



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Medicina

“Relevancia del polen de melocotón en los pacientes sensibilizados en poblaciones expuestas”

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor presentada por:

Laura Victorio Puche

Director:

Dr. D. Miguel Blanca Gómez

Murcia 2021

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Miguel Blanca Gómez, por elegirme para participar en este proyecto y haberme dado la oportunidad de realizar este interesante estudio. Siempre entregado a la investigación, con gran esfuerzo y dedicación, demostrando así su gran pasión por la Alergología.

A mi tutor, el Dr. Luis García-Marcos Álvarez, por aceptar formar parte de este trabajo, por guiarme y asesorarme en la elaboración del mismo.

Al Dr. J. Damián López Sánchez, jefe de Servicio de Alergología del Hospital Virgen de la Arrixaca, por su gran contribución a mi formación como alergóloga y por confiar en mí para colaborar en este proyecto. Siempre me tendrás como amiga.

A Natalia Pérez Sánchez, especialista en Alergología del Servicio de Alergia del Hospital Regional de Málaga, por su inestimable colaboración en el trabajo de campo; y a José Antonio Cornejo, investigador de la Fundación IMABIS, por facilitar el desarrollo de este trabajo.

A los compañeros que han apoyado en la recogida de los participantes, estudios complementarios y análisis estadísticos, en especial a M^a Luisa Somoza y a M^a Ángeles López.

A los vecinos de Blanca, mi pueblo, por haber participado de forma voluntaria y altruista, ya que sin ellos no hubiera sido posible su realización.

Al alcalde, directores y profesores de los colegios y del Instituto de Educación Secundaria del municipio de Blanca, por haber facilitado la consecución del proyecto.

Al personal del MUCAB, por haber participado en la organización, citas y recepción de los casos para el estudio.

Al director del Centro de Salud, el Dr. Antonio Marín, por su apoyo, así como al personal del centro de salud que facilitó las citas de los casos para la realización de este trabajo.

A mis amigas de la infancia y de profesión, por animarme a no desistir.

A mi familia, por estar siempre a mi lado, en lo bueno y en lo malo, y por ayudarme a crecer tanto a nivel académico, como profesional y personal.

A Mi Javiwan, por cuidarme, alegrarme y ser el mejor compañero de vida que nunca imaginé encontrar.

A mi hija Julia, por hacerme ver que la vida es maravillosa y darme el último empujón que necesitaba.

Muchas gracias a todos.



Dña. LAURA VICTORIO PUCHE

Vista la solicitud presentada el día 17 de noviembre de 2020, por Dña. Laura Victorio Puche, con DNI 77718801F, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD,
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de CIENCIAS DE LA SALUD,

resolvió, en su sesión de 18 de noviembre de 2020, **ACCEDER** a lo solicitado por la interesada pudiendo, por tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones, con los siguientes artículos, siempre que aporte, con antelación a la presentación de la tesis doctoral, los documentos originales de cada uno de los coautores de los artículos, de conformidad con lo establecido en el artículo 20.3 e), f) y g) del Reglamento de Doctorado:

1. "Peach tree pollen and Pru p 9 may induce rhinoconjunctivitis and asthma in children".
2. "Peach Tree Pollen and Prunus persica 9 Sensitisation and Allergy in Children and Adolescents".
3. "Prunus persica 9, a new occupational allergen from peach tree pollen involved in rhinitis and asthma".

La presente resolución no pone fin a la vía administrativa. Frente a ella, de conformidad con lo previsto en el capítulo II del título V de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas y en el artículo 21 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, aprobados por Decreto 85/2004, de 27 de agosto, los interesados pueden interponer recurso de alzada ante el Rector de la Universidad de Murcia, en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente al de la notificación o publicación, sin perjuicio de que puedan intentar cualquier otro recurso que a su derecho convenga.

Lo que en cumplimiento del artículo 40.1 de la vigente Ley 39/2015, de 1 de octubre del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, se notifica a Dña. LAURA VICTORIO PUCHE.

La Vicerrectora de Estudios, y
Presidenta de la Comisión General de Doctorado
Sonia Madrid Cánovas

Documento firmado electrónicamente



Esta tesis se ha elaborado con los resultados obtenidos en el Proyecto de Investigación PI15/01317, titulado, "Sensibilización y alergia a alérgenos prevalentes de origen vegetal en una población del área mediterránea. Participación de factores ambientales y genéticos", financiado por el Instituto de Salud Carlos III y del que era Investigador Principal el Dr. José Antonio Cornejo García, del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

Índice

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1 - ENTORNO GEOGRÁFICO | 13 |
| 1.1.1 – Región de Murcia | 13 |
| 1.1.2 – Vega Alta del Segura y Valle de Ricote | 13 |
| 1.1.3 – Blanca | 14 |
| 1.2 – ENFERMEDADES ALÉRGICAS RESPIRATORIAS | 15 |
| 1.2.1 - Rinitis y asma alérgicas | 15 |
| 1.2.1.1 - Clasificación de la rinitis alérgica | 15 |
| 1.2.1.2 - Clasificación del asma | 16 |
| 1.2.1.3 – Rinitis y asma ocupacionales | 18 |
| 1.3 – PRUEBAS COMPLEMENTARIAS EN LA RINITIS ALÉRGICA ... | 19 |
| 1.3.1 - Pruebas cutáneas | 19 |
| 1.3.2 - Determinación de Inmunoglobulina E (IgE) específica | 19 |
| 1.3.3 – Inmunotransferencia | 19 |
| 1.3.4 - Prueba de provocación nasal Alérgeno-Específica | 20 |
| 1.3.5 - Rinometría acústica | 21 |
| 1.3.5.1- Definición | 21 |
| 1.3.5.2 – Anatomía y fisiología de la nariz | 22 |
| 1.3.5.3 – Equipo, principio físico y registro | 23 |
| 1.4 - POLINIZACIÓN EN MURCIA | 25 |
| 1.4.1 – Generalidades | 25 |
| 1.4.2 - Cultivos de melocotón | 25 |
| 1.4.3 - Polen de melocotonero | 26 |
| 2. PRESENTACIÓN Y APORTACIONES DEL DOCTORANDO EN LAS PUBLICACIONES | 29 |
| 2. 1 – ARTÍCULO 1 | 29 |
| 2.1.1 - Información y criterios de calidad | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2 - Aportaciones del doctorando | 29 |
| 2. 2 – ARTÍCULO 2 | 29 |
| 2.2.1 - Información y criterios de calidad | 29 |
| 2.2.2 - Aportaciones del doctorando | 30 |
| 2. 3 – ARTÍCULO 3 | 30 |
| 2.3.1 - Información y criterios de calidad | 30 |
| 2.3.2 - Aportaciones del doctorando | 30 |
| | |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| | |
| 4. METODOLOGÍA GLOBAL | 32 |
| 4.1 – POBLACIÓN Y TIPO DE ESTUDIO | 32 |
| 4.2 – CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 32 |
| 4.3 – CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 32 |
| 4.4 – VARIABLES DEL ESTUDIO | 32 |
| 4.5 – MÉTODO | 33 |
| 4.6 - ESTUDIOS ESTADÍSTICOS | 34 |
| 4.7 – ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES | 35 |
| | |
| 5. RESUMENES DE LOS ARTÍCULOS | 36 |
| 5.1 – ARTÍCULO 1 | 36 |
| 5.2 – ARTÍCULO 2 | 37 |
| 5.3 – ARTÍCULO 3 | 38 |
| | |
| 6. DISCUSIÓN | 39 |
| | |
| 7. CONCLUSIONES FINALES | 42 |
| | |
| 8. COPIA DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS | 43 |
| | |
| 9. ANEXOS | 47 |
| 9.1 - Comunicaciones a congresos derivados de la presente tesis doctoral | 47 |
| | |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 48 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENTORNO GEOGRÁFICO

1.1.1 - Región de Murcia

La provincia murciana se extiende por el extremo oriental de los Sistemas Béticos, dando lugar a diferentes alineaciones montañosas, altiplanos, depresiones interiores y llanuras litorales. Las formaciones montañosas se distribuyen por toda la Comunidad y se dividen en tres grandes unidades:

- La prebética, en contacto con la Meseta, separa la Región de Murcia de la provincia de Albacete.
- La Cordillera Subbética ocupa el sector noroeste y central.
- La Cordillera Penibética constituye el sector meridional, desde la provincia de Almería hasta el cabo de Palos, y discurre paralela al mar Mediterráneo.

Entre las zonas de montaña aparecen sectores de relieve llano y de menor altura. Los altiplanos se localizan en el noreste y noroeste, y los constituyen zonas llanas con pendientes poco acusadas. Las principales depresiones interiores, valles y llanuras se corresponden con los cursos fluviales y no superan los 500 metros de altitud. Entre ellas, destacan la depresión prelitoral, recorrida por los ríos Guadalentín y Segura, y las cuencas de Abanilla-Fortuna, Mula y Cieza. Entre la Sierra de Carrascoy y la costa, se encuentran las llanuras litorales del Campo de Cartagena, Mazarrón y Águilas.

La Región de Murcia es una de las más ricas de España en lo referente a zonas agrícolas. En consecuencia, los productos agroalimentarios suponen casi la mitad de las exportaciones murcianas. En la entrada del Río Segura a la provincia, se localiza un pequeño, pero fructífero, sector de arrozal. En la Depresión del Guadalentín, se dedican a cultivos de frutales, principalmente cítricos, frutas rosáceas y uva de mesa. Por último, amplias zonas de regadío dedicadas a hortalizas, en su mayor medida, se ubican en el litoral.

1.1.2 - Vega alta del Segura y Valle de Ricote

La Vega del Segura adopta su nombre de la llanura aluvial que corresponde al cauce del río Segura. Este término, por extensión, se ha empleado para dar nombre a diferentes comarcas en la Región de Murcia y en la provincia de Alicante, conocidas como Vega Alta, Vega Media y Vega Baja (1,2). Sus tierras, situadas en las proximidades de las riberas del río, son muy fértiles y por ello, están consideradas como una gran explotación agrícola desde la antigüedad. La Vega Alta consta de 4 municipios: Calasparra, Cieza, Abarán y Blanca. Representa de forma significativa la asociación entre la agricultura, la industria y los servicios, características fundamentales de la actividad económica de las huertas levantinas. Su actividad principal es la agricultura de regadío, sobre todo frutales, siendo el cultivo de melocotón y de cítricos los más relevantes.

El valle de Ricote (3), también conocido como el valle Morisco, es una comarca histórica de la Región de Murcia, situada en el norte de la provincia y en la

cuenca media del Río Segura. Consta de varios municipios, entre los que se integran algunos de la Vega Alta: Abarán, Archena, Blanca, Cieza, Ojós, Ricote, Ulea y Villanueva del Segura. Es una comarca rica en frutales, donde se recolectan los albaricoques y melocotones más tempranos del mundo.

1.1.3 - Blanca

Es un municipio localizado en el norte de la Región de Murcia, en la Vega Alta del Segura, aunque históricamente también ha estado vinculado al Valle de Ricote. Se encuentra situado en la margen izquierda del río Segura y cuenta con 6.539 habitantes (INE 2019) (4): Limita al norte con el término municipal de Abarán, al sur con los de Ulea y Ojós, al este con los de Molina de Segura y Fortuna, y al oeste con el de Ricote (Figura 1). El término municipal, que tiene una superficie de 87,32 km² (5), cuenta con una densidad de población de 74,68 hab./km².

