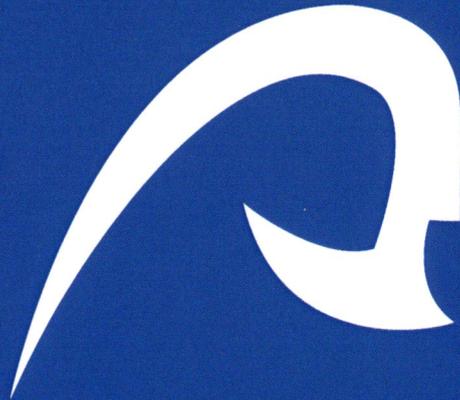


UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS**



TESIS DOCTORAL

**SÍNDROME DE ALERGIA CRUZADA ARTEMISA-MOSTAZA:
ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO**

JAVIER FIGUEROA RIVERO

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
2015**



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

Programa de Doctorado: Avances en Medicina Interna

TESIS DOCTORAL

SÍNDROME DE ALERGIA CRUZADA ARTEMISA-MOSTAZA:

ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO

JAVIER FIGUEROA RIVERO

Dirigida por la Dra. D^a. Teresa Carrillo Díaz

Codirigida por el Dr. D. Carlos Blanco Guerra

El/la Director/a,

El/la Codirector/a

El/la Doctorando/a,

Las Palmas de Gran Canaria, a 30 de octubre de 2015

Agradecimientos:

A mi directora de tesis, la Dra. Teresa Carrillo, por su gran ayuda, resolviendo con premura cualquier consulta, pero sobre todo, por su tesón a la hora de darme ánimos para terminar este proyecto. Sin duda, sin su empuje y aliento no hubiese sido capaz de llegar al final del mismo.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Blanco, por ser el artífice de la idea original así como de la planificación de este trabajo, y por su apoyo a lo largo de toda la realización del mismo.

Al Profesor José María Limiñana, por su disponibilidad y paciencia a la hora de resolverme las dudas estadísticas.

A todo el personal de la Unidad de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, por su colaboración para la realización de este estudio y por los buenos momentos compartidos durante mi estancia allí.

A todo el personal de la Unidad de Alergología del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, por su compañerismo y trabajo diario.

A mis padres, por su esfuerzo para proporcionarme la mejor educación y formación posibles.

A mi mujer, Gelen, y a mis hijas, Lía y Eva, por el tiempo que este trabajo me ha impedido pasar con ellas y por su ánimo, comprensión y apoyo diario.

A mi mujer, mi amiga, mi amor,
".... que todas las lunas sean lunas de miel."

A mis hijas,
sus sonrisas iluminan mi vida.

INDICE

	Página
Índice de Figuras y Tablas.....	9
Lista de abreviaturas.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Reacciones alérgicas: generalidades.....	15
1.1.1. Hipersensibilidad inmediata.....	17
1.1.2. Síntesis de inmunoglobulina E (IgE).....	19
1.1.3. Receptores específicos de la IgE.....	21
1.1.4. Función de los mastocitos, basófilos y eosinófilos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata.....	22
1.1.5. Alérgenos.....	25
1.1.6. Fisiopatología de las reacciones mediadas por IgE.....	26
1.1.6.1. Fase inmediata.....	27
1.1.6.2. Fase tardía.....	27
1.1.6.3. Fase de remodelado.....	27
1.2. Alergia a pólenes.....	28
1.2.1. Polen de <i>Artemisia</i>	31
1.3. Alergia a alimentos.....	35
1.3.1. Concepto y epidemiología.....	35
1.3.2. Clasificación de la alergia a alimentos.....	37
1.3.3. Alérgenos alimentarios.....	38
1.3.3.1. Alérgenos alimentarios de origen animal.....	39
1.3.3.2. Alérgenos alimentarios de origen vegetal.....	40
1.3.4. Clínica de la alergia a alimentos mediada por IgE.....	44
1.3.5. Diagnóstico de la alergia a alimentos.....	46
1.3.6. Tratamiento de la alergia a alimentos.....	48
1.3.6.1. Tratamiento de las reacciones agudas.....	48
1.3.6.2. Tratamiento a largo plazo.....	49
1.4. Alergia a mostaza.....	50
1.5. Reactividad cruzada.....	52
1.5.1. Reactividad cruzada pólenes-alimentos.....	53
1.5.1.1. Síndrome abedul-alimentos vegetales.....	53
1.5.1.2. Síndrome artemisa-apio-especias.....	54

1.5.1.3. Síndrome artemisa-alimentos vegetales en España.	55
1.5.1.4. Otros síndromes pólenes-alimentos vegetales.....	56
1.5.2. Otros síndromes de reactividad cruzada con alimentos.	57
2. HIPÓTESIS.....	61
3. OBJETIVOS.....	65
3.1. Objetivos primarios.....	65
3.2. Objetivos secundarios.....	65
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
4.1. Pacientes.....	69
4.2. Sujetos controles.....	70
4.3. Pruebas percutáneas por punción.....	71
4.4. Pruebas de exposición oral con alimentos.....	75
4.4.1. Enmascaramiento de la salsa de mostaza.....	75
4.4.2. Preparación y aleatorización del doble ciego.....	76
4.4.3. Administración de las preparaciones.....	76
4.5. Pruebas de laboratorio.....	77
4.5.1. IgE total e IgE específicas.....	77
4.5.2. Ensayos de CAP-inhibición.....	78
4.6. Análisis estadístico.....	79
5. RESULTADOS.....	83
5.1. Características generales.....	83
5.1.1. Grupo de alérgicos a artemisa.....	83
5.1.2. Grupo de alérgicos a mostaza.....	86
5.2. Sensibilizaciones a alérgenos inhalados.....	88
5.2.1. Grupo de alérgicos a artemisa.....	88
5.2.2. Grupo de alérgicos a mostaza.....	90
5.3. Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios.....	92
5.3.1. Grupo de alérgicos a artemisa.....	92
5.3.2. Grupo de alérgicos a mostaza.....	96
5.4. Exposición oral controlada en doble ciego.....	100
5.5. Ensayos de CAP-inhibición.....	104
6. DISCUSIÓN.....	111
7. CONCLUSIONES.....	123

8. BIBLIOGRAFÍA	127
9. ANEXO I: Plantilla de recogida de datos.....	149
10. ANEXO II: Protocolo de laboratorio para ensayos de CAP-inhibición.....	155
11. ANEXO III: Publicaciones relacionadas con este trabajo.....	161

