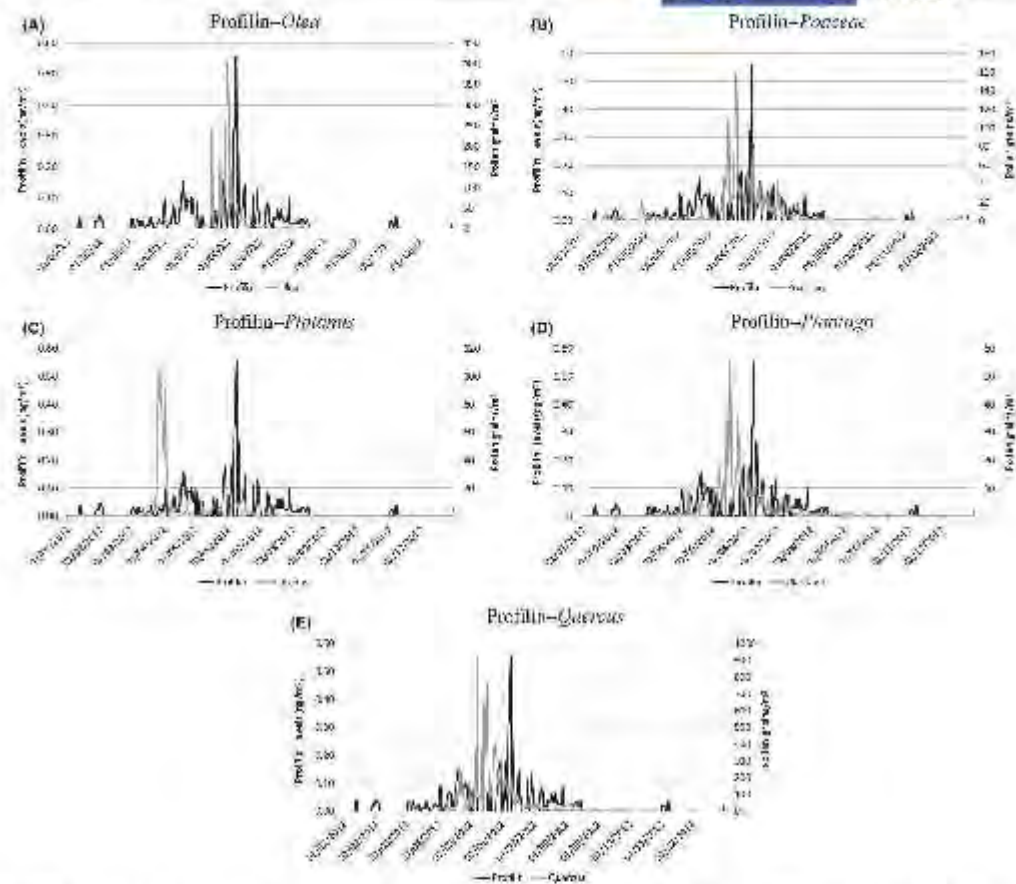


FIGURE 3 Pollen counts and profilin levels during the study period. (A) Olea; (B) Poaceae; (C) Platanus; (D) Plantago and (E) Quercus. The profilin peak appeared after the maximum pollen peak of Olea and Poaceae

Regarding the concentration of profilin in the environment, June showed the highest concentration followed by May and April, corresponding to the highest peaks of pollen grains in the air (especially from grasses and olive trees), although a lag of a few days was observed. We hypothesize that profilin requires certain meteorological conditions to be detected and released from pollen grains. Another finding we observed was that the presence of profilin was not limited to the spring season, with different concentrations detected out of this period. This fact may be related to the different concentration of profilin in different pollen species. In this sense, *Lolium perenne* is one of the pollens with a higher percentage of relative profilin content,⁶ while the lower percentage in olive trees or *Plantago* suggests a lower contribution.⁸ *Quercus* may contribute significantly in correlation with the high levels of pollen grains, although the contribution of this tree to

allergic symptoms is almost irrelevant at Madrid's latitude. This is especially important because the implication of profilin for clinical symptoms might vary despite the high cross-reactivity.²⁶ In general, the clinical implications of small amounts of profilin remain unknown, although different studies have suggested that profilin may enhance allergic inflammation.²⁷