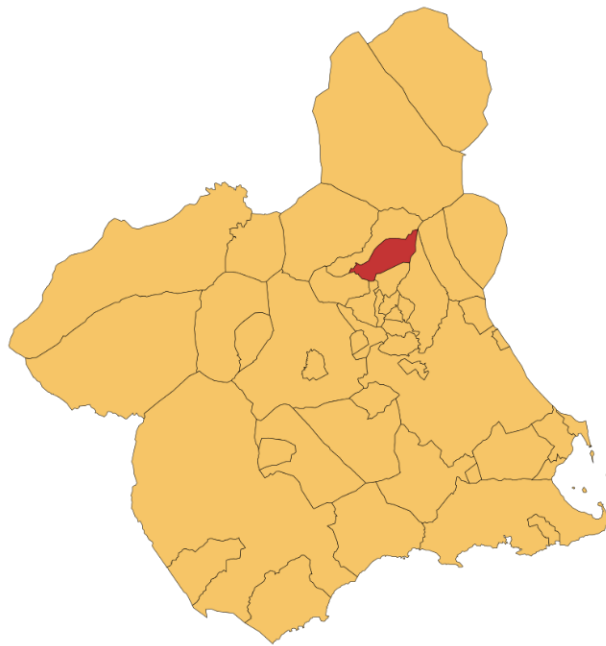


Figura 1. Mapa de los diferentes municipios de la Región de Murcia, señalado en rojo el municipio de Blanca.

En su paisaje, destacan los contrastes entre el verde de su huerta, la ribera del río, los amplios cultivos de frutales y cítricos, las zonas desérticas y los montes que la rodean.

1.2. ENFERMEDADES ALÉRGICAS RESPIRATORIAS

1.2.1 - Rinitis y asma alérgicas

La rinitis alérgica es una inflamación de la mucosa nasal, debida a la exposición de diversos alérgenos. Aunque en este proceso participan diferentes células (6), el mecanismo fundamental consiste en la activación de los mastocitos, como consecuencia de la interacción del alérgeno con las moléculas de Inmunoglobulina E (IgE), previamente fijadas por receptores específicos a su membrana.

La rinitis ha sido considerada, desde su descripción, como una enfermedad leve, siendo infravalorada su morbilidad. Puede afectar de manera significativa las actividades diarias, el rendimiento escolar y la productividad laboral, provocando una disminución evidente en la calidad de vida y unos costes importantes para el sistema sanitario y el paciente. Su prevalencia va en aumento, afectando a entre el 10 y el 25 % de la población (7-10), llegando en algunos países a afectar hasta al 40% de los niños. En la infancia, existe un predominio en el sexo masculino, aunque en la edad adulta no se aprecian diferencias.

Los síntomas más característicos de la rinitis alérgica consisten en estornudos, generalmente en salvas, rinorrea acuosa, obstrucción y prurito nasal, que pueden presentarse en distinto grado, juntos o aislados. Más de la mitad de los pacientes con rinitis por sensibilización a los pólenes asocian conjuntivitis alérgica, que se manifiesta habitualmente con prurito ocular, lagrimeo e inyección conjuntival. También pueden presentar prurito faríngeo, palatino y ótico, que en la mayoría de casos produce carraspeo y accesos de tos irritativa. En las rinitis estacionales pueden estar presentes todos estos síntomas, aunque los estornudos y el prurito suelen ser los más frecuentes. Por el contrario, la obstrucción es más característica de las rinitis perennes.

1.2.1.1 - Clasificación de la rinitis alérgica

En el 2001, en la reunión de un grupo de expertos, (*Allergy Rhinitis and its Impact in Asthma (ARIA) Workshop Expert Panel*), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se redactó el documento ARIA (11). En éste, se propone una nueva clasificación de la rinitis alérgica, según la duración y la frecuencia de los síntomas, diferenciando entre rinitis intermitente y persistente (dependiendo del número de días por semana y el número de semanas consecutivas durante las cuales el paciente tiene síntomas), y entre rinitis leve y moderada-grave (en función de la intensidad de las manifestaciones clínicas y de la repercusión sobre la calidad de vida) (Figura 2).



Figura 2. Clasificación de la rinitis alérgica. Guía ARIA.

El asma bronquial es una enfermedad caracterizada por la inflamación crónica de la vía aérea, con episodios recurrentes de obstrucción difusa y no uniforme, que ocurren como consecuencia del broncoespasmo, hipersecreción de moco y edema de la mucosa. Afecta en todo el mundo a aproximadamente el 5% de la población, representando a más de 350 millones de personas (12) y, sólo en España, presenta una prevalencia de 3 millones de individuos (13). De éstos, el 10% son niños de entre 6 y 7 años y el 9% son adolescentes de entre 13 y 14 años (14), siendo la patología infantil que más hospitalizaciones y más ausencias escolares provoca. La distribución por sexo varía con la edad, siendo más frecuente en hombres que en mujeres en la infancia, mientras que en la adolescencia se invierte esta relación (15-17).

Los síntomas más frecuentes son la disnea, la tos, los sibilantes y la opresión torácica. La obstrucción suele ser reversible, parcial o completa, de forma espontánea o tras tratamiento. Dicha inflamación bronquial puede producir una respuesta exagerada frente a diversos estímulos, lo que conocemos como hiperreactividad bronquial inespecífica.

1.2.1.2 - Clasificación del asma

La gravedad del asma es una propiedad intrínseca de la enfermedad, que depende de la intensidad de las alteraciones fisiopatológicas. Se evalúa cuando el paciente está siendo tratado y se clasifica según las exacerbaciones y las necesidades del tratamiento de mantenimiento que se precisan para conseguir el control de los síntomas (18). Según la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) (19), la gravedad del asma se clasifica en cuatro niveles: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (Figura 3).

| | Intermitente | Persistente leve | Persistente moderada | Persistente grave |
|--|-------------------------------------|---|----------------------------|--|
| Síntomas diurnos | No (2 veces o menos a la semana) | Más de 2 veces a la semana | Síntomas a diario | Síntomas continuos (varias veces al día) |
| Medicación de alivio (agonista β_2 -adrenérgico de acción corta) | No (2 veces o menos /semana) | Más de 2 veces a la semana pero no a diario | Todos los días | Varias veces al día |
| Síntomas nocturnos | No más de 2 veces al mes | Más de 2 veces al mes | Más de una vez a la semana | Frecuentes |
| Limitación de la actividad | Ninguna | Algo | Bastante | Mucha |
| Función pulmonar (FEV ₁ o PEF) % teórico | > 80 % | > 80 % | > 60 % - < 80 % | ≤ 60 % |
| Exacerbaciones | Ninguna | Una o ninguna al año | Dos o más al año | Dos o más al año |

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

Figura 3. Clasificación de la gravedad del asma en adultos.

Además, en función del grado de control, el asma se puede dividir en 3 categorías (Figura 4). Algunos de estos pacientes pueden tener un buen control de los síntomas intercrisis y de la función pulmonar y, al mismo tiempo, tener exacerbaciones frecuentes; por el contrario, otros pacientes presentan síntomas diarios con muy pocas exacerbaciones (20). La evolución del asma puede variar a lo largo del tiempo, por lo que es necesario hacer una reevaluación periódica.

| | 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 4. Clasificación del control del asma en adultos.

El asma de tipo alérgica es la más prevalente. Suele comenzar en la infancia o adolescencia, resolviéndose aproximadamente la mitad en la pubertad y vida adulta. El resto, persiste en la adultez o reaparece al cabo de unos años. Entre un 30 y un 50% de los asmáticos presentan rinitis alérgica.

1.2.1.3 – Rinitis y asma ocupacionales

La rinitis y el asma ocupacionales son una patología profesional con una importancia en ascenso, aunque ha sido menos tenida en cuenta que otros tipos de enfermedades respiratorias (21). La respuesta desencadenada puede ser por un mecanismo inmunológico, farmacológico o desconocido. La rinitis ocupacional se puede definir como una enfermedad inflamatoria nasal con síntomas intermitentes o persistentes (tales como obstrucción nasal, estornudos, rinorrea y picor), y/o una limitación variable al flujo aéreo nasal y/o hipersecreción, debida a causas y condiciones atribuibles a un determinado ambiente laboral. Un diagnóstico precoz de este tipo de rinitis puede prevenir la aparición del asma. Los métodos de valoración de la permeabilidad nasal, la hiperrespuesta inespecífica y la inflamación nasal no están suficientemente estandarizados y se utilizan poco en la práctica clínica (22, 23). La definición de asma ocupacional más extendida es la que se refiere a las alteraciones fisiopatológicas que se observan en las vías respiratorias inferiores, es decir, obstrucción variable al flujo aéreo y/o hiperrespuesta bronquial y/o inflamación (24), en relación a la exposición profesional. La historia clínica suele estar bien definida y los síntomas aparecen en el ambiente laboral, con mejoría en ausencia de exposición, como en los fines de semana o en los periodos vacacionales. Cuando la exposición es crónica, los periodos de descanso tienen que ser más prolongados para observar la mejoría.

1.3 – PRUEBAS COMPLEMENTARIAS EN LA RINITIS ALÉRGICA

1.3.1 - Pruebas cutáneas (*prick test*)

Se realizan escarificaciones en la piel del antebrazo, aplicando una gota de solución del extracto de los diferentes alérgenos. Se usa una lanceta para introducir el alérgeno a nivel intraepidérmico, con objeto de ponerlo en contacto con los mastocitos cutáneos, evaluando la reacción a los 15-20 minutos. Como control positivo, se utiliza la histamina y como negativo, el suero fisiológico. Con esta técnica, se demuestra la presencia o no de anticuerpos específicos en la superficie de los mastocitos y la subsiguiente activación tras la interacción del alérgeno con la IgE específica. Es una prueba sencilla, rápida, fiable, segura y reproducible, que requiere de un entrenamiento tanto para su realización, como para la interpretación de los resultados (29). Una prueba cutánea positiva no indica necesariamente que el alérgeno tenga relevancia clínica, sólo muestra que existe una sensibilización al mismo. Por ello, los resultados se deben complementar con una historia clínica.

1.3.2 - Determinación de IgE específica sérica

La presencia de IgE en suero, que reacciona de forma específica con un alérgeno, nos aporta información sobre si un paciente está sensibilizado o no a éste. Las técnicas de laboratorio más utilizadas para su determinación han sido el RAST (*Radio Allergo Sorbent Test*) y más recientemente, el ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). En esta última, un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo marcado con una enzima capaz de generar una señal detectable, como por ejemplo un cambio de color. Los resultados se correlacionan bien con las pruebas de provocación nasal y con el resultado de las pruebas cutáneas, aunque su sensibilidad es menor (25). Se suele utilizar como un método complementario de los test cutáneos, por ejemplo, cuando hay alta sospecha clínica y los *prick test* son negativos, en los falsos positivos cutáneos o en los pacientes polisensibilizados, a la hora de determinar la relevancia clínica para pautar inmunoterapia, según algunos autores.

1.3.3 - Inmunotransferencia

La inmunotransferencia es un ensayo *in vitro* utilizado para la detección y caracterización de proteínas, que funciona mediante el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Consiste en la solubilización y separación electroforética de las proteínas, glicoproteínas, o lipopolisacáridos, según su peso molecular, seguido de la transferencia cuantitativa y unión irreversible a nitrocelulosa o a nylon, entre otros.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), introducida por Orstein en 1964 (26), demostró tener una alta reproducibilidad, por lo que ha ido sustituyendo a las técnicas previas. La introducción de dodecil-sulfato sódico (SDS) en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (27), la ha convertido en la técnica más generalizada. Se utiliza en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las

proteínas de acuerdo a su peso molecular. Gracias al SDS, las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional y adquiriendo una carga negativa. De este modo, se obtiene un fraccionamiento conforme a la diferencia de peso, la longitud de la cadena (tamaño) y la forma de la proteína (Figura 5). Además, se utilizan marcadores de peso molecular conocido que nos permiten identificar los pesos de los alérgenos en estudio. La combinación de los métodos electroforéticos altamente resolutivos, con la detección de proteínas a través de anticuerpos, ha creado una nueva dimensión en el estudio de la caracterización de los antígenos proteicos.

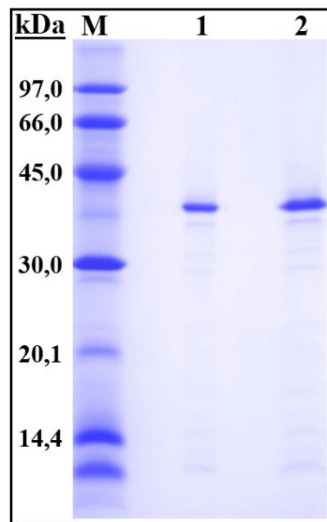


Figura 5. Ejemplo de un perfil proteico por la técnica SDS-PAGE.