Índice de Figuras y Tablas

Página

FIGURAS

Figura I1: Mecanismos patogénicos de la reacción alérgica.....	18
Figura R1: Municipio habitual de residencia del grupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa y del grupo de alérgicos a mostaza.....	85
Figura R2: Grupo de alérgicos a artemisa: sensibilizaciones significativas a alimentos de origen vegetal.....	94
Figura R3: Grupo de alérgicos a artemisa: sensibilizaciones significativas ($p < 0,001$) a alimentos de origen vegetal en subgrupo de alérgicos a mostaza ($n=28$).....	96
Figura R4: Grupo de alérgicos a mostaza: sensibilizaciones significativas ($p < 0,001$) a alimentos de origen vegetal.....	99
Figura R5: Resultados de la prueba de exposición oral controlada doble ciego contra placebo con salsa de mostaza.....	100
Figura R6: Curvas ROC en pacientes sometidos a exposición oral con mostaza controlada doble ciego contra placebo.....	103
Figura R7: Ensayo de CAP-inhibición entre mostaza y artemisa con mezcla de suero de cinco pacientes alérgicos a mostaza.....	104
Figura R8: CAP-inhibición entre mostaza y artemisa con suero individual de los pacientes alérgicos a mostaza números 5, 15, 20, 22 y 37.....	105
Figura R9a: Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia <i>Brassicaceae</i> . Agente inhibidor: mostaza.....	106
Figura R9b: Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia <i>Brassicaceae</i> . Agente inhibidor: artemisa.....	107
Figura R9c: Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia <i>Brassicaceae</i> . Agente inhibidor: <i>Cladosporium herbarum</i>	107

TABLAS

Tabla I1: Mediadores producidos por las células efectoras en reacción de hipersensibilidad mediada por IgE.....23

Tabla MM1: Medicamentos que inhiben los resultados de los prick test: período en el que deben evitarse antes de la prueba.....72

Tabla MM2: Recetas de enmascaramiento de la salsa de mostaza para las provocaciones orales controladas doble ciego contra placebo en pacientes alérgicos a mostaza.....76

Tabla R1: Características generales de los 42 pacientes alérgicos al polen de artemisa.....84

Tabla R2: Características generales de los 38 pacientes alérgicos a mostaza.....87

Tabla R3: Sensibilizaciones a alérgenos inhalados en pacientes alérgicos al polen de artemisa.....89

Tabla R4: Sensibilizaciones a alérgenos inhalados en pacientes alérgicos a mostaza.....91

Tabla R5: Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios en pacientes alérgicos al polen de artemisa.....93

Tabla R6: Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios en pacientes alérgicos a mostaza.....97

Lista de abreviaturas

AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
AUC	Área bajo la curva
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DAG	Dicilglicerina
DE	Desviación estándar
EAACI	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica
FcεRI	Receptor específico de IgE de alta afinidad
FcεRII	Receptor específico de IgE de baja afinidad
FcεRIIA	Receptor de IgE de baja afinidad tipo A
FcεRIIB	Receptor de IgE de baja afinidad tipo B
GLP	Proteínas similares a las germinas
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Subtipo 1 de la inmunoglobulina G
IgG2	Subtipo 2 de la inmunoglobulina G
IgG3	Subtipo 3 de la inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IP₃	Inositol trifosfato
ITAM	Secuencia de activación basada en una tirosina inmunoreceptora
IUIS	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas
LTP	Proteína de transferencia de lípidos
MAP	Proteín-cinasa activada por mitógenos
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1α
nsLTP	Proteína no específica de transferencia de lípidos
PAF	Factor activador de plaquetas
PI-PLCγ	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C
PIP₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PKA	Fosfoquinasa A
PKC	Proteín-cinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A2
POCDCCP	Provocación oral controlada doble ciego contra placebo
POCSCCP	Provocación oral controlada simple ciego contra placebo
PR	Proteína relacionada con la patogénesis
PR-1	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 1
PR-2	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 2

PR-3	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 3
PR-4	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 4
PR-5	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 5
PR-8	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 8
PR-9	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 9
PR-10	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 10
PR-14	Proteína relacionada con la patogénesis tipo 14
RANTES	Citocina quimiotáctica (CCL5) que atrae a células que expresan el receptor CCR5
ROC	Característica operativa del receptor
S	Unidad Svedberg de coeficiente de sedimentación
SAO	Síndrome de alergia oral
SEAIC	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica
TA	Presión arterial
TCD4	Linfocito T cooperador
Th1	Linfocito T cooperador tipo 1
Th2	Linfocito T cooperador tipo 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
WHO	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reacciones alérgicas: generalidades

Las reacciones alérgicas son reacciones de hipersensibilidad. El término hipersensibilidad hace referencia a una excesiva o inadecuada respuesta del sistema inmunitario frente a antígenos ambientales, generalmente no patógenos, produciendo daño a los tejidos propios¹. En 1963 Patrick Gell y Robin Coombs realizaron una clasificación de las reacciones de hipersensibilidad según el mecanismo inmunológico que las produce², que todavía sigue siendo de utilidad hoy en día¹. La clasificación de Gell y Coombs distingue 4 tipos de reacciones de hipersensibilidad²:

- **Tipo I: hipersensibilidad inmediata**, mediada por anticuerpos IgE, con liberación de mediadores de mastocitos y basófilos. La respuesta inmunológica basada en anticuerpos inmunoglobulina E (IgE) es fisiológica en las infecciones por parásitos, pero en los sujetos atópicos se producen respuestas de IgE frente a distintos antígenos no parasitarios que habitualmente inducen respuestas tipo inmunoglobulina G (IgG) en los individuos sanos³. Los sujetos atópicos son aquellos que presentan una predisposición genética a presentar este tipo de reacciones IgE mediadas debido a múltiples factores, entre ellos una capacidad aumentada para la producción de IgE.

- **Tipo II: hipersensibilidad citotóxica**, mediada por anticuerpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3) o inmunoglobulina M (IgM), con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos e intervención del complemento y de células fagocíticas. Algunas revisiones la subdividen en dos tipos según el mecanismo patogénico: la IIa, que se caracteriza por reacciones citolíticas (activación de la vía clásica del complemento-opsonización y fagocitosis-citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos); y la IIb, que se caracteriza porque los anticuerpos actúan inhibiendo o estimulando receptores de la superficie celular alterando así su función^{3,4}.

- **Tipo III: hipersensibilidad por inmunocomplejos** mediada por anticuerpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3) o IgM, con depósito de inmunocomplejos e intervención del complemento y de los leucocitos. Puede dar lugar a inmunocomplejos que precipitan localmente (fenómeno de Arthus) o a inmunocomplejos circulantes que se depositan a distancia (enfermedad del suero)³.