A positive correlation between pollination and clinical allergic symptoms is well established. However, although the presence of allergens in the atmosphere (such as profilin) and their implication in clinical symptoms can be extrapolated, it is necessary to establish its allergenic relevance and capacity to induce allergic symptoms. In this way, our study confirms the capacity of profilin to produce an allergen-specific response by using bronchial and conjunctival provocation tests. These results confirm that profilin should be considered as a respiratory allergen. These observations are in agreement with previous

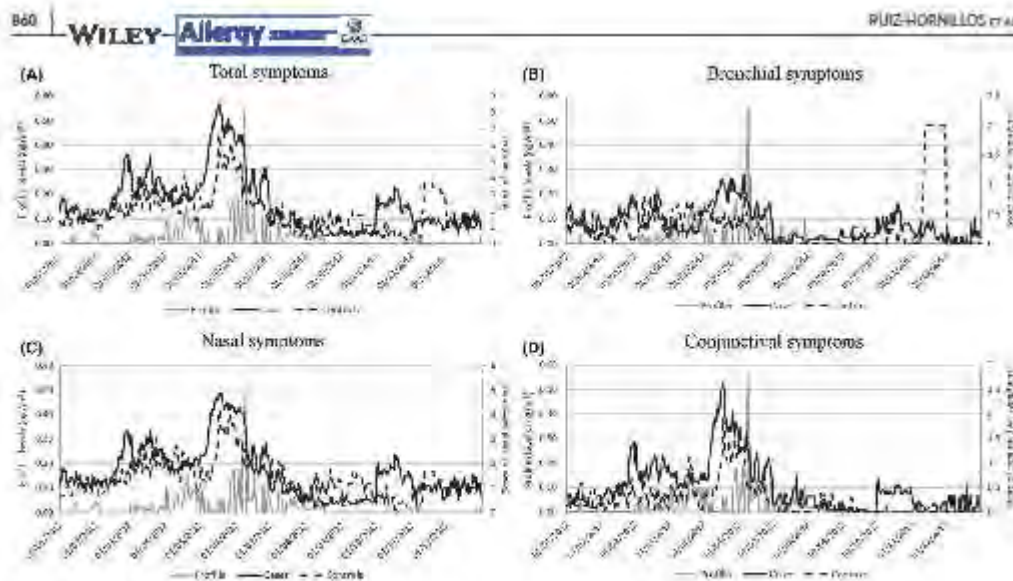


FIGURE 2 Correlation between profilin counts and clinical symptoms throughout the year. A total of 79 patients ($n = 51$ cases and $n = 28$ controls) recorded their symptoms on diary cards. (A) Total symptoms ($P < .001$); (B) Bronchial symptoms (NS along the year); significance limited to the presence of profilin in the environment ($P = .02$); (C) Nasal symptoms ($P < .001$); and (D) Conjunctival symptoms ($P < .001$)

studies,²⁸ which demonstrated this ability by positive conjunctival challenge with rPho d 2 in 65% (11/17) of patients sensitized to profilin. Ruiz-García *et al*⁶ observed that profilin was also capable of producing respiratory symptoms by bronchial challenges with rPho d 2, positive in 77% of sensitized patients. Recently published studies have also confirmed the role of profilin from *Phleum pratense* by inducing a T-cell response.²⁹

Using our technique, the highest profilin concentration was 0.56 ng/m^3 of air (10^{27} of June), which is much smaller than the dose needed to produce symptoms ($0.3 \mu\text{g}$ of profilin). Based on this, it is necessary to correlate the concentration of profilin in the environment with the symptoms that our patients experienced in real life, as previously described for other allergens.^{24,30} Differences in respiratory symptoms were observed between the two groups in the presence of profilin ($P = .02$), confirming the implication of profilin in the symptoms.