1.3.4 - Prueba de provocación nasal Alérgeno-Específica

La provocación nasal es una técnica realizada in vivo que consiste en la instilación de un alérgeno en la mucosa nasal. Su mayor utilidad en la práctica clínica reside en un correcto diagnóstico de las rinitis ocupacionales (28).

Después de la realización de la primera prueba de provocación nasal (Charles Backley en 1873), se han intentado consensuar las directrices para su realización y ayudar a la estandarización, publicándose varios manuscritos (30-35). No obstante, existen ciertas dificultades que hacen que persista una gran variabilidad:

- El grado de sensibilización del paciente determina la dosis para iniciar la prueba, además de la potencia del extracto y la situación medioambiental en el momento determinado en el que se realice la prueba.
- Las diversas técnicas de administración (gotas, micropipetas, discos de papel impregnados con el alérgeno, extractos nebulizados, aerosoles, entre otros).
- Las diferentes unidades de medida de alergenidad de los extractos utilizados por los distintos laboratorios que los producen.
- Los diferentes sistemas para valorar la respuesta y, por tanto, los diferentes criterios para definir una prueba como positiva.

Deben darse determinadas condiciones para la provocación nasal:

- Se debe realizar en una fase asintomática del paciente o, en el caso de los alérgenos perennes, deben estar oligosintomáticos para su correcta interpretación. Por ello, a los pacientes polínicos se les suele citar en los meses de ausencia de exposición a polen.
- Para minimizar la influencia del ciclo nasal, se aconseja la realización siempre a la misma hora, preferiblemente por la mañana.
- Se debe suspender el tratamiento con antihistamínicos, corticoides y descongestionantes nasales u orales con una antelación variable, dependiente de su vida media. Ciertos fármacos como los antidepresivos tricíclicos, pueden disminuir la reactividad nasal al alérgeno.
- Se deben mantener una temperatura y humedad constantes, entre 20-22°C y un 40-60%, respectivamente, ya que se ha evidenciado que temperaturas mayores de 35°C y un grado de humedad por encima del 80%, reducen la respuesta inmediata al disminuir la liberación de histamina y la reacción vasculonerviosa.
- La prueba está contraindicada en un episodio agudo de rinitis, con el fin de evitar falsos positivos. Tampoco se debe realizar en las 4 semanas siguientes a una infección vírica o crisis alérgica, o en las 8 semanas posteriores a una cirugía nasal.
- Si se trata de una alergia ocupacional, el sujeto debe estar al menos una semana alejado de su puesto de trabajo.

Para valorar la respuesta, se evalúan las manifestaciones clínicas post provocación mediante una escala de síntomas. Se han sugerido numerosos sistemas de medida para cuantificar la positividad. Todas consisten en una puntuación que, comúnmente, va de 0 a 3 según la intensidad de cada uno de los síntomas y que pueden presentarse tras la prueba (estornudos, picor nasal, rinorrea anterior, entre otros). Se trata de una medición reflejada por el paciente con un componente subjetivo. Por otro lado, se mide de forma objetiva la posible obstrucción nasal a través de diferentes métodos de los que se disponen, como son: la rinomanometría anterior activa o pasiva, la rinomanometría posterior activa, la rinometría acústica o la medición del pico flujo inspiratorio nasal.

1.3.5 - Rinometría acústica

1.3.5.1- Definición

La rinometría acústica es la técnica que hemos utilizado en nuestro estudio. Es un procedimiento no invasivo, sencillo, seguro, bien tolerado, fiable y altamente reproducible (variabilidad de entre un 2-6%, claramente inferior al resto de sistemas) (36,37). Resulta especialmente útil en niños, dado que sólo requiere una mínima colaboración por parte del paciente (38-42). Se trata de una prueba estática y mide la geometría de las fosas nasales (áreas y volúmenes), gracias a la reflexión de una onda acústica. Permite valorar los cambios en el grado de obstrucción nasal tras el uso de fármacos para la rinitis o tras la exposición a un alérgeno. La prueba se suele realizar de forma basal, después de administración del diluyente o suero fisiológico para descartar hiperreactividad nasal inespecífica, y después de la aplicación de vasoconstrictores nasales o de la instilación de un alérgeno. Se indica previamente a la septoplastia o

turbinectomía, y para medir la reactividad nasal frente a los alérgenos en la rinitis alérgica. Para poder entender la funcionalidad, es necesario conocer la anatomía y la fisiología de la nariz.

1.3.5.2 – Anatomía y fisiología de la nariz

El esqueleto nasal está compuesto por hueso, cartílago y tejido conectivo. La forma, situación y disposición de estos elementos condicionan la armonía y función de las fosas nasales. Éstas se dividen por el tabique nasal en dos mitades asimétricas, donde se sitúa el vestíbulo y la cavidad nasal. El soporte de la pared interna del vestíbulo está formado por la porción anteroinferior del cartílago del tabique, y el techo del vestíbulo, por el cartílago de las alas, que va de la pared interna y constituye la pared externa, determinando las narinas. Entre el vestíbulo y la fosa nasal, se encuentra la válvula nasal interna, punto más estrecho de toda la sección transversal, el cual se origina por una prominencia del borde anterior del cartílago triangular de la pared lateral de la nariz. La fosa nasal se extiende de la válvula nasal interna hasta la coana. En la pared externa se encuentran estructuras importantes para la función de la nariz y de los senos paranasales, como son: el orificio de drenaje del conducto lacrimonasal, los orificios de comunicación de los senos y los tres cornetes (superior, medio e inferior). Debajo de estos últimos, se hallan los meatos: el inferior, donde se encuentra la desembocadura del conducto lacrimonasal; el medio, que contiene la escotadura del seno frontal, maxilar y celdas etmoidales anteriores; y el superior, donde se encuentra la desembocadura de las celdas etmoidales posteriores y los senos esfenoidales (Figura 6) (43).

La irrigación corre a cargo de la arteria facial con sus ramas y la arteria del dorso de la nariz (rama de la oftálmica). La 1ª y 2ª rama del trigémino componen la inervación sensitiva, mientras que la motora es a través del nervio facial.

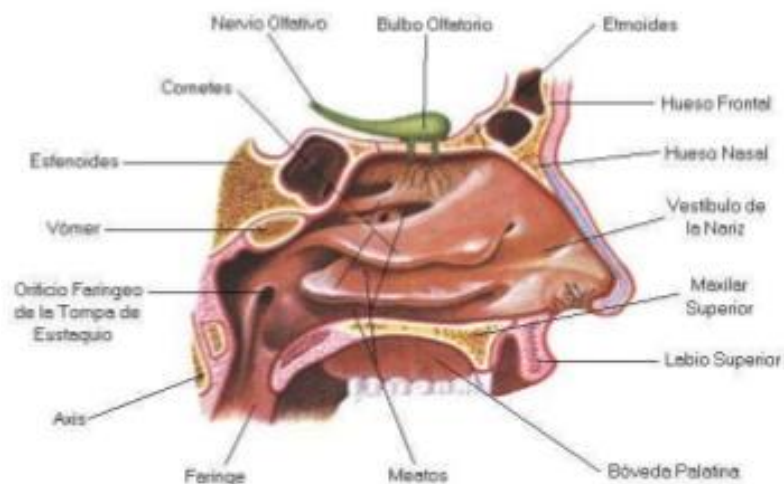


Figura 6. Anatomía de la nariz.

Fisiológicamente, las fosas nasales tienen dos funciones principales: la olfacción y la respiración. Además, intervienen como órgano de resonancia para la voz en la formación del lenguaje. Si la nariz se encuentra taponada, la voz pierde timbre y resonancia. En la lámina cribosa, situada en la porción superior de la fosa nasal, se localizan las células olfatorias. Las podemos encontrar también en la parte media del cornete superior y en la parte alta del tabique. Como órgano respiratorio, la nariz sirve para calentar y humedecer el aire, purificándolo de partículas de polvo. El relieve de los cornetes y la forma de los meatos, hace que se formen unas turbinas de aire que favorecen esta función. La nariz también desempeña la función de ventilación y drenaje de los senos paranasales, así como del aparato lacrimal. Otras funciones accesorias son las motoras, sensoriales, tróficas y vasomotoras, haciendo que algunos fenómenos puedan producir congestión de la mucosa nasal y aumento de la secreción de las glándulas nasales, provocando finalmente el estornudo.

1.3.5.3 – Equipo, principio físico y registro

Para la realización de esta prueba, se utiliza un rinómetro que genera un impulso acústico (Figura 7). El sonido se propaga por un tubo o sonda que se coloca herméticamente en la narina a través de unos adaptadores nasales. La sonda debe formar un ángulo de 45 grados sobre el plano facial. La onda sonora es reflejada dentro de la fosa, según las estructuras que encuentra a su paso, y es captada por un micrófono. La señal recogida se procesa, obteniendo una gráfica en la que se dibujan los distintos relieves de la fosa nasal y su relación con las zonas anatómicas. El programa hace un cálculo numérico de áreas y volúmenes de paso en las zonas críticas. Mediante esta técnica, se pueden obtener las áreas transversales en función de la distancia de las narinas para cada fosa nasal por separado, mostrando volúmenes nasales entre distancias seleccionadas, los cuales son calculados a partir de la suma de distintas áreas transversales contiguas. Si la gráfica se aproxima a la línea central, indicaría un área/volumen de paso menor. Al final se genera un gráfico, en el cual se aprecia la distancia desde las narinas en el eje de las abscisas (cm), y las áreas transversales en el eje de las ordenadas (cm²). Es importante señalar que la curva rinométrica clásica describe un patrón ascendente en forma progresiva (explicado por el aumento de las áreas transversales nasales al dirigirse hacia las coanas), lo cual se ve interrumpido por dos escotaduras en la parte anterior de la fosa nasal: la escotadura "I" y la escotadura "C". La escotadura "I" correspondería a la válvula nasal interna, mientras la escotadura "C" correspondería a la cabeza del cornete inferior (44). El área transversal mínima (ATM) corresponde al menor valor de área transversal registrado en cada fosa nasal, siendo la responsable de la sensación de obstrucción nasal del paciente (Figura 8).

Los volúmenes que habitualmente se miden son:

- Volumen 1 (VOL 1): primer segmento de la nariz, que va desde las narinas hasta el ATM. Este segmento es poco reactivo y no se suele tener en cuenta a la hora calcular la caída de volumen después de la provocación. En adultos usualmente es entre 0 y 2,2 cm y en niños entre 0 y 1 cm.
- Volumen 2 (VOL 2): segundo segmento (también denominado Volumen 2-6 cm). Es la franja donde se produce habitualmente la obstrucción, determinando en mayor

medida la sensación de congestión que refieren los pacientes. Representa el volumen del segmento anterior de la fosa. Se considera la zona de mayor interés para valorar los cambios en la mucosa, pues en él encontramos los cornetes inferior y medio. En adultos suele elegirse el intervalo entre de 2,2 a 5,4 cm y en niños de 1 a 4 cm (45). El porcentaje de disminución de este volumen tras la provocación con alérgeno, respecto al obtenido tras la instilación del diluyente o suero fisiológico, es el parámetro más útil para valorar el resultado de la prueba de provocación nasal. Existen diferentes valores de referencia publicados en diversos artículos, tanto en niños como en adultos sanos (45-47), oscilando los valores de positividad entre un 15- 30%.



Figura 7. Rinómetro acústico utilizado para nuestro estudio.