- **Tipo IV: hipersensibilidad retardada** mediada por células (linfocitos T y macrófagos) con citotoxicidad e intervención de citocinas. Este tipo de reacciones tiene una función fisiológica contra organismos patógenos intracelulares, pero a veces pueden provocar reacciones tisulares que tardan en aparecer más de 12 horas tras la exposición al antígeno. Algunos autores han diferenciado 4 subtipos¹:
 - Tipo IVa: mediada por linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) CD4+ y macrófagos activados, causando las reacciones clásicas de dermatitis de contacto o reacción tuberculínica.

 - Tipo IVb: mediada por linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) CD4+ y sus citocinas, interleucinas 4, 5 y 13 (IL-4, IL-5, IL-13), dando lugar a una hipersensibilidad eosinofílica crónica como ocurre en algunos casos de rinitis y asma.

 - Tipo IVc: mediada por células citotóxicas CD8+, que provocan apoptosis de los queratinocitos, con la participación del ligando Fas, perforina y granzima B. Esto ocurre en algunas enfermedades como el síndrome de Stevens-Johnson o la necrólisis epidérmica tóxica.

 - Tipo IVd: con la implicación de linfocitos CD4+ y CD8+, neutrófilos, interleucina 8 (IL-8) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), produciendo reacciones pustulares exantemáticas.

1.1.1. Hipersensibilidad inmediata

En las reacciones de hipersensibilidad inmediata o reacciones mediadas por IgE se produce una secuencia típica de acontecimientos que comienzan con la exposición a un antígeno, seguida de la activación de linfocitos Th2 específicos para dicho antígeno, estimulando la síntesis de anticuerpos IgE específicos y la unión de estos anticuerpos a los receptores específicos de alta afinidad FcεRI^{5,6} de los mastocitos. Posteriormente, tras una re-exposición al antígeno, se produce la activación de estos mastocitos, mediante el puenteo por dicho antígeno de dos moléculas de IgE unidas al receptor FcεRI, dando lugar a la liberación de mediadores pro-inflamatorios que inducen una respuesta patológica⁷⁻⁹ (Figura I1).

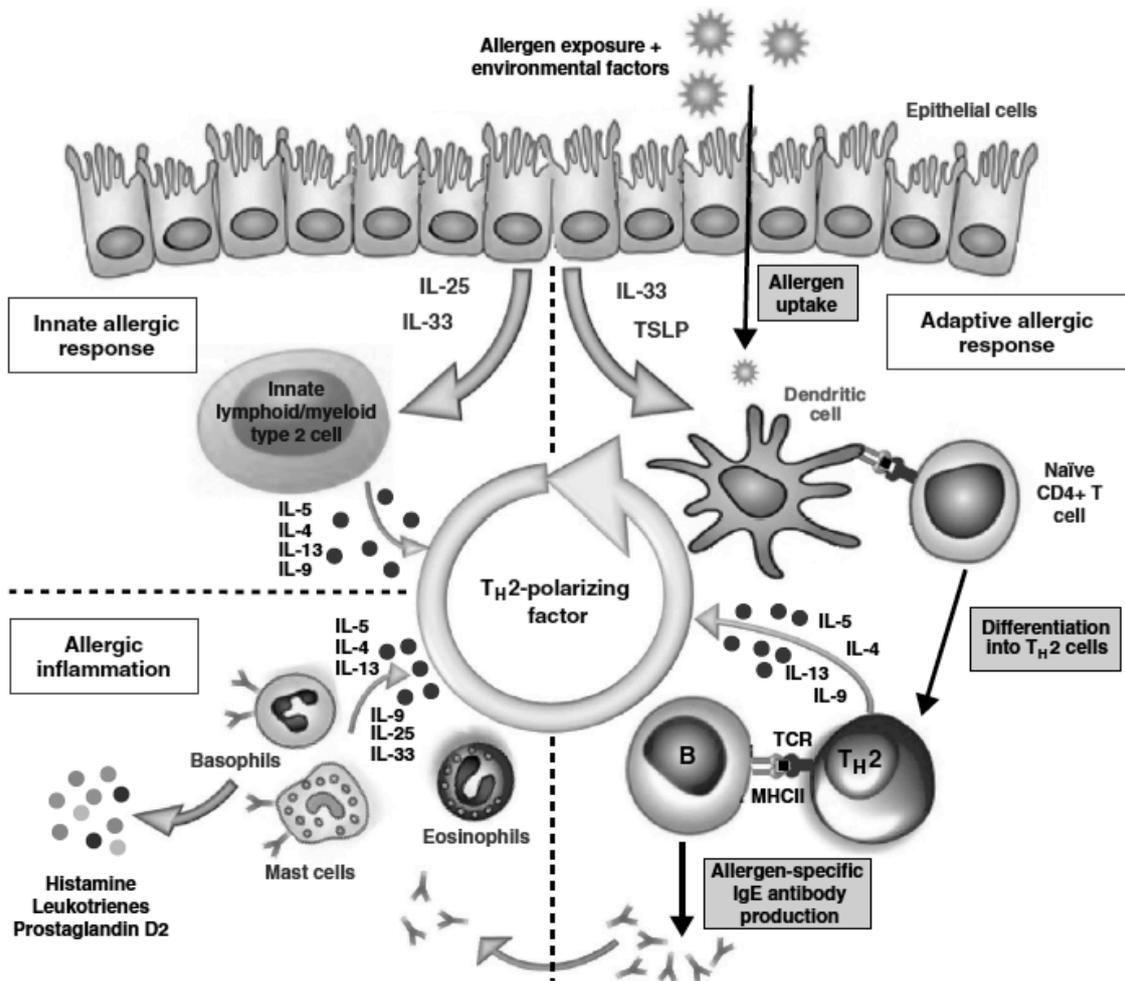
Esta respuesta patológica comprende una serie de cambios y manifestaciones clínicas, que se fundamentan en una reacción vascular y del músculo liso, que aparecen con gran rapidez tras la exposición al antígeno; y en una reacción tardía que es básicamente de carácter inflamatorio^{7,8}.

La unión del anticuerpo IgE específico a los mastocitos se conoce como sensibilización. Existe una importante predisposición genética a presentar reacciones de hipersensibilidad inmediata. Los antígenos que desencadenan este tipo de reacciones, conocidos como alérgenos, suelen ser proteínas y sustancias químicas habituales en nuestro medio ambiente. Los sujetos normales no suelen producir anticuerpos IgE específicos, ni presentar reacciones patológicas cuando se exponen a dichos antígenos, como sí ocurre en personas con predisposición genética⁷, que son los sujetos atópicos.