Regarding our patient population, the selection was performed by skin testing with purified profilin. Diagnosis was confirmed by sIgE with rBet v 2, rPho d 12 or immunoblot in 42 patients (82.3%), although some discrepancies were observed between *in vivo* and *in vitro* diagnostics, probably explained by limitations of the *in vitro* techniques. A positive bronchial challenge was obtained in patients with negative *in vitro* diagnosis. This result suggests that skin prick test with purified allergens is a useful tool for the selection of allergic patients.

Until now, there have been only a few published cases of genuine profilin-sensitized patients.^{31,37} In our real-life study, we found that our patients sensitized to profilin had a significantly higher intensity of symptoms than those not sensitized to profilin, although both groups were polysensitized. We also observed a significantly higher risk of

developing ocular, nasal and bronchial symptoms in profilin-sensitized individuals. Both risks and intensity corroborate the idea that profilin can be a marker of severity. On the other hand, profilin may also be a marker of evolution of asthma. In our population, we observed that profilin-sensitized individuals showed twice the time of evolution of asthma symptoms (5.8 ± 4.9 vs. 2.9 ± 2.5 years) ($P < .05$). These results are in agreement with previous observations, which have suggested the importance of profilin as a marker of evolution,²³ early marker of severity,²⁷ or a marker of symptom severity.^{33,34} Prospective studies may clarify the role of profilin as a marker of allergic disease.

Exclusive monosensitization to profilin is not frequent. However, treatment of these patients or the majority allergic to profilins remains unsolved. Further studies will be necessary to determine whether an aetiological approach to this panallergen is possible, as has been proposed with other panallergens such as LTP.^{37,38}

In summary, our study demonstrates that environmental profilin is able to induce a specific allergic response at the respiratory level evidenced by bronchial and conjunctival challenges. In addition, patients sensitized to this panallergen showed more symptoms and were more likely to have symptoms. Therefore, sensitization to profilin can be considered a marker of severity in patients with rhinoconjunctivitis and asthma due to pollen allergy. More studies are necessary to identify the best approach for treating these patients.

CONFLICT OF INTEREST

JRH received a grant from SEAC Foundation during the conduct of the study; MAL and JC are employees of Laboratorios LETI SLU.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JRH, AH, SB and MS recruited the patients and performed *in vivo* studies with the patients. MAL quantified the profilin and performed the *in vitro* assays. IM and MAL analysed data. JRH, MAL, PBJ and JC designed the study. JRH, MAL and JC wrote the manuscript.