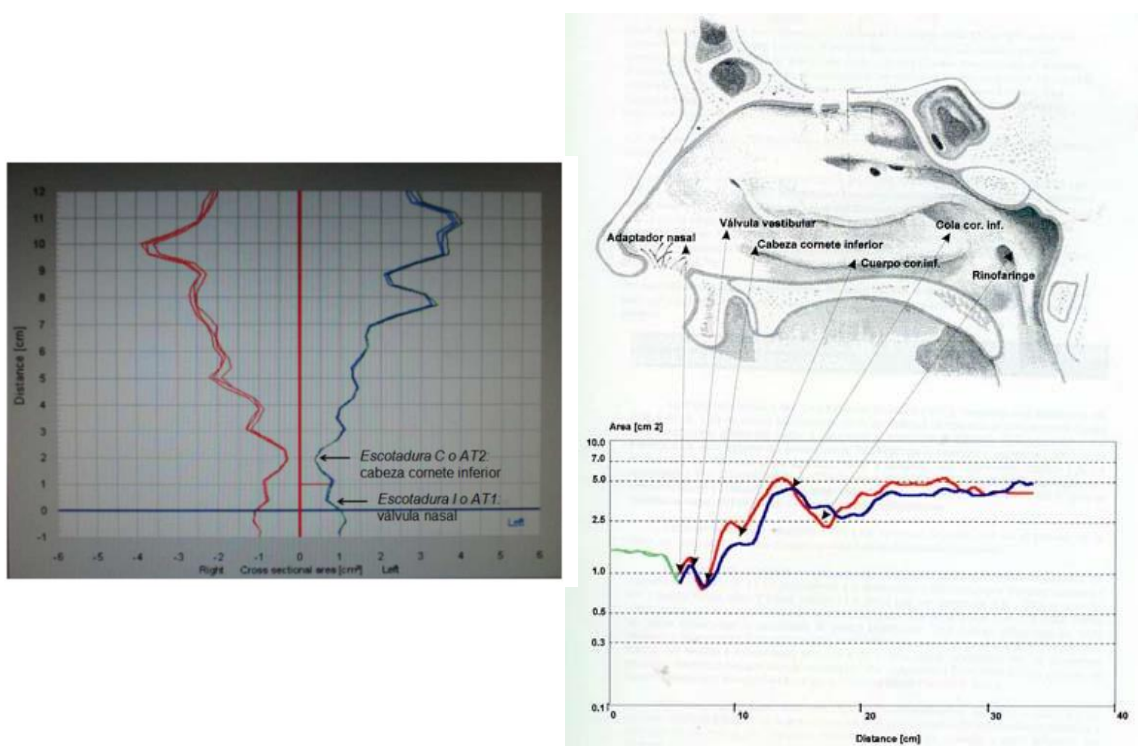


Figura 8. Registros de rinometría acústica basal realizadas con diferentes rinómetros.

1.4 - POLINIZACIÓN EN MURCIA

1.4.1 – Generalidades

Los estudios sobre sensibilización a pólenes se centran sobre todo en los transportados de forma aérea (anemófilos), que se propagan a grandes distancias, afectando incluso a otras poblaciones que no habitan en su lugar de origen. En España, existen diferentes territorios biogeográficos con unas características determinadas, existiendo un denominador común para todo el país, que es la sensibilización a polen de gramíneas. Ejemplos de pólenes específicos de los diferentes ecosistemas pueden ser: el abedul en el norte; olivo en el sur, parte central y zona mediterránea; parietaria en la región mediterránea y salsola en las zonas con características de desertización (50).

La Región de Murcia se caracteriza por tener una gran abundancia de especies de plantas alergénicas y, debido a las condiciones atmosféricas favorables, facilita que los pólenes que producen síntomas alérgicos, tengan periodos de polinización muy largos. Además, el solapamiento del periodo de polinización de diferentes plantas o árboles, hace difícil diferenciar entre sólo sensibilización o la capacidad de producir manifestaciones alérgicas. Los principales pólenes causantes de enfermedades alérgicas son los de olivo (*Olea Europaea*), quenopodiáceas (*Chenopodium album* y *Salsola kali*) y gramíneas (*Poaceae*), seguido de los pólenes de cupresáceas (*Cupressus arizonica*), *Platanus acerifolia*, *Parietaria judaica* y *Artemisia vulgaris*.

Por otro lado, existen otros pólenes de plantas entomófilas adaptadas para el transporte de los granos de polen por medio de los insectos. Estas plantas o árboles suelen ocupar grandes extensiones de terreno, lo que supone una gran población expuesta, tanto de forma directa (trabajadores dedicados al cultivo de las mismas, envasadores y manipuladores en cooperativas frutícolas) como indirecta (población general). En este sentido, los frutos de hueso que tienen más relevancia clínica desde el punto de vista alergológico son el melocotón, albaricoque, cereza, ciruela, almendra y manzana. Concretamente, España es el primer país productor de melocotón en Europa, habiendo superado a Italia (48,49). Se debe tener en cuenta que una sensibilización a árboles frutales puede deberse a proteínas que están presentes tanto en el fruto como en las hojas, tronco y raíces, además del polen (51,52), y que las vías de sensibilización pueden ser la inhalatoria (tracto respiratorio), por contacto (piel) o por ingestión (tracto gastrointestinal).

1.4.2 - Cultivos de melocotón

La Región de Murcia tiene 300 días de sol al año. Se la conoce como la Costa Cálida. El melocotón necesita unas horas de frío y otras de calor para madurar de forma óptima. Una de las mejores zonas para su cultivo es la Vega Alta del Segura, siendo el municipio de Cieza el más representativo.

La tradición melocotonera en La Vega Alta es milenaria. En torno al 3.000 antes de Cristo, se empezó a cultivar en China y después pasó a Persia. Los romanos llamaron al fruto *Prunum persica* porque pensaban que su origen era pérsico. En la Cueva de la

Serreta (Murcia) se encontraron huesos de melocotón del siglo III. En Medina Siyasa (yacimiento morisco del que deriva Cieza) también se hallaron huesos datables del siglo XI al XIII.

En los últimos años, la producción de melocotones y frutas afines en Cieza y el resto de municipios que componen la Vega Alta, ha experimentado un gran crecimiento, exportando unas 400.000 toneladas al año. El 80% de los habitantes de la zona más cercana a estos cultivos, vive directa o indirectamente de este fruto. En España, otras zonas representativas donde se cultiva en abundancia son Lleida y Aragón. Nuestro país es el tercer productor de melocotón del mundo, después de China y EEUU, seguido de Italia, Grecia y Francia (48,49). La tendencia de producción va en aumento y se estima que nuestro país superará a EEUU en un tiempo relativamente corto.

Actualmente, existen múltiples variedades de diferentes tipos de frutas de hueso: melocotones (flor blanca o rosa), albaricoques (flor blanca) y nectarinas (flor blanca o rosa), entre otros. Hace años, el apogeo de la recogida del fruto era en junio. En este momento, gracias a las diversas variedades, hay fruto desde abril hasta septiembre. La floración es extremadamente cambiante y se renueva cada año. La rotación varietal es crucial para sostener el mercado. Además, el aclareo es una actividad muy importante que se realiza en este tipo de cultivos para mejorar la calidad del fruto obtenido. Ésta consiste en la eliminación de flores y/o frutos de los árboles frutales, cuyos beneficios principales son:

- Obtención de fruta de mayor tamaño.
- Regulación de las producciones (disminución de la vecería, evitando alternar años de fuertes cosechas con años de poca o ninguna) en especies o variedades sensibles.
- Aumento de la coloración de los frutos.
- Eliminación de fruta dañada.

Asimismo, es una de las técnicas más eficaces para mitigar el estrés hídrico en frutales. Al disminuir el número de frutos, se reduce la transpiración del árbol, necesitando menos agua del suelo. Éste es un aspecto muy importante en plantaciones de secano y/o con limitada disponibilidad de riego, así como en situaciones de sequía.

1.4.3 - Polen de melocotonero

Los datos de los que disponemos actualmente gracias al proyecto desarrollado por nuestro grupo, indican que, a pesar de que el polen de melocotonero se considera como entomófilo, puede sensibilizar a una gran parte de la población en regiones donde se cultiva este fruto (53). Se sabe que la dispersión de pólenes entomófilos, como el del maíz o la palmera, entre otros, no recorre una distancia superior a los 200 metros del lugar de producción (54,55). Sin embargo, como parte nuestro proyecto, se realizó un muestreo entre enero y mayo de 2019, observando que, a 100 km de distancia, se detectaron casos de sujetos sensibilizados al polen de melocotonero (servicio de Alergología del Hospital de Albacete).

Los alérgenos hasta ahora descritos en el polen y/o fruto del melocotonero, de acuerdo con la literatura publicada, por orden cronológico y según la nomenclatura internacional, se clasifican en tres categorías:

1. Alérgenos presentes en el fruto:

El melocotón (denominado como *Prunus persica*) es uno de los frutos más consumidos en todo el mundo. Sus alérgenos se describen con la nomenclatura Pru p, seguido de un número. Este fruto, es uno de los principales causantes de las reacciones alérgicas sistémicas, predominando en poblaciones del área mediterránea, debido a la presencia de la proteína Pru p 3. Sin embargo, la relación con la alergia respiratoria no ha sido estudiada en profundidad. Otros alérgenos identificados en el fruto son: Pru p 1 (Familia de las PR-10), Pru p 2 (familia de las Taumatinas), Pru p 4 (familia de las Profilinas) y Pru p 7 (familia de las Giberelinas) (56).

2. Alérgenos presentes en tallos y hojas:

La relación que existe entre trabajadores expuestos al melocotonero y el desarrollo de síntomas respiratorios, ha sido descrita en varios estudios. Aunque inicialmente se atribuyó a Pru p 3 presente en las hojas (57), un trabajo posterior demostró la presencia de una isoforma de este mismo alérgeno y otras bandas de alto peso molecular (45 y 25 kDa) (52).

3. Alérgenos presentes en el polen:

Gracias a las investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo (53), se han identificado varios alérgenos con diferentes pesos moleculares (Figura 9) (58):

a) *Poligalacturonasa*: alérgenos similares se han descrito en el olivo, salsola, plátano de sombra y gramíneas (59).

b) *1,3-beta-glucosidasa*: se trata de un alérgeno descrito en el olivo, fresno y látex (60).

c) *Ole e 6 like*: este tipo de proteínas, descritas en olivo y fresno, son alérgenos ricos en cisteínas con función biológica desconocida (61). Esta proteína indujo sensibilización y síntomas respiratorios en un número de sujetos testados en nuestra población (62).

d) *Pru p 9*: perteneciente a la familia de proteínas en respuesta al estrés PR-1, alérgenos muy relevantes en pólenes y alimentos que presentan importantes modificaciones postraduccionales y ligandos clave para la inducción de síntomas alérgicos. Es el primer aeroalérgeno relevante identificado en este polen (63,64). El estudio de los patrones de reconocimiento IgE indican que Pru p 9 puede ser una proteína específica del lugar de exposición (58, 65).

Además de los alérgenos mencionados, en el polen del melocotonero se han podido reconocer, utilizando anticuerpos policlonales, bandas correspondientes a proteínas de las familias de las Taumatinas y Profilinas. Del mismo modo, también encontramos la presencia de una proteína de 7 kDa, similar al alérgeno presente en el fruto, Pru p 7.

Numerosos estudios demuestran la posibilidad de que en una misma fuente vegetal existan proteínas que sensibilicen por vía inhalatoria, otras por vía gastrointestinal y que los individuos afectados presenten manifestaciones en ambas vías (66). Por ejemplo,

Pru p 7, perteneciente a la familia de las giberelinas, presenta un papel importante en la inducción de síntomas respiratorios y sistémicos, destacando su relación con el polen de ciprés (67).