La liberación de los mediadores va a dar lugar a una vasodilatación con aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, agregación de plaquetas, infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos, aumento de la secreción de moco y estimulación de nervios sensitivos. Según el órgano que se afecte, estos cambios pueden producir distintas manifestaciones clínicas: en la piel ocasiona eritema, habones, angioedema y prurito; en los bronquios causa broncoespasmo y aumento de la secreción de moco; y en el tracto digestivo produce diarreas y vómitos. Cuando los mediadores se liberan de forma generalizada, implicando a más de dos órganos, se produce una afectación sistémica o anafilaxia.

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata dependen de la activación de los linfocitos Th2 y de las citocinas producidas por ellos, a diferencia de la hipersensibilidad retardada, que es la clásica reacción inmunitaria mediada fundamentalmente por linfocitos Th1.

Figura I1: Mecanismos patogénicos de la reacción alérgica



Wambre E. *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:700–706

1.1.2. Síntesis de inmunoglobulina E (IgE)

La inmunoglobulina E (IgE) fue identificada como tal en 1966 por Ishizaka¹⁰⁻¹⁴, aunque previamente ya se había descrito su existencia en 1921 como un "factor transferible en el suero"¹⁵ y un poco más tarde como "reagina atópica"¹⁶. Tiene una estructura similar al resto de inmunoglobulinas, se presenta como un monómero con dos cadenas ligeras, kappa (κ) y lambda (λ). Se distingue de las otras inmunoglobulinas en las dos cadenas pesadas epsilon (ϵ), y en que su concentración plasmática es sensiblemente inferior.

Los sujetos atópicos sintetizan grandes cantidades de IgE en respuesta a alérgenos ambientales, a diferencia de los sujetos normales que suelen sintetizar otros isotipos de inmunoglobulinas (IgM o IgG) y sólo pequeñas cantidades de IgE. La regulación de la síntesis de IgE depende de la tendencia de cada individuo a desarrollar una respuesta Th2 frente a los alérgenos, debido a que son las citocinas Th2 las que estimulan un cambio de isotipo de cadena pesada en los linfocitos B hacia IgE. La base genética de esta predisposición a sintetizar IgE se encuentra influenciada por varios genes¹⁷ mediante un patrón multigénico de transmisión autosómica que involucra a múltiples cromosomas. Las manifestaciones de atopia pueden presentarse en distinto grado en los miembros de una misma familia, presentando generalmente concentraciones plasmáticas elevadas de IgE¹⁸.

En la síntesis de IgE influyen tres factores fundamentales: la naturaleza de los alérgenos, la activación de los linfocitos Th2 y la activación de los linfocitos B.

La **naturaleza de los alérgenos** influye en la síntesis de IgE, pero no está claro por qué algunos antígenos inducen respuestas Th2 (alérgenos) y otros no. Hay dos características de los alérgenos que podrían explicarlo, por un lado las personas están expuestas a ellos de forma repetida y, por otro lado, no estimulan la respuesta inmunitaria innata (activación de macrófagos por microorganismos con secreción de interleucinas 12 y 18 -IL-12, IL-18-, inductoras de respuesta Th1). Esta activación crónica o repetida de los linfocitos T, junto con la ausencia de inmunidad innata puede estimular a los linfocitos TCD4 hacia la vía Th2, a través de la síntesis de IL-4, principal inductora de linfocitos Th2. Otra característica de los alérgenos es su naturaleza química, ya que muchos de ellos tienen rasgos comunes, como son su relativo bajo peso molecular, la alta solubilidad en líquidos corporales y la glicosilación. Es posible que estos rasgos protejan a dichos antígenos de la desnaturalización y degradación en el aparato digestivo,

permitiendo la absorción como molécula intacta de los alérgenos alimentarios. Por su parte, los antígenos independientes de células T, como los polisacáridos, precisan unirse a proteínas del huésped para formar conjugados hapteno-portador que estimulen la síntesis de IgE y la activación de mastocitos⁷.

La síntesis de IgE depende también de la **activación de los linfocitos TCD4 cooperadores**. Las células dendríticas de los tejidos donde penetra el alérgeno actúan como APC (células presentadoras de antígeno), capturan el antígeno, lo transportan a ganglios linfáticos, lo procesan y lo presentan como péptidos a los linfocitos T, que se diferencian a una subpoblación Th2 de células efectoras que estimulan el cambio hacia la síntesis de IgE por parte de los linfocitos B, sobre todo mediante la secreción de IL-4 y bajo la influencia del ligando CD40 de los Th2. Los Th2 también juegan un papel en otras fases de las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE, a través de la IL-5 estimulan a los eosinófilos y a través de la IL-13 a las células epiteliales para que secreten mayor cantidad de moco. Los sujetos atópicos tienen un mayor número de linfocitos secretores de IL-4 y de linfocitos específicos para los alérgenos circulantes, y además estos linfocitos T específicos secretan más IL-4 por célula respecto a las personas no atópicas. Además los Th2 también contribuyen a la inflamación en la reacción tardía (expresan receptores de quimiocinas CCR4 y CCR8)⁷.

Como ya se ha descrito, los linfocitos Th2 bajo la influencia del ligando CD40 y de distintas citocinas (sobre todo IL-4), estimulan la **activación de los linfocitos B específicos**, produciendo un cambio de isotipo de cadena pesada y la síntesis de IgE. La IgE circula como anticuerpo bivalente con una concentración plasmática normal < 1 µg/ml, pero en determinadas situaciones patológicas como infección por helmintos o atopia grave, dicha concentración se puede elevar hasta >1000 µg/ml⁷.

La IgE específica se une a los receptores de los mastocitos tisulares que pasan a estar sensibilizados. También puede unirse a basófilos y eosinófilos.

1.1.3. Receptores específicos de la IgE

Los anticuerpos IgE se unen a receptores de alta afinidad específicos para las cadenas pesadas ϵ , Fc ϵ RI, que se expresan en mastocitos, basófilos y eosinófilos, así como en células de Langerhans de la epidermis, y también en algunos macrófagos dérmicos y en monocitos activados^{19,20}.

Esta alta afinidad del receptor Fc ϵ RI por la IgE implica que, aunque la concentración plasmática de IgE es baja en comparación con otras inmunoglobulinas, es suficiente para ocupar dichos receptores, y también explica que sujetos sanos presenten mastocitos recubiertos de IgE unida al Fc ϵ RI²¹. En individuos atópicos, una parte de esta IgE unida a los receptores Fc ϵ RI de mastocitos es específica para uno o varios alérgenos y se encuentra en cantidad suficiente para que la exposición a estos alérgenos produzca la activación de las células.