ORCID

Jerónimo Carnés: <https://orcid.org/0000-0003-4050-2577>

REFERENCES

- Valenta R, Duchene M, Ebner C, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergen. *J Exp Med* 1992;175:337-385.
- Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Pope D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci*. 2015;128:2009-2019.
- Wopfner M, Gruber P, Walther M, et al. Molecular and immunological characterization of novel weed pollen pan-allergens. *Allergy*. 2008;63:872-881.
- Santos A, Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155:191-204.
- López-Torrejón G, Díaz-Perales A, Rodríguez J, et al. An experimental and modeling-based approach to locate IgE-epitopes of plant profilin allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1481-1488.
- Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcín (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: Isolation, aminoacid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1192-1198.
- Asero R, Monsiave R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1033-1037.
- Ruiz-García M, García del Poño M, Fernández-Nieto M, Barber D, Jimeno-Nogales L, Sastre J. Profilin, a relevant aeroallergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128:416-418.
- Asero R, Wopfner M, Gruber P, Gadermaier G, Ferreira F. Artemisia and Ambrosia hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? *Clin Exp Allergy*. 2006;36:659-665.
- Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WAstrid, et al. IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:435-442.
- Barber HD. Could Profilin Be a 'Canary in a Coal Mine' of the Increasing Allergy Epidemic? *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;168:1-2.
- Rodríguez Del Río F, Díaz-Perales A, Sánchez-García S, et al. Profilin, a change in the paradigm. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28:1-12.
- Asero R, Tripodi S, Dondi A, et al. Prevalence and clinical relevance of IgE sensitization to profilin in childhood. A multicenter study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015;166:25-31.
- Hauzer M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6:1.
- Sastre J, Rodríguez F, Campo P, Laffond E, Marin A, Alonso MD. Adverse reactions to immunotherapy are associated with different patterns of sensitization to grass allergens. *Allergy*. 2015;70:598-600.
- Feo Brito F, Gimeno PM, Carnés J, et al. Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106:146-152.
- D'Amato G, Gentili M, Russo M, et al. Detection of *Parietaria judaica* airborne allergenic activity: comparison between immunochemical and morphological methods including clinical evaluation. *Clin Exp Allergy*. 1994;24:568-574.
- Moya R, Rubio V, Beña JM, Carnés J, López-Matas MA. Purification and immunochemical characterization of Pla 1.2, the profilin from *Plantago lanceolata*. *Mol Immunol*. 2017;83:100-106.
- Möller C, Björkstén B, Nilsson G, Draborg S. The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy*. 1984;39:37-41.
- Fauquet J-L, Jedrejczak-Czechowicz M, Rondon C, et al. Conjunctival allergen provocation test: guidelines for daily practice. *Allergy*. 2017;72:43-54.
- Diamant Z, Gauvreau GM, Cockcroft DW, et al. Inhaled allergen bronchoprovocation tests. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1045-1055.
- Meillo G, Bonini S, Cocco G, et al. EAACI provocation tests with allergens. Report prepared by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Subcommittee on provocation tests with allergens. *Allergy*. 1997;52:1-35.
- Swanson MC, Agarwal MK, Reed CE. An immunochemical approach to indoor aeroallergen quantitation with a new volumetric air sampler: studies with mite, roach, cat, mouse, and guinea pig antigens. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76:724-729.
- Feo Brito F, Mur Gimeno P, Carnés J, et al. Grass pollen aeroallergens, and clinical symptoms in Ciudad Real Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20:295-302.
- Feo Brito F, Alonso AM, Carnés J, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22:154-159.
- Wölting F, Kunz J, Kempf WE, Grimmel C, Fischer J, Biedermann T. The clinical relevance of birch pollen profilin cross-reactivity in sensitized patients. *Allergy*. 2017;72:582-589.
- Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, et al. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*. 2018;73:2137-2149.
- Núñez R, Carballeda F, Lombanero M, Jimeno L, Boquete M. Profilin as an aeroallergen by means of conjunctival allergen challenge with purified date palm profilin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158:115-119.
- Lund G, Brand S, Ramos T, et al. Strong and frequent T-cell responses to the minor allergen Phi p 12 in Spanish patients IgE-sensitized to Profilins. *Allergy*. 2018;73:1013-1021.
- Fernández-González D, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, et al. *Platanus* pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1701-1708.
- Metz Favre C, Pauli G, Castro L, Valenta R, De Blay F. Bety 2 Responsibility in Birch Induced Symptoms. *J Allergy Ther*. 2014;5:169-170.
- Asero R, Villalba D. Profilin may be a primary airborne sensitizer: a case report. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23:134-135.
- Barber D, de la Torre F, Feo F, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008;63:1550-1558.
- Alvarado M, Jimeno L, De La Torre F, et al. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. *Allergy*. 2014;69:1610-1616.
- Rodríguez MJ, Mascareque A, Ramos-Soriano J, et al. Pru p 3-Epitope-based sublingual immunotherapy in a murine model for the treatment of peach allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(10):1700110.
- Gómez F, Bogas G, González M, et al. The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy* 2017;47:339-350.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Ruiz-Hornillos J, López-Matas MA, Bergas Jimeno P, et al. Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases. *Allergy*. 2020;75:853-861. <https://doi.org/10.1111/all.14140>