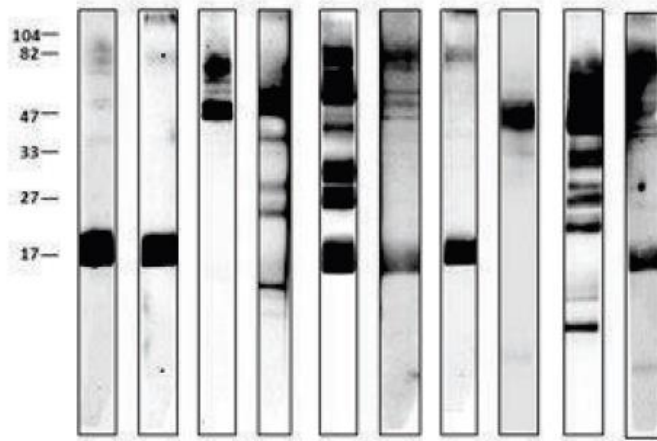


Figura 9. Perfil alergénico de 10 casos sensibilizados a polen de melocotonero. Muestra representativa de las proteínas alergénicas más relevantes.

2. PRESENTACIÓN Y APORTACIONES DEL DOCTORANDO EN LAS PUBLICACIONES.

2.1 – ARTÍCULO 1

Título: “Peach tree pollen and Pru p 9 may induce rhinoconjunctivitis and asthma in children”.

Autores: Maria Luisa Somoza, María Garrido-Arandia, Laura Victorio Puche, José Damián López-Sánchez, Natalia Blanca-López, Elisa Haroun-Diaz, Alejandro Romero Sahagún, Araceli Díaz-Perales, Gabriela Canto, Miguel Blanca.

2.1.1 - Información y criterios de calidad

Año: 2019

Revista: Pediatric Allergy And Immunology

Volumen, pág.: Pediatr Allergy Immunol. 2019 Sep;30(6):662-665

Factor de impacto: 4.654

Scimago Journal & Country Rank (SJR): Q1 en su categoría.

2.1.2 - Aportaciones del doctorando

- Reclutamiento de casos.
- Procesamiento de muestras.
- Evaluación de casos.
- Elaboración del manuscrito.

2.2 – ARTÍCULO 2

Título: “Peach Tree Pollen and Prunus Persica 9 Sensitisation and Allergy in Children and Adolescents”.

Autores: Laura Victorio Puche, Maria Luisa Somoza, José Damián López Sánchez, María Garrido-Arandia, Araceli Díaz-Perales, Miguel Blanca.

2.2.1 - Información y criterios de calidad

Año: 2019

Revista: International Archives of Allergy and Immunology

Volumen, pág.: Int Arch Allergy Immunol. 2019;180(3):212-220

Factor de impacto: 2.920

Scimago Journal & Country Rank (SJR): Q1 en su categoría.

2.2.2 - Aportaciones del doctorando

- Reclutamiento de casos.
- Procesamiento de muestras.
- Evaluación de casos.
- Elaboración del manuscrito.

2.3 – ARTÍCULO 3

Título: “*Prunus persica 9, a new occupational allergen from peach tree pollen involved in rhinitis and asthma*”.

Autores: Laura Victorio-Puche, María Luisa Somoza, Laura Martín-Pedraza, Enrique Fernández-Caldas, Eva Abel Fernández, Miriam Moran, José Luis Subiza, José Damian López-Sánchez, Mayte Villalba, Miguel Blanca.

2.3.1 - Información y criterios de calidad

Año: 2020

Revista: Occupational Environment Medicine

Volumen, pág.: Occup Environ Med. 2021 Feb;78(2):142-144.

Factor de impacto: 3.570

Scimago Journal & Country Rank (SJR): Q1 en su categoría.

2.3.2 - Aportaciones del doctorando

- Diseño del trabajo.
- Estudio clínico.
- Pruebas de provocación nasal.
- Elaboración del manuscrito.

3. OBJETIVOS

1. Demostrar la sensibilización a polen de melocotón en un área bien definida de la Región de Murcia, con una alta exposición.
2. Establecer la relevancia clínica de la sensibilización a polen de melocotón, tanto en individuos expuestos (trabajadores de los cultivos de melocotoneros) como en no expuestos (niños y adolescentes).
3. Determinar en qué medida la sensibilización a Pru p 9, alérgeno del polen de melocotón descrito por nuestro grupo recientemente, contribuye a la producción de los síntomas respiratorios en estos pacientes, tanto expuestos como no expuestos.
4. Estudiar la prevalencia de sensibilización a otros pólenes en la misma área.

4. METODOLOGÍA GLOBAL

Estos artículos se engloban dentro de un gran estudio poblacional a nivel nacional sobre el polen de melocotonero. Una de las primeras provincias donde se decidió comenzar fue en Murcia, dadas las características adecuadas de su biosistema para este tipo de estudio.

4.1 – POBLACIÓN Y TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio transversal en una importante población de niños, adolescentes y adultos residentes en Blanca, municipio situado al norte de la Región de Murcia, en La Vega Alta del Segura. Para dar información a los padres, abuelos, cuidadores responsables de los niños y al resto de población, se repartieron folletos explicativos y se impartieron charlas en escuelas, institutos y centro social. Los médicos del Centro de Salud fueron informados de las características del estudio.

4.2 – CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Individuos censados en el municipio de Blanca, con edades comprendidas entre 3 y 90 años.

4.3 – CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Individuos menores de 3 años y mayores de 90.
- Sujetos que tengan déficits cognitivos o cualquier alteración psíquica.
- Mujeres embarazadas.
- Sujetos con enfermedades infecciosas transmisibles.
- Individuos con enfermedades autoinmunes u oncológicas bajo tratamiento con biológicos o antineoplásicos.

4.4 – VARIABLES DEL ESTUDIO

- Cuantitativas:** edad (años), periodo y tiempo de residencia en la zona de estudio (años), número de pruebas cutáneas positivas a alérgenos inhalantes y alimentarios. En el caso de la determinación de IgE específica frente al extracto de polen de melocotonero y sus alérgenos purificados, se realizó mediante ELISA.
- Cualitativas:** género, etnia, lugar de origen, lugar de residencia y ocupación. Además, las variables cuantitativas continuas como edad, días de exposición y otras, se transformaron en categóricas en los análisis que se consideró, por ejemplo, las edades y género se pudieron estratificar por periodos de 3 a 5 años.

4.5 – MÉTODO

Este trabajo se realizó de forma secuencial, desde mayo de 2016 hasta diciembre de 2018, comenzando a estudiar en primer lugar a los niños de los colegios de educación infantil y primaria, seguido del instituto de secundaria, bachillerato y formación profesional, para finalmente continuar con la población adulta. Para recoger todos los datos y poder realizar las pruebas cutáneas en los colegios e instituto, se solicitó un consentimiento informado a los padres/tutores.

❖ Historia clínica:

A cada individuo se le realizó una entrevista personal y se completó un cuestionario detallado y adaptado para los estudios poblacionales, donde se incluyeron variables demográficas, ambientales y clínicas, como la nacionalidad, el lugar y fecha de nacimiento, haber residido en otros entornos, exposición al tabaco, ejercicio, antecedentes familiares de atopia, actividad ocupacional que desarrolla, contacto con animales de corral, labranza y domésticos, y síntomas alérgicos, tanto a nivel respiratorio como alimentario o farmacológico.

❖ Pruebas cutáneas:

Se realizó una batería estándar de alérgenos inhalantes y alimentarios, incluyéndose pólenes (*Phleum pratense*, *Cupressus arizonica*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Parietaria judaica* y *Salsola kali*), ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*), hongos de la humedad (*Alternaria alternata*), epitelios de animales (perro y gato), frutos secos (cacahuete, almendra y nuez), frutas (manzana, plátano, melocotón, kiwi, melón y piña), crustáceos (gamba), verduras (tomate) y panalérgenos vegetales (profilina, polcalcina y LTP) (ALK-Abello®, Madrid, España). También se realizó prueba cutánea con polen de melocotón (elaborado por ALK-Abello®) y a los pacientes con positividad para éste, se testó Pru p9 (proteína purificada a partir de polen de melocotón por Iberpolen®, España). Las concentraciones óptimas para *prick test* con polen de melocotón y Pru p 9, se establecieron mediante curvas de titulación. El criterio de positividad de una prueba cutánea se estableció en que su área debía ser igual o superior al tamaño de la histamina (control positivo).

❖ Determinación de IgE específica sérica e inmunotransferencia:

De nuevo se solicitó consentimiento informado a los participantes o padres/tutores, en caso de los menores de edad, para la extracción de sangre periférica, estudio correspondiente y almacenamiento en el biobanco del Hospital Infanta Leonor (Madrid). Para los alérgenos moleculares y extracto del polen de melocotonero se realizó la determinación mediante ELISA, considerando positiva una densidad óptica igual o superior a 0.2. Para los patrones de reconocimiento de alérgenos moleculares se utilizaron ensayos de inmunotransferencia.

❖ **Provocación nasal con alérgenos:**

Se estudió la respuesta individualizada al polen de melocotón y a Pru p 9 en una muestra aleatoria de individuos, tanto expuestos como no expuestos, también previo consentimiento informado. Para ello, se realizaron pruebas de exposición nasal controlada en los meses de verano (época asintomática), siguiendo las directrices de Rondon et al. y de la EAACI (68, 69), valorando la respuesta a través de:

- Datos Subjetivos mediante una escala de síntomas clínicos: éstos se dividieron en 5 apartados: obstrucción nasal, rinorrea, prurito nasal, estornudos y síntomas oculares. Para cada síntoma se dio una puntuación de 0 a 3 puntos (0 = sin síntomas, 1 = leve, 2 = moderado o 3 = severo). Puntuación final de 0 a 15 puntos.
- Datos Objetivos mediante rinometría acústica: se realizó una provocación nasal con solución salina para descartar la hiperactividad nasal. Si dicha prueba fue negativa, se procedió con la provocación nasal con polen de melocotón y Pru p 9, con intervalos de una semana. La rinometría acústica se realizó con el uso del rinómetro GM Instruments (model A1, UK), de acuerdo a las normas del Comité de Estandarización de Rinometría Acústica (70). El valor medio del volumen (cm³) en el segmento nasal anterior (Volumen₂₋₆ cm) fue medido en estado basal, a los 15 minutos de la aplicación de suero salino y a los 15 minutos después de la instilación de los alérgenos en estudio.

Criterios de positividad para la provocación nasal (debe cumplir los criterios 1 y 2):

- 1- Escala de síntomas clínicos igual o superior a 5 puntos (escala de 0 a 15 puntos).
- 2- Disminución del Volumen 2-6 cm superior al 25%, en comparación con la prueba de referencia tras solución salina.

4.6 - ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Se realizó un análisis descriptivo, con medidas de tendencia central y de dispersión en variables continuas, y distribución de frecuencias para las cualitativas. Los datos de prevalencia de sensibilización y alergia a los alérgenos considerados se presentaron estratificados por grupos de edad (trienios) con sus intervalos de confianza al 95% (IC95%). Para cada grupo de estudio se realizó un análisis bivariado para valorar la desigual distribución de variables independientes, utilizando el test t de Student para variables independientes cuantitativas o la U de Mann-Whitney (en caso de que no sigan una distribución normal), y el test de chi-cuadrado para variables independientes cualitativas (o el de Fisher para frecuencias esperadas <5). Finalmente, se construyeron modelos de regresión logística multivariante para la sensibilización/alergia a cada uno de los alérgenos considerados, incluyendo las variables desbalanceadas en análisis bivariado, y forzando la entrada de los grupos de edad, junto con la exposición y actividad laboral. Se describieron las odds ratio de prevalencia y sus IC95%, y se establecieron la significación estadística en $p < 0.05$ y, para las variables con magnitud de la asociación clínicamente significativas, en $p < 0.01$.

4.7 – ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y por el Hospital General Gregorio Marañón de Madrid.

Se aplicaron los principios éticos de la investigación en humanos que se recogen tanto en la declaración de Helsinki como en el informe Belmont y que se concretan en los principios básicos de respeto por las personas, beneficencia y justicia.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes incluidos en el estudio. Para preservar la confidencialidad, según establece la Ley Orgánica de 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, cada paciente se identificó por un código. Además, las hojas de recogida de información se archivaron de forma apropiada para asegurar la confidencialidad, junto con el resto del material del estudio.