El Fc ϵ RI de la IgE está formado por²²:

- una cadena α en el extremo N-terminal extracelular con dos dominios de tipo de inmunoglobulina, que es el lugar de unión para la IgE.
- una cadena β que cruza la membrana en 4 ocasiones (4 dominios transmembrana) y que posee una única secuencia de activación basada en una tirosina inmunoreceptora (ITAM) en el extremo C-terminal citoplasmático.
- dos cadenas γ idénticas, unidas por enlaces disulfuro que son homólogas a la cadena ζ del complejo del receptor de antígeno del linfocito T. Cada cadena γ tiene una secuencia ITAM en la región citoplasmática C-terminal.

Se ha identificado un segundo receptor para la IgE, el llamado receptor de baja afinidad, Fc ϵ RII²³, que presenta dos isoformas: el Fc ϵ RIIA, que es específico de linfocitos B, y el Fc ϵ RIIB o CD23, que se expresa en linfocitos B, monocitos, eosinófilos, macrófagos, plaquetas, células dendríticas foliculares, y células de Langerhans como respuesta a la IL-4. Las funciones de este receptor de baja afinidad están relacionadas con la regulación de la síntesis de IgE²⁴.

1.1.4. Función de los mastocitos, basófilos y eosinófilos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata

Los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos son células efectoras de la respuesta de hipersensibilidad inmediata o mediada por IgE, que se caracterizan por tener gránulos citoplasmáticos donde almacenan mediadores inflamatorios preformados (Tabla I1) que se liberan de forma inmediata tras la activación celular por la unión del alérgeno y por entrecruzamiento con dos anticuerpos IgE específicos unidos a los FcεRI de la membrana de dichas células⁷⁻⁹.

Todos los progenitores de los mastocitos se encuentran en la médula ósea, desde donde migran a los tejidos para diferenciarse *in situ*, de modo que, en condiciones normales, no hay mastocitos circulantes²⁵. Estas células tienen una forma variable, con núcleo redondo y citoplasma con cuerpos lipídicos y gránulos con membrana (contienen proteoglicanos ácidos que se tiñen con colorantes básicos)^{7,25}. En la superficie del mastocito existen más de 300.000 receptores de alta afinidad FcεRI, bastando con que apenas se puenteen 20 de ellos para producir la activación de la célula. Se han identificado hasta la fecha dos subpoblaciones de mastocitos^{26,27}, una en el tejido conectivo (piel y submucosa intestinal), con gránulos que contienen proteasas como triptasa, quimasa, carboxipeptidasa y catepsina G; y otra en las mucosas (alvéolos y mucosa intestinal), con gránulos que solo contienen una proteasa, la triptasa. Los mastocitos tienen preferencia por localizarse cerca de vasos sanguíneos y de nervios, a nivel subepitelial y en órganos linfáticos.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la unión del alérgeno con dos moléculas de IgE, fijadas a la membrana del mastocito o basófilo a través del receptor de alta afinidad FcεRI, produce la activación celular, originando tres tipos de respuestas biológicas: la secreción del contenido preformado de los gránulos por exocitosis, la síntesis y secreción de mediadores lipídicos, y la síntesis y secreción de citocinas (Tabla I1).

Tabla I1. Mediadores producidos por las células efectoras en reacción de hipersensibilidad mediada por IgE

		Mediadores	Función
Mastocitos y basófilos	Preformados*	Histamina	Aumento de permeabilidad vascular y contracción de músculo liso
		Proteasas neutras (triptasa y quimasa), hidrolasas ácidas, captesina G, carboxipeptidasa	Degradación de estructuras microbianas, lesión/remodelado del tejido
	Lipídicos**	Prostaglandina D ₂	Vasodilatación, broncoconstricción, quimiotaxis de neutrófilos
		Leucotrienos C ₄ ,D ₄ ,E ₄	Broncoconstricción prolongada, secreción de moco, aumento de permeabilidad vascular
		Factor activador de plaquetas	Quimiotaxis y activación de leucocitos, broncoconstricción, aumento de permeabilidad vascular
	Citocinas**	IL-3	Proliferación de mastocitos
		TNF- α , MIP-1 α	Inflamación/reacción fase tardía
		IL-4, IL-13	Diferenciación de Th2
		IL-5	Producción y activación de eosinófilos
	Eosinófilos	Preformados*	Proteína básica principal, proteína catiónica eosinófila
Peroxidasa eosinófila, hidrolasas lisosómicas, lisofosfolipasa			Degradación de paredes celulares de helmintos y protozoos, lesión/remodelado del tejido
Lipídicos**		Leucotrienos C ₄ ,D ₄ ,E ₄	Broncoconstricción prolongada, secreción de moco, aumento de permeabilidad vascular
		Lipoxinas	Inflamación
Citocinas**		IL-3, IL-5, GM-CSF	Producción y activación de eosinófilos
		IL-8, IL-10, RANTES, MIP-1 α , eotaxina	Quimiotaxis de leucocitos

* Almacenados en los gránulos citoplasmáticos.

** Sintetizados cuando se activa la célula

IL: interleucina; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (CCL3); GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; RANTES: citocina quimiotáctica (CCL5) que atrae a células que expresan el receptor CCR5.

La tirosina cinasa Lyn es una enzima que está asociada de manera constitutiva a la cola citoplasmática de la cadena β del Fc ϵ RI, y sólo cuando el alérgeno se une a dos moléculas de IgE y forma enlaces cruzados con el Fc ϵ RI, esta enzima fosforila a las ITAM de los dominios citoplasmáticos de las cadenas β y γ . Posteriormente, las ITAM de las cadenas γ atraen a la tirosina cinasa Syk, que se activa y, a su vez, fosforila y activa a otras proteínas de la cascada de señalización, formando un complejo de señalización multicompetente^{7,8}.

Una de las enzimas atraídas por este complejo es la isoforma γ de una fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC γ), que también es fosforilada y activada para catalizar la degradación de la fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) de la membrana en inositol trifosfato (IP₃) y dicilglicerina (DAG). La IP₃ aumenta el calcio intracelular, lo que unido a la acción de la DAG, activa a la proteína-cinasa C (PKC), que fosforila las cadenas ligeras de miosina, lo que da lugar a la separación de los complejos actina-miosina presentes bajo la membrana plasmática. De este modo, se produce la fusión de la membrana de los gránulos con la membrana plasmática, por interacciones entre proteínas asociadas a ambas membranas, produciéndose la **liberación de mediadores preformados de los gránulos por exocitosis** (Tabla I1). Los enlaces cruzados del alérgeno con el Fc ϵ RI también activan a la adenilato ciclasa, a través de una proteína heterotrimérica de unión al citoplasma, lo que da lugar a un aumento del cAMP (adenosín monofosfato cíclico), que activa a la fosfocinasa A (PKA), que a su vez inhibe la degranulación, constituyendo así un bucle de retroalimentación negativa^{7,8}.