5. RESUMENES DE LOS ARTÍCULOS.

5.1 - **ARTÍCULO 1: “Peach tree pollen and Pru p 9 may induce rhinoconjunctivitis and asthma in children”.**

En este artículo, se recoge un grupo de 10 niños que refería síntomas respiratorios después del contacto directo o indirecto con melocotoneros, durante el período de polinización (desde finales de febrero hasta principios de junio). Todos presentaban sensibilización al polen del melocotonero y cuatro de ellos (el 40%), a un alérgeno recién identificado por nuestro grupo, Prup 9. Se añadió un grupo control de 12 niños, emparejado por edad y sexo, sensibilizados a pólenes, incluido el de melocotón, pero negativo a Pru p 9.

El método a seguir fue el ya descrito anteriormente, con sujetos voluntarios que se reclutaron en los colegios o instituto del municipio de Blanca. Se realizó una historia clínica detallada y pruebas cutáneas con una batería predeterminada de inhalantes y alérgenos alimentarios, polen de melocotonero, Pru p 9 y Pru p3. Además, se completó el estudio con pruebas de provocación nasal con polen de melocotonero y Pru p 9.

Las edades de los niños se comprendían entre los 8 y los 14 años. En la mayoría de los sujetos, los síntomas clínicos comenzaron al menos dos años antes de que se realizara este estudio. Todos referían rinitis o rinoconjuntivitis en la época de la floración; sólo uno de ellos asociaba síntomas bronquiales.

En todos, excepto el caso 3, las pruebas cutáneas fueron positivas a diferentes pólenes y, cuatro de ellos, a otros alérgenos como epitelios de animales domésticos (gato y/o perro) y hongos de la humedad (*Alternaria alternata*). El caso 3 estaba sensibilizado sólo al polen de melocotonero. Los *prick test* con Pru p 3 fueron negativos, presentando todos los sujetos buena tolerancia oral al melocotón, a otras frutas y a frutos secos.

En las provocaciones nasales, todos los casos fueron positivos a polen de melocotonero a los 15 minutos, normalizándose la respuesta a los 60 minutos, excepto el caso 3, en el que persistió durante 24 horas. Los casos positivos en *test* cutáneos para Pru p 9 (casos 1-4), también lo fueron en la provocación nasal. Uno de los sujetos tuvo tos seca, sin ningún otro síntoma bronquial. La prueba de exposición nasal fue negativa para Pru p 9 en los sujetos con pruebas cutáneas negativas a dicho alérgeno.

5.2 – **ARTÍCULO 2: “Peach Tree Pollen and Prunus persica 9 Sensitisation and Allergy in Children and Adolescents”.**

En este trabajo se incluyeron todos los sujetos de 3 a 19 años que se ofrecieron voluntarios en los colegios e instituto del municipio de Blanca. Se realizó una historia clínica detallada, pruebas cutáneas con una batería predeterminada de inhalantes y alérgenos alimentarios, polen de melocotonero y Pru p 9, además de provocaciones nasales con polen de melocotonero y Pru p 9.

Se recogieron un total de 685 niños (52% mujeres), con una edad media de 8,75 ± 3,3 y una mediana de 9 años. El 39% de los sujetos (267) estaba sensibilizado al menos a un polen, siendo el más prevalente el polen de *Olea europaea*, seguido de *Phleum pratense*, polen de melocotón, *Salsola kali*, *Cupressus arizonica*, *Plantanus acerifolia* y *Artemisia vulgaris*. En cuanto a la clínica, el 67% refirió rinitis, el 57% conjuntivitis y el 18% asma.

Dichos sujetos se dividieron en 2 grupos: el grupo A, que estaba sensibilizado a pólenes ambientales y polen de melocotón, y el grupo B, donde se encontraban los sensibilizados a pólenes, pero negativos al de melocotón. Catorce casos (11%) estaban sensibilizados sólo polen de melocotón y, por ello, no se incluyeron en ningún grupo.

En el grupo A se incluyeron 123 casos y en el B 115 casos. Hubo diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al porcentaje de sensibilización a polen de *Salsola kali* (56% frente a 21%, $p < 0,0001$), de *C. arizonica* (38 frente a 18%, $p < 0,02$), de *P. acerifolia* (29 frente a 6%, $p < 0,001$) y de *A. vulgaris* (21 frente a 5%, $p < 0,02$). Cuando analizamos la frecuencia de sensibilización estratificando por intervalos de 3 años desde los 3 hasta 19 años, observamos un aumento de la sensibilización en todos los pólenes conforme aumentaba la edad, incluido el polen de melocotón.

El 30% de los casos sensibilizados a polen de melocotón, también fueron positivos para Pru p 9.

Realizamos provocaciones nasales en 20 casos seleccionados aleatoriamente con positividad en *prick test* para polen de melocotón, 11 de ellos sensibilizados también a Pru p 9. En los 20 individuos, la prueba nasal fue positiva con polen de melocotón, dentro de los primeros 15 minutos, normalizándose la respuesta a los 60 min, excepto en 2 casos en los que persistió durante 24 h. La escala de síntomas indicó una clara respuesta positiva, con una puntuación de ≥ 8 . En las pruebas de exposición nasal con Pru p 9, los 11 casos sensibilizados fueron positivos, mientras que los 9 sujetos que en *test* cutáneos eran negativos, también lo fueron en dicha prueba. Para confirmar la especificidad de la respuesta nasal, en un grupo de 6 individuos con pruebas cutáneas negativas tanto a polen de melocotón como a Pru p 9, se le realizó provocación nasal con resultado negativo.

5.3 – **ARTICULO 3: “Prunus persica 9, a new occupational allergen from peach tree pollen involved in rhinitis and asthma”.**

En esta publicación, se evaluaron 21 trabajadores reclutados de forma consecutiva, que presentaban síntomas nasales y/o bronquiales después de la exposición al polen de melocotón durante la época de la floración, desde los 3-4 años previos al estudio. El trabajo de los participantes consistía en quitar las flores del melocotonero para mejorar la calidad del fruto (aclareo). Realizamos una historia clínica detallada y pruebas cutáneas con inhalantes, polen de melocotón y Pru p 9. Además, se realizó medición de IgE específica y estudio de inmunotransferencia. Por último, se realizaron provocaciones nasales con polen de melocotón y Pru P 9.

La edad media de los participantes fue de 45 años (rango de 20 a 57), el 57% mujeres. Todos los trabajadores referían síntomas de rinitis durante la época de floración, y 6 de ellos asociaban síntomas bronquiales.

Todos los sujetos estaban sensibilizados a polen de melocotón. Excepto un individuo, el resto estaba sensibilizado a más pólenes. El más prevalente fue el de *Olea europea* (90%), seguido de *Phleum pratense* (76%), *Platanus acerifolia* (48%), *Cupressus Arizonica* (43%), *Artemisia vulgaris* (24%), *Parietaria judaica* y *Salsola kali* (ambos con un 19%). El 43% estaba sensibilizado a Pru p 9. Los sensibilizados a Pru p 9 en *prick test*, también tenían IgE específica positiva a este alérgeno.

Los nueve casos con resultados positivos en prueba cutánea y ELISA a Pru p 9, presentaron un fuerte reconocimiento a este nuevo alérgeno, representado con una banda de 18 kDa. En los casos 7 y 8, sólo fue identificada Pru p 9. Los patrones de otros alérgenos fueron heterogéneos, describiéndose otras 3 bandas de alto peso molecular de 40, 75 y 45 kDa. No se objetivaron bandas correspondientes al peso molecular de Pru p 3. En los sujetos donde el *prick test* era negativo a Pru p 9, no se detectó dicha banda en la inmunotransferencia.

En la provocación nasal de los sujetos con pruebas cutáneas positivas a polen de melocotón y Pru p 9, cinco casos fueron positivas para los dos, un caso sólo para polen de melocotón y 3 casos sólo para Pru p 9. En los 12 casos en los que los *test* cutáneos eran positivos a polen de melocotón y negativos a Pru p 9, la provocación nasal a polen de melocotón fue positiva en nueve casos, y negativa a Pru p 9 en todos los casos analizados.

Los síntomas descritos en las provocaciones nasales fueron rinorrea, estornudos, prurito nasal, obstrucción nasal y síntomas oculares, asociados a una disminución del volumen nasal (rango: 25% a 40%). Cinco de los casos también tuvieron tos. En aproximadamente en una hora, los síntomas desaparecieron y el volumen nasal se recuperó en todos los participantes, aunque 5 casos precisaron la administración de oximetazolina para el control de síntomas.

6. DISCUSIÓN

Tras realizar un análisis de la bibliografía existente, no hemos encontrado ningún trabajo donde se haya estudiado de forma sistemática la sensibilización a polen de melocotón y su relevancia clínica, a pesar de ser un polen con una gran exposición poblacional.

En la zona geográfica donde hemos realizado el estudio, existen más de diez variedades de melocotón y de otras frutas rosáceas que polinizan desde últimos de febrero a primeros de junio, por lo pensamos que el polen de melocotón puede producir síntomas durante un periodo prolongado de tiempo, tanto en expuestos como en no expuestos.

El nexo de unión de estos 3 artículos reside en demostrar la sensibilización y la relevancia clínica del polen de melocotonero en una población determinada con alta exposición, tanto en trabajadores dedicados al cultivo del melocotón, como en el resto de la población, en concreto en niños y adolescentes. Existen varias posibilidades de sensibilización en estos últimos: o al visitar los cultivos durante el periodo de polinización, experimentando síntomas después de la exposición; o mediante una exposición indirecta al polen, en los niños cuyos padres trabajan en el aclareo y recogida del melocotón, ya que este polen se puede adherir a la ropa y ser liberado en casa.

En el primer artículo, aunque la muestra era reducida, fue la prueba de concepto que demostró mediante la provocación nasal, que los síntomas respiratorios presentados en la época de la floración pueden ser inducidos por el polen de melocotón y Pru p 9 en niños sensibilizados, confirmando así la relevancia clínica de estos alérgenos.

En el segundo artículo, una proporción importante de niños y adolescentes (1 de cada 5), estaba sensibilizada a polen de melocotón y desarrolló síntomas respiratorios, predominantemente en el periodo de la floración. El patrón de sensibilización fue similar a la encontrada en adultos (63). La mayoría de los casos con pruebas cutáneas positivas a polen de melocotonero estaban sensibilizados a más de un polen. La relevancia de alérgenos ambientales de interior fue bastante baja, al igual que en los resultados del estudio de Kulig et al. (71). Cuando dividimos esta población en cuatro intervalos de edad de 3 años, encontramos un aumento significativo en la frecuencia de sensibilización a polen de melocotón a medida que aumenta la edad, con más de cuatro veces el valor en el cuarto intervalo comparado con el primero. Esto contrasta con lo que ocurre con el *O. europaea* y *P. pratense*, en la que estas diferencias no eran tan grandes, lo que explica que la sensibilización al olivo y gramíneas comienza antes, pero a partir de los 7-10 años, la sensibilización a polen de melocotonero se va haciendo más prevalente.

La sensibilización a Pru p 9 fue del 30%. Esta proteína pertenece a la familia de las PR-1, que pueden ser inducidas por estrés, como por ejemplo en las infecciones. Art v 2, Cyn d 24 y Cuc m 3, también forman parte de este grupo (72-74). La falta de correlación entre las pruebas cutáneas con polen de melocotonero y Pru p 9, sugiere que existen otros alérgenos involucrados. Nuestro grupo ha identificado varios alérgenos con diferentes pesos moleculares, que podrían estar implicados (58).

La comparación entre el grupo A (*prick test* positivo a polen de melocotón y otros pólenes) y grupo B (*prick test* negativo a polen de melocotón, pero positivo a otros

pólenes), manifestó que los sujetos del grupo A estaban sensibilizados a un mayor número de pólenes ($p < 0.0001$), así como en mayor porcentaje a *C. arizonica*, *S. kali*, *P. acerifolia* y *A. vulgaris*. Necesitamos más estudios para determinar si se debe a la existencia de reactividad cruzada o panalérgenos, especialmente con *C. dactylon* y *A. vulgaris*, como se describió anteriormente, o si estos individuos tienen una mayor capacidad para convertirse en polisensibilizados.