La **síntesis de mediadores lipídicos** está regulada por la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) del citoplasma, que se activa por dos señales, por el aumento de calcio intracelular y por la fosforilación catalizada por una MAP (proteín-cinasa activada por mitógenos), que a su vez es activada por la cascada de reacciones que se inician con la activación de las ITAM. La PLA₂ activada hidroliza fosfolípidos de membrana, que liberan diversas sustancias que, por cascadas enzimáticas, se transforman en los mediadores definitivos (Tabla I1). El sustrato más importante es el ácido araquidónico, que da lugar a distintos mediadores, vía ciclooxigenasa (prostaglandinas) o vía lipooxigenasa (leucotrienos y lipoxinas)⁷.

La activación del mastocito produce también la **síntesis de citocinas**, mediante una inducción de la transcripción del gen de la citosina. Estos factores de transcripción estimulan la síntesis de varias citocinas (Tabla I1), pero no la de interleucina 2 (IL-2), a diferencia de lo que sucede en los linfocitos T.

Es importante recordar que en las reacciones alérgicas, además de los mastocitos, basófilos y eosinófilos, también intervienen otras células, como linfocitos B, linfocitos T y células dendríticas, así como otros mediadores inflamatorios producidos por estas células⁷.

1.1.5. Alérgenos

Un alérgeno es un antígeno capaz de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en sujetos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas (atópicas). La mayoría de los alérgenos son proteínas o glicoproteínas, que tras una primera exposición inducen la formación de IgE específica, lo que se denomina sensibilización. Tras una segunda exposición, se produce la cascada de reacciones que hemos visto que terminan dando lugar a las diversas manifestaciones clínicas. Existen alérgenos que son capaces de producir una reacción alérgica tras la primera exposición, en sujetos previamente sensibilizados a alérgenos homólogos de otras fuentes biológicas, lo que se explica por un mecanismo de reactividad cruzada, que explicaremos con detalle más adelante, y cuya base fundamental es el reconocimiento de alérgenos de distintas especies por una única molécula de IgE. Recientemente también se han identificado alérgenos carbohidratos.

El mecanismo de exposición al alérgeno puede ser por inhalación (alérgenos inhalados), por ingestión (alérgenos alimentarios o medicamentos), por inyección (alérgenos presentes en venenos de insectos o medicamentos) o por contacto con piel o mucosas (alérgenos del látex, de medicamentos, de alimentos o de animales).

Los alérgenos inhalados acceden al organismo transportados por partículas volátiles y son, en general, partículas pequeñas con un peso molecular que varía entre 10 y 60 kDa, y un diámetro entre 2 y 60 μm . Gracias a su pequeño tamaño y su alta solubilidad en medio acuoso, se facilita su liberación desde las partículas inhaladas cuando llegan a las vías respiratorias, y son capaces de atravesar la barrera epitelial y entrar en contacto con las células presentadoras de antígeno. El tamaño de las partículas volátiles (heces, esporas, polen) determina el tiempo de permanencia en el aire del alérgeno, así las partículas menores (5-10 μm) están en suspensión más tiempo que las partículas mayores (10-40 μm)²⁸. Podemos distinguir entre alérgenos inhalados de interior o exterior. Los de interior están representados, sobre todo, por alérgenos de origen animal (ácaros del polvo,

cucarachas y otros insectos, perro, gato, roedores, caballos, vacas, etc.), y algún hongo que crece en zonas húmedas de las viviendas (*Alternaria alternata* o *Aspergillus fumigatus*); mientras que los de exterior están representados, sobre todo, por alérgenos de origen vegetal (pólenes de gramíneas, árboles y malezas) y por distintas especies de hongos.

En general, los alérgenos alimentarios producen clínica tras la ingestión del alimento, aunque a veces también se puede producir tras inhalación del vapor de cocción del alimento, por aerosolización del alérgeno, o por simple contacto con la piel. Los alérgenos presentes en los alimentos se pueden ver modificados por procesos de manufacturación o por la preparación del alimento, o por la exposición al pH ácido y a los enzimas hidrolíticos en la digestión. Por ello, la mayoría de los alérgenos alimentarios causantes de clínica, suelen ser resistentes a la acidez y a las proteasas del estómago.

Algunos alérgenos son denominados alérgenos ocupacionales porque producen alergia debido a una elevada y continua exposición durante el trabajo.

Dentro de una misma fuente alérgica se distinguen alérgenos mayoritarios y minoritarios en función de su frecuencia de reconocimiento, de modo que los alérgenos mayoritarios son aquellos capaces de fijar IgE en al menos un 50% de los pacientes sensibilizados a dicha sustancia y los alérgenos minoritarios son aquellos que se unen a la IgE en menos del 50% de dichos sujetos.

Existen múltiples alérgenos identificados, y continuamente se identifican otros nuevos, por lo que son útiles las bases de datos internacionales donde se recogen todos ellos. El Sub-Comité de Nomenclatura de Alérgenos de la Organización Mundial de la Salud y de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/IUIS), mantiene y actualiza periódicamente, un listado de alérgenos que se puede consultar en www.allergen.org.

1.1.6. Fisiopatología de las reacciones mediadas por IgE

Tras la segunda exposición al alérgeno, su interacción con dos moléculas de IgE unidas al FcεRI activa a mastocitos y basófilos, con la liberación de mediadores inflamatorios que van a ser los responsables de las manifestaciones clínicas posteriores, así como de fenómenos de reclutamiento celular que perpetuarán la

reacción. Esta reacción consta de dos fases, la inmediata y la tardía, que pueden producirse de forma secuencial o quedar limitada a una de ellas. Además, tras la reacción inflamatoria puede producirse la reparación o remodelado⁷.

1.1.6.1. Fase inmediata

Es la que comienza de manera inmediata o en pocos minutos tras la exposición al alérgeno y es, fundamentalmente una fase de vasodilatación y edema, consecuencia de la activación de los mastocitos tisulares, que liberan mediadores preformados (histamina, proteasas como la triptasa, hidrolasas ácidas y factores quimiotácticos), así como mediadores sintetizados de *novo* (como prostaglandinas, cistenil-leucotrienos, PAF –factor activador de plaquetas- y citocinas). También se pueden activar macrófagos, linfocitos T locales y otras células, que también sintetizan mediadores como citocinas y factores quimiotácticos que reclutan células inflamatorias. En la etapa final de esta fase puede aparecer un infiltrado inflamatorio rico en neutrófilos y con escasos eosinófilos.

1.1.6.2. Fase tardía

Posteriormente, se produce un infiltrado inflamatorio con presencia de eosinófilos que pueden ocasionar una fase inflamatoria tardía sin que exista una nueva exposición al alérgeno y que ocurre entre 2 y 24 horas después de la exposición inicial. En este infiltrado ya predominan los eosinófilos y los linfocitos Th2, con escasa participación de otras células como basófilos y neutrófilos. Para la formación de este infiltrado tardío no es imprescindible que se produzca previamente la fase inmediata, de modo que puede aparecer de forma secuencial tras ella o bien en su ausencia.

1.1.6.3. Fase de remodelado

Es aquella en la que se repara el tejido dañado tras el proceso inflamatorio. No siempre existe y fue descrita por primera vez en el asma, produciéndose también en la vía aérea superior y, probablemente, en todos los tejidos que sufran la reacción alérgica. Distintas citocinas y factores de crecimiento derivados de eosinófilos, linfocitos T y células locales, producen aumento del músculo liso, engrosamiento de la membrana basal, depósito de matriz intercelular y formación de vasos sanguíneos (angiogénesis). En ocasiones, se produce una reparación inadecuada que conlleva una alteración permanente del tejido original.

1.2. Alergia a pólenes

En 1873 Charles Blackley²⁹ describe por primera vez que la fiebre del heno era causada por inhalación de pólenes de gramíneas. Además, describió la utilidad de las pruebas cutáneas para el diagnóstico de dicha enfermedad y desarrolló varios tipos de colectores de pólenes. Desde entonces, se han identificado múltiples especies de pólenes pertenecientes a distintas familias, capaces de inducir una respuesta clínica por un mecanismo IgE mediado (polinosis).

En gran parte de España, los pólenes están considerados como la primera causa de rinitis y asma alérgicas, a diferencia de Canarias, donde los ácaros del polvo son los responsables más frecuentemente implicados³⁰. En la España seca de clima continental, que corresponde a más de 2/3 de la península, la escasa humedad relativa condiciona una menor presencia de ácaros del polvo, existiendo sin embargo, una mayor incidencia atmosférica de polen de gramíneas.

Los alérgenos de los pólenes que inducen rinoconjuntivitis y asma proceden, sobre todo, de árboles y plantas que polinizan a través del aire (polinización anemófila), y con mucha menos frecuencia, de aquellas que lo hacen a través de insectos (polinización entomófila). Los pólenes alergénicos varían en función de la vegetación y el clima en cada región. De manera general, los pólenes de árboles son los predominantes en invierno y al principio de la primavera, los de gramíneas durante la primavera, y los de malezas en verano y otoño. En España, los pólenes más importantes causantes de polinosis son de árboles: cipreses de enero a marzo, abedul en abril (macizo galaico), *Platanus hispánica* en marzo-abril y olivo de abril a junio; de gramíneas de abril a junio; y de malezas: *Parietaria* de abril a julio y *Chenopodium* de julio a septiembre.

Teniendo en cuenta las áreas geográficas, las gramíneas son la primera causa de polinosis en centro y norte peninsular, el olivo en el sur (Jaén, Sevilla, Córdoba y Granada), la *Parietaria* en las regiones costeras mediterráneas (Barcelona, Murcia y Valencia), y el *Chenopodium* y *Salsola* en zona mediterránea y centro.

En Canarias, como ya se ha mencionado, la alergia a pólenes no es tan frecuente, y este es quizás el motivo por el que no existen demasiados trabajos publicados al respecto, implicándose pólenes de gramíneas, *Parietaria*, *Plantago* y *Artemisia* en algunos estudios³¹. Existen además, grandes diferencias entre las

distintas islas, tanto en la orografía como en la flora, e incluso, grandes variaciones climáticas dentro de una misma isla, como hace referencia el eslogan “*Gran Canaria, continente en miniatura*”. Por otro lado, actualmente sólo se realizan recuentos de pólenes en las islas de Gran Canaria y de Tenerife. Todo esto hace difícil obtener conclusiones acerca del verdadero impacto de la polinosis en nuestra Comunidad.

Desde el punto de vista del manejo terapéutico, son importantes las medidas de evitación, basadas principalmente en mantenerse, durante el pico de polinización, el mayor tiempo posible en el interior de las viviendas, con las ventanas cerradas, siendo útil el uso de aire acondicionado con filtros. En la mayoría de los casos, hay que recurrir a medicación sintomática y/o inmunoterapia para prevenir y controlar los síntomas. Es importante recordar que la inmunoterapia específica con alérgenos es el único tratamiento eficaz para modificar el curso natural de la enfermedad alérgica³².

Parece evidente la importancia de identificar qué pólenes son responsables de clínica respiratoria en cada localidad, a la hora de manejar dichos síntomas en los pacientes afectados. Para ello, es necesario realizar un recuento polínico mediante la instalación de colectores.

Desde los primeros colectores de pólenes descritos por Blackley²⁹, un porta untado con vaselina colocado verticalmente en una veleta, hasta hoy, se han desarrollado múltiples dispositivos con este fin. En 1946 Durham³³ desarrolla un método gravimétrico que consiste en colocar un porta horizontal con un medio de impacto donde quedan atrapados los pólenes por deposición gravimétrica. Este método tenía dos inconvenientes: su eficiencia de captación era buena para recoger partículas mayores de 20 μm , pero mala para esporas y pólenes pequeños; y al aumentar la velocidad del viento, disminuía la deposición de partículas.

En 1957, en Estados Unidos, se desarrolla el primer colector *Rotorod*®, un captador volumétrico todavía muy usado en ese país, y que también presenta dos inconvenientes: eficiencia pobre de captación para partículas menores a 10 μm ; y disminución de capacidad de captación con el paso del tiempo, según se van almacenando las partículas en los brazos giratorios³⁴.

Para dar respuesta a estos inconvenientes, en 1952, Hirst³⁵ desarrolló el primer método volumétrico con aspiración, con el que se conoce exactamente el

volumen de aire examinado, presenta buena eficiencia para captación de partículas pequeñas ($< 10 \mu\text{m}$) y su capacidad de captación no disminuye con el tiempo. Basado en este método, aparece en los años 70 el *Burkard seven day volumetric spore-trap*®, que consta de una cámara de admisión de aire con un débito de 10 litros por minutos, a través de una hendidura que tiene 14 mm de largo por 2 mm de ancho, y que está siempre en dirección al viento, gracias a que va montado sobre una veleta. La fuente de aire aspirado se enfrenta a una cinta transparente, que previamente se unta con vaselina colocada en un tambor. La hendidura está muy próxima a la cinta (0,6 mm), de modo que la mayoría de partículas $> 1 \mu\text{m}$ impactan sobre la capa de vaselina. La cinta se desplaza a una velocidad de 2 mm/hora durante un máximo de 7 días seguidos. Aunque éste es el colector todavía más usado en España, existen modelos más modernos de la misma casa comercial.