Debido a que la mayoría de los niños estaban sensibilizados y expuestos a varios alérgenos inhalantes, sobre a todo polen de olivo, gramíneas y salsola, la cuestión era poder justificar cómo cada uno de estos pólenes podría contribuir. En la época del año en la que los niños desarrollaron síntomas, los alérgenos más relevantes fueron el polen de olivo y gramíneas. Aunque el polen olivo es el más prevalente en la sensibilización, presentaba una carga baja en nuestra zona (medido con un colector de pólenes en el lugar donde se realizó el estudio), con niveles máximos detectados $< 400 \text{ g} / \text{m}^3$ en la segunda-tercera semana de mayo. Además, según la historia clínica, los meses en que estos niños se vieron más afectados fueron desde principios de marzo hasta finales de junio, que es el período cuando ocurre la floración del melocotonero, con un pico de síntomas en marzo. Incluso de forma significativa, los sujetos del grupo A (sensibilizados a polen de melocotón) referían más síntomas en marzo en comparación con el grupo B. En cuanto a los niveles de polen de *P. pratense* en esta zona, segundo polen más prevalente, la carga que pudimos objetivar también fue baja ($< 40 \text{ g} / \text{m}^3$).

Con respecto al tercer artículo, en la bibliografía revisada, sólo encontramos un trabajo donde el polen de melocotón se consideraba como un agente ocupacional, identificando una banda de 20 kDa que se correspondía con una glutatión S-transferasa (75). En nuestro estudio, se detectaron varias proteínas de alto peso molecular del polen melocotón en los sueros de los participantes, incluyendo una banda de unos 45 kDa que se identificó como una poligalacturonasa, alérgeno muy común de las plantas. La presencia de diferentes alérgenos encontrados comúnmente en otros pólenes prevalentes, podría jugar un papel importante debido al fenómeno de reactividad cruzada.

Como prueba de concepto, se demostró mediante provocación nasal que, tanto el polen de melocotón como Pru p 9, pueden inducir síntomas respiratorios en los trabajadores expuestos. Puesto que los participantes presentaban en la provocación nasal y al manipular el polen de melocotón (58), en los sujetos con Pru p 9 negativa (57%), podríamos atribuirlo a la implicación de otros alérgenos ya mencionados. En los 3 sujetos donde la provocación nasal fue negativa a polen de melocotón, el uso de una concentración subóptima en la prueba podría ser la causa, dado que la historia clínica era muy sugestiva.

Debido a que España es uno de los grandes productores de melocotón del mundo (48,49), este problema puede afectar a un gran número de personas, adquiriendo gran importancia. La posibilidad de diagnosticar a los pacientes con alergia al polen del melocotonero de una forma precisa, además de la posibilidad de mejorar la calidad de vida en las personas implicadas, fue lo que impulsó la realización de este estudio. Debido a que este tema no está lo suficientemente estudiado, los médicos generales y los especialistas suelen tratar este fenómeno de una forma superficial, prescribiendo medicación sintomática sin considerar la causa productora y los posibles beneficios de la

inmunoterapia específica. Además, muchos de los trabajadores no consultan su problema, se automedican o deciden dejar el trabajo.

Los pólenes de árboles frutales, clásicamente, se han considerado no relevantes al asumir que no producen alergia en la población general, afectando sólo a trabajadores en el área de cultivo. Aunque se admite que el polen de melocotonero es pesado, adhesivo y que sólo permanece en el entorno de emisión, no se ha estudiado cuál es su área de propagación y hasta qué distancia puede aerotransportarse desde el foco de origen. Pero sí hemos podido comprobar, con los estudios que componen esta tesis que, en el municipio de Blanca, el polen de melocotón provoca sensibilización y síntomas en la población estudiada en general, no sólo en los casos ocupacionalmente expuestos. Con estos datos podemos inferir que los granos de polen pueden ser transportados por el aire a distancias más largas del foco de producción que las descritas. Otra posibilidad, es que partículas submicrónicas puedan transportar alérgenos de este polen, sensibilizando a niños y otros grupos de la población no expuestos directamente. Esta hipótesis se está verificando actualmente por nuestro grupo en un proyecto en curso, financiado por el Instituto de Salud Carlos III.

7. CONCLUSIONES

1. Presentamos, por primera vez, un estudio sistemático donde hemos demostrado la sensibilización y la relevancia clínica del polen de melocotón en una población bien definida y con una alta exposición a dicho polen, tanto en individuos expuestos (trabajadores) como en no expuestos (niños y adolescentes). La clínica más frecuentemente descrita en estos pacientes fue la rinitis.
2. El polen de melocotón fue el tercero más prevalente en una muestra significativa de niños y adolescentes, sólo superado por el polen de olivo y de gramíneas. Esto nos indica que es un alérgeno a tener en cuenta en las poblaciones expuestas y recomendamos incluirlo en la batería estándar de inhalantes.
3. Cuando estratificamos a los niños y adolescentes en períodos de edad de 3 en 3 años, encontramos un aumento sorprendente en la frecuencia de sensibilización a polen de melocotón a medida que aumenta la edad, con más de cuatro veces el valor en el cuarto estrato comparado con el primero. Su comportamiento fue similar a los pólenes aerotransportados.
4. También hemos comprobado en la población estudiada, la sensibilización y la contribución en la inducción de síntomas de Pru p 9, alérgeno relevante del polen de melocotón identificado por nuestro grupo.
5. Otros alérgenos del polen de melocotón, identificados por nuestro grupo a través de inmunotransferencia, podrían ser los responsables de la clínica respiratoria en los sujetos donde Pru p 9 es negativa.
6. Un estudio y diagnóstico correctos en pacientes alérgicos al polen de melocotón, nos aporta la posibilidad de mejorar la calidad de vida en estos individuos. Además, en estudios posteriores, se valorarán los posibles beneficios del uso de la inmunoterapia específica.

8. COPIA DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULO 1

Título: “Peach tree pollen and Pru p 9 may induce rhinoconjunctivitis and asthma in children”.

Revista: Pediatric Allergy and Immunology

Abstract:

Pollen allergens elicit respiratory symptoms in children and adolescents, with the most important clinical entities being rhinitis and rhinoconjunctivitis, though asthma also occurs. Pollen can be anemophilous or entomophilous, the former being more relevant in allergy. Peach tree pollen can be an important inducer of allergy in regions of peach tree cultivars. Children may visit orchards and become sensitized during the flowering period, experiencing symptoms after exposure (direct contact). Alternatively, children whose parents work in the cultivars can be exposed indirectly to peach tree pollen since it adheres to clothes and can be released at home (indirect contact). We undertook a detailed clinical history plus skin prick testing (SPT) with inhalant, food allergens, peach tree pollen, Pru p 9 and Pru p 3. Nasal provocation test (NPT) was performed with peach tree pollen and Pru p 9. All the children, except case 3, had a positive SPT to different pollens and four to other allergens such as pet dandruff and alternaria. Case 3 was only sensitized to peach tree pollen. Four of the cases were SPT positive to peach tree pollen and Pru p 9. Rhinitis or rhinoconjunctivitis was referred by all, with one also referring asthma after pollen exposure. In all cases challenged with peach tree pollen, a positive response appeared within 15 minutes. Subjects with positive SPT to Pru p 9 also had positive NPT (cases 1-4). We present here for the first time a group of children sensitized to peach tree pollen who developed symptoms after exposure with almost half of them also being allergic to a new allergen (Pru p 9). This indicates that allergy to peach tree pollen and Pru p 9 must be evaluated in exposed children. The identification of other allergens is currently in progress.

URL: <https://doi.org/10.1111/pai.13067>

ARTÍCULO 2

Título: “Peach Tree Pollen and Prunus Persica 9 Sensitisation and Allergy in Children and Adolescents”.

Revista: International Archives of Allergy and Immunology

Abstract:

Background: Although plant and fruit pollens are entomophilous and relevant in exposed workers, we have shown a high frequency of sensitisation and symptoms induction of peach tree pollen (PTP) and Prunus persica 9 (Pru p 9) in adults from areas of peach cultivars. **Methods:** We studied the sensitisation and clinical relevance of PTP and Pru p 9 in a large group of children and adolescents aged 3–19 years. A detailed questionnaire plus skin prick testing to prevalent allergens, PTP, and Pru p 9 were carried out. The clinical relevance was established by nasal provocation test (NPT) and symptom score index. **Results:** We evaluated 685 children (mean age 8.75 ± 3.3 years, median 9 years), 52% of them female. Sensitisation to PTP occurred in 20% of the cases following olive tree (33%) and Phleum pratense (26%). In a randomly selected subgroup of subjects sensitised to PTP, 30% were skin prick test-positive to Pru p 9. Most cases had rhinitis or rhinoconjunctivitis. NPT showed the relevance of PTP and Pru p 9 in the induction of symptoms. **Conclusion:** PTP and Pru p 9 are relevant in the induction of sensitisation and respiratory symptoms in children and adolescents. This allergen should be evaluated in children living in regions of peach tree cultivars.

URL: <https://doi.org/10.1159/000502352>

ARTÍCULO 3

Título: “Prunus persica 9, a new occupational allergen from peach tree pollen involved in rhinitis and asthma”.

Revista: Occupational Environment Medicine

Abstract:

Objectives: Several studies have described peach tree (PT) as an occupational allergen. The aim of this work was to assess the effect of Prunus persica 9 (Pru p 9), a recently identified allergen from PT pollen, in exposed workers. **Methods:** The study included people who reported respiratory symptoms after handling PT in orchards during the flowering period (Blanca village, Murcia region, south-east Spain). After completing a detailed questionnaire, participants underwent skin prick test (SPT) and nasal provocation test (NPT). The IgE response was analysed by SDS-PAGE and immunoblotting assays. **Results:** A total of 21 cases were included (mean age 45 years; 57% women). Most were polysensitized to common pollens, although one person was sensitized only to PT pollen. All cases had a positive SPT to this pollen, and 43% also to Pru p 9. All participants reported having rhinitis, and six participants reported having also asthma. Immunoblotting showed a heterogeneous IgE pattern for several proteins, with Pru p 9 recognised in nine cases. Most participants sensitised to PT pollen and Pru p 9 had positive NPTs, while those who were not sensitised to Pru p 9 tested negative. **Conclusions:** We demonstrate for the first time that Pru p 9, an allergen from PT pollen, can induce respiratory symptoms following occupational exposure. This must be considered a relevant allergen when people working with PT cultivars develop respiratory symptoms.

URL: <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2020-106641>

9. ANEXOS

9.1 - Comunicaciones a congresos derivados de la presente tesis doctoral.

- Victorio Puche L, López-Sánchez D, Blanca-Lopez N, et al. Peach pollen sensitisation is highly prevalent in areas of great extension of peach tree cultivar. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141:AB31. Congreso de la American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI), celebrado en Florida del 2 al 5 de marzo de 2019.
- Somoza ML, Victorio Puche L, Blanca-Lopez N et al. Sensitisation and respiratory symptoms induced by a new allergen from Peach tree pollen in children and adolescents. *Allergy* 2019; Volume 74, Issue S106: 879. Congreso de la European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), celebrado en Lisboa del 1 al 5 de junio de 2019.
- Somoza ML, Victorio Puche L, Martin-Pedraza L et al. Pru p 9 is a new peach tree pollen allergen involved in rhinitis and occupational asthma. *Allergy* 2020; Volume 75, Issue S109: 507. Congreso de la European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), celebrado digitalmente del 6 al 8 de junio de 2020.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (ed.). «Mapa de comarcas». Archivado desde el original el 18 de noviembre de 2011. Consultado el 11 de agosto de 2011.
2. Propuesta de demarcaciones territoriales homologadas, Dirección General de Administración Local, Valencia, D.L. 1988. Consejería de Administración Pública. ISBN 84-7579-587-0.
3. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (ed.). «Comarcas agrarias y municipios de la Región» (pdf). Consultado el 11 de agosto de 2011. (enlace roto disponible en Internet Archive; véase el historial y la última versión).
4. «INE». Consultado el 2 de enero de 2020.
5. Instituto Nacional de Estadística (ed.). «Población, superficie y densidad por municipios.». Archivado desde el original el 21 de septiembre de 2013.
6. Howarth PH. Allergy and nonallergic rhinitis. En: Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FER, eds. Middleton's Allergy principles and practice. 6ª ed. Philadelphia: Mosby Inc; 2003. P. 1391-410.
7. Wuthrich B, Schinler C, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U. Prevalence of atopy and polinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA Study). Swis Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 149-56.
8. Naclerio RM. Allergy rinitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 860-9.
9. Rimpela AH, Savonius B, Rimpela MK, Haatela T. Asthma and allergic rinitis among Finish adolescents in 1977-1991. *Scand J Soc Med* 1995; 23: 60-5.
10. Magnussen H, Jorres R, Howak D. Effect of air pollution on the on the prevalence of asthma and allergy: lessons from de German reunification. *Thorax* 1993; 48: 879-81.
11. Bousquet J, Van-Cauwenbergue P, Khaltsev N, Ait-Khaled N, Annesimaesano I, Bachert C et al. ARIA workshop group. World Health Organization. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma Workshop Report. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: S147-334.
12. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani CE, Bleecker ER, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126: 926-38.
13. CIBERES: Centro de investigación biomédica en red de enfermedades respiratorias. Disponible en: <http://www.ciberes.org/>
14. Carvajal-Urueña I, et al. Variaciones geográficas en la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) fase III España. *Arch Bronconeumol*. 2005; 41: 659-66.
15. Bjornson CL, Mitchell I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gend Specif Med* 2000; 3: 57-61.

16. De Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burnay P. Differences in Incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care* 2000; 162: 68-74.
17. Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 180-7.
18. Tian JW, Chen JW, Chen X. Tiotropium versus placebo for inadequately controlled asthma. A meta-analysis. *Respir Care*. 2014; 59(5): 654-66.
19. GEMA2009. Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA 2009). *Arch Bronconeumol* 2009; 45(Supl 2):1-35 y GEMA 2009 (Spanish guideline on the management of asthma). *J Investig Allergol Clin Immunol*. Spain; 2010; 20(Suppl 1): 1-59.
20. Plaza V, Blanco M, García G, Korta J, Molina J, Quirce S; en representación del Comité Ejecutivo de GEMA. Highlights of the Spanish Asthma Guidelines (GEMA), version 5.0. *Arch Bronconeumol*. 2020 Oct 22;57(1):11–2.
21. Bousquet J, Khaltsev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8-160.
22. Nathan RA, Eccles R, Howarth PH, Steinsvag SK, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:S442-59. 6.
23. Howarth PH, Persson CG, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:S414-41.
24. Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI. Definition and classification of asthma in the workplace. In: Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI, editors. *Asthma in the workplace*, 3rd Edition. 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2006. p. 1-8. 5.
25. Rodrigo MJ, Benavent MI, Cruz MJ, Rosell M, Murio C, Pascual C et al. Detection of specific antibodies to pigeon serum and Bloom antigens by ELISA in pigeon breeder's disease. *Occup Environ Med* 2000; 57: 159-64.
26. Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 321-49.
27. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. Molecular Weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 28: 815-20.
28. Litvyakova L, Baraniuk J. Nasal provocation testing: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 355-65.
29. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012; 67(1): 18-24.

30. Dordal MT, Lluch-Bernal M, Sanchez MC, Rondon C, Navarro A, Montoro J, et al. Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21:1-12.
31. Malm L, Gerth van WR, Bachert C. Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow, and airflow resistance. International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society. *Rhinology* 2000;38:1-6.
32. Gosepath J, Amedee RG, Mann WJ. Nasal provocation testing as an international standard for evaluation of allergic and nonallergic rhinitis. *Laryngoscope* 2005;115:512-516.
33. Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG, et al. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clin Transl Allergy* 2011;1:2-40.
34. Druce HM, Schumacher MJ. Nasal provocation challenge. The Committee on Upper Airway Allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;86:261-264.
35. Melillo G, Bonini S, Cocco G, Davies RJ, De Monchy JG, Frolund 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.
36. Grymer LF, Hilberg O, Pedersen OF, Rasmussen TR. Acoustic rhinometry: values from adults with subjective normal nasal patency. *Rhinology* 1991;29:35-47.
37. Lenders H, Pirsig W. Diagnostic value of acoustic rhinometry: patients with allergic and vasomotor rhinitis compared with normal controls. *Rhinology* 1990;28:5-16.
38. Castano R, Theriault G, Gautrin D, Ghezzi H, Trudeau C, Malo JL. Reproducibility of acoustic rhinometry in the investigation of occupational rhinitis. *Am J Rhinol*. 2007;21:474-477.
39. Zweiman B, Getsy J, Kalenian M, Lane A, Schwartz LB, Doty R, et al. Nasal airway changes assessed by acoustic rhinometry and mediator release during immediate and late reactions to allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:624-631.
40. Lane AP, Zweiman B, Lanza DC, Swift D, Doty R, Dhong HJ, et al. Acoustic rhinometry in the study of the acute nasal allergic response. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105:811-818.
41. Roithmann R, Shpirer I, Cole P, Chapnik J, Szalai JP, Zamel N. The role of acoustic rhinometry in nasal provocation testing. *Ear nose Throat J*. 1997;76:747-50, 752.
42. Miyahara Y, Ukai K, Yamagiwa M, Ohkawa C, Sakakura Y. Nasal passage patency in patients with allergic rhinitis measured by acoustic rhinometry: nasal responses after allergen and histamine provocation. *Auris asus Larynx*. 1998;25:261-267.
43. Michel Latarjet, Alfredo Ruiz Liard; Anatomía humana, 4ta edición, Ed. Medica.

44. Roithmann R, Cole P, Chapnik J, Shpirer I, Hoffstein V, Zamel N. "Acoustic Rhinometry in the Evaluation of Nasal Obstruction". *Laryngoscope* 1995; 105 (3pt1) 275: 81.
45. Garde JM, Marco N, García B. Papel de la rinometría acústica en la exploración de la rinitis alérgica en el niño. Valores de referencia en niños sanos. XXXVI Congreso de la SEICAP 2012.
46. Straszek SP, Moeller A, Hall GL, Zhang G, Stick SM, Franklin PJ. Reference values for acoustic rhinometry in children from 4 to 13 years old. *Am J Rhinol.* 2008;22:285-291.
47. Millqvist E, Bende M. Reference values for acoustic rhinometry in subjects without nasal symptoms. *Am J Rhinol.* 1998;12:341-343.
48. Badenes ML. Situación y tendencias actuales del cultivo de melocotón. *Vida Rural* 2003;45-47.
49. Garrido-Fernández S, García BE, Sanz ML, Ariz S, Tabar A. The role of lipid transfer proteins in the almond tree and almond fruit as contact and airborne allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19:61-36.
50. Alergológica 2005: Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.
51. García BE, Lombardero M, Echechipía S, Olaguibel JM, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Barber D, Salcedo G, Tabar AI. Respiratory allergy to peach leaves and lipid transfer proteins. *Clin Exp Allergy* 2004;34:291-5.
52. Pérez-Calderón R, Gonzalo-Garijo MÁ, Rodríguez-Velasco FJ, , Sánchez-Vega S, Bartolomé-Zavala B. Occupational respiratory allergy in peach crop workers. *Allergy.* 2017 Mar 20. doi: 10.1111/all.13163.
53. Blanca M. Proyecto ISCIII 2018-2020 (PI 17/00615).
54. Aylor DE, Boehm MT, Shields EJ. Quantifying aerial concentrations of maize pollen in the atmospheric Surface layer using remote-piloted airplanes and lagrangian stochastic modeling. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 2006; 45(7): 1003–1015.
55. Aylor DE. Rate of dehydration of corn (*Zea mays* L.) pollen in the air. *J Exp Bot.* 2003; 54(391): 2307–2312.
56. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016 May;27 Suppl 23:1-250.
57. B E García 1, M Lombardero, S Echechipía, J M Olaguibel, A Díaz-Perales, R Sánchez-Monge, D Barber, G Salcedo, A I Tabar. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clin Exp Allergy.* 2004 Feb;34(2):291-5.
58. Blanca M, Victorio Puche L, Garrido-Arandia M, Martín-Pedraza L, Romero Sahagún A, López-Sánchez JD, Galán C, Marin A, Villalba M, Díaz-Perales A, Somoza ML. Pru p 9, a new allergen eliciting respiratory symptoms in subjects sensitized to peach tree

pollen. PLoS One. 2020 Mar 19;15(3):e0230010. Erratum in: PLoS One. 2020 Apr 21;15(4):e0232301.

59. Oeo-Santos C, Mas S, Quiralte J, Colás C, Blanca M, Fernández J, Feo Brito F, Villalba M, Barderas R. A Hypoallergenic Polygalacturonase Isoform from Olive Pollen Is Implicated in Pollen-Pollen Cross-Reactivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;177(4):290-301.

60. Torres M, Palomares O, Quiralte J, Pauli G, Rodríguez R, Villalba M. An Enzymatically Active β -1,3-Glucanase from Ash Pollen with Allergenic Properties: A Particular Member in the Oleaceae Family. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0133066.

61. Barral P, Tejera ML, Treviño MA, Batanero E. Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen, in *Pichia pastoris* yeast: Detection of partial oxidation of methionine by NMR. *Protein Expr Purif*. 2004;37(2):336-43.

62. Ole e 6- like allergen from peach tree pollen that can induce respiratory symptoms in children. Somoza ML, Victorio Puche L, Martin-Pedraza L et al. *Allergy* 2020; Volume 75, Issue S109: 506.

63. Allergen nomenclature WHO/IUIS. [http:// www.allergen.org](http://www.allergen.org).

64. Allergome. <http://www.allergome.org>.

65. Victorio Puche L, López-Sánchez D, Somoza-Alvarez ML et al. Peach pollen sensitisation is highly prevalent in areas of great extension of peach tree cultivar. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;141:AB31.

66. Green BJ, Levetin E, Horner WE, Codina R, Barnes C, Filley WV. Landscape plant selection criteria for the allergic patient. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract*. 2018, 6, 1869–1876.

67. Klingebiel C, Chantran Y, Arif-Lusson R, Ehrenberg AE, Östling J et al. Pru p 7 sensitization is a predominant cause of severe, cypress pollen-associated peach allergy. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(4):526-536.

68. Augé J, Vent J, Agache I, et al. EAACI position paper on the standardization of nasal allergen challenges. *Allergy*. 2018;73:1597-1608.

69. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. Carmen Rondón I, José J Romero, Soledad López, Cristina Antúnez, Enrique Martín-Casañez, Maria J Torres, Cristobalina Mayorga, Rebeca R-Pena, Miguel Blanca. *Allergy Clin Immunol* 2007;119:899.

70. Hilberg O, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recomendations for technical specifications and standard operating procedures. *Rhinology*. 2000; 3-17.

71. Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jun;103(6):1173–9.

72. Arilla MC, Ibarrola I, Puente Y, Daza JC, Martínez A, Asturias JA. Cloning, expression and characterization of mugwort pollen allergen Art v 2, a pathogenesis-related protein from family group 1. *Mol Immunol*. 2007 Jul; 44(15):3653–60.
73. Chow LP, Chiu LL, Khoo KH, Peng HJ, Yang SY, Huang SW, et al. Purification and structural analysis of the novel glycoprotein allergen Cyn d 24, a pathogenesis-related protein PR-1, from Bermuda grass pollen. *FEBS J*. 2005 Dec;272(24):6218–27.
74. Asensio T, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Somoza ML, Rodriguez J, et al. Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):896–9.
75. Jiang N, Yin J, Mak P, et al. Occupational allergy to peach (*Prunus persica*) tree pollen and potential cross-reactivity between rosaceae family pollens. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015;14:483–92.