Una muestra representativa del recuento de pólenes de los distintos colectores distribuidos en España, es recogida por el Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), en la página web www.polenes.com.

En Gran Canaria, actualmente, se recogen datos de dos colectores de pólenes, los dos del tipo *Burkard seven day volumetric spore-trap*® descrito más arriba. Uno de ellos, está colocado en la ciudad de Las Palmas de Gran Canaria, en concreto, en la azotea del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, y está instalado desde el año 2012. Los recuentos de pólenes observados en este colector son muy bajos, con discretos picos ocasionales en mayo de *Poaceae* (inferiores a 30 granos/ m^3 de media diaria) y de *Olea* (único polen que en alguna ocasión aislada ha presentado un pico cercano a los 100 granos/ m^3 de media diaria). El otro colector se ha instalado recientemente en el municipio de Firgas, en noviembre de 2014. Sin embargo, en estos pocos meses, destacan pólenes de *Betulaceae*, en los meses de abril y mayo, con picos de hasta 219 granos/ m^3 de media diaria; pólenes de *Poaceae*, sobre todo en mayo, con valores de hasta 307 granos/ m^3 de media diaria; y pólenes de *Artemisia*, fundamentalmente en junio, con máximos de 191 granos/ m^3 de media diaria. Otras familias de pólenes observados con recuentos mayores a 50 granos/ m^3 , han sido *Cupressaceae* en marzo y abril, *Platanaceae* en abril, y *Olea* en mayo.

1.2.1. Polen de *Artemisia*

El género *Artemisia* pertenece a la Familia *Asteraceae* o *Compositae* (compuestas). Esta familia abarca más de 1.000 géneros y unas 25.000 especies, predominando en general las hierbas y pequeños arbustos, de ahí que también se les denomine malezas. Pertenecen a esta familia plantas alimenticias (lechuga, alcachofa, girasol), medicinales (manzanilla, árnica) y ornamentales (crisantemos, margaritas). Los dos géneros de polinización anemófila son *Ambrosia* y *Artemisia*. Existen otras especies como *Solidago*, *Taraxacum*, *Chrysanthemum* o *Helianthus*, entre otros, que, a pesar de ser entomófilas, liberan al aire algo de polen ocasionalmente. El género *Ambrosia* es considerado uno de los pólenes más importante causante de rinitis y asma alérgicos en Estados Unidos y Canadá³⁶. En Europa, en los últimos años, se viene observando un aumento de la prevalencia de polinosis por polen de *Ambrosia*, asociado a una diseminación de tipo invasivo de esta planta, por gran parte de nuestro continente³⁶.

El polen de *Artemisia* es una causa frecuente de polinosis a final del verano en Europa. Las especies más abundantes en Europa son la *Artemisia vulgaris*, la *Artemisia verlotorum* y la *Artemisia annua*. La concentración máxima de polen de *Artemisia*, que rara vez alcanza picos mayores a 50 granos/m³ de media diaria, se alcanza durante los meses de septiembre a diciembre, lo que difiere de los datos observados en Gran Canaria, donde los picos son mayores y se producen principalmente en junio. La concentración de estos pólenes predomina entre las 6 y las 12 de la mañana. En España, las zonas donde más se observan son en el Mediterráneo, Aragón y en la zona centro (Toledo).

Las plantas del género *Artemisia* se diferencian dentro de la familia *Asteraceae* porque los capítulos sólo poseen flósculos. Las brácteas involucrales poseen un borde papiráceo y el receptáculo carece de escamas. Los frutos no poseen vilano. Estas plantas ya fueron descritas en las Islas Canarias en 1825 por Leopold von Buch³⁷.

En Gran Canaria se identifican tres especies de *Artemisia*^{38,39}:

- ***Artemisia ramosa*** conocido como ajenjo o incienso morisco. Es un endemismo de las islas de Gran Canaria y Tenerife. Se trata de una planta perenne aromática, tomentoso-grisácea, de hasta 60 cm de altura con una base leñosa. Presenta abundantes ramas ("*ramosa*") generalmente erectas con hojas de hasta 4 cm, bi-pinnatisectas con

lóbulos más o menos lineares y peciolos largos. Poseen cabezuelas amarillo-pálido, muy pequeñas (4 mm de largo), ovoides, en panículos laxos a densos. Se caracteriza también por brácteas involucrales densamente tomentosas, con bordes anchos y escariosos. En Gran Canaria se ha identificado principalmente en la región suroeste: Barrancos del Furrel, de Tasartico, de Taurito, de Tiritaña, de Arguineguín y de Fataga; y en la región del Macizo de Amurga^{38,39}.

- ***Artemisia reptans*** conocido como amulei, amuley o incienso menudo. Se encuentra en las islas de Gran Canaria, Tenerife y Fuerteventura. Es un arbusto pequeño de unos 12-30 cm de altura de porte rastrero ("*reptans*"). Presenta hojas fasciculadas, pequeñas (0,5 cm), desde simples hasta 3 a 5 partidas, tomentoso-grisáceas. Presentan capítulos amarillos, en racimos bracteados o panículas, cortamente pedunculadas, con brácteas involucrales verdosas, pubescentes, con los bordes escariosos. Esta especie se incluye en el Catálogo Canario de Especies Protegidas del año 2010, en la categoría de "especie de interés para los ecosistemas canarios"⁴⁰. En Gran Canaria se ha identificado sobre todo en la región oriental: Montaña Vargas, Montaña de Aguimes, Melenara, Taliarte, Tafira Baja, Barranco de Guanarteme, El Confital, La Isleta, Tenoya, Cardones, etc^{38,39}.

- ***Artemisia thuscula* o *Artemisia canariensis*** conocido como incienso, ajenjo morisco o incienso canario. Es un endemismo canario presente en todas las islas excepto en Lanzarote y Fuerteventura. Es un arbusto gris muy ramificado de hasta 1 m de altura con ramas levantadas o arqueadas y con hojas variables, de unos 3-7 cm de largo, bipinnatisectas, con lóbulos planos, de lineares a obtusos. Estas hojas son de color verde-grisáceo o gris-plateado, de consistencia herbácea, alternas, pecioladas y de olor muy fuerte y característico. Los capítulos, agrupados en alargadas y densas inflorescencias terminales o subterminales, son globosos, dorados o amarillo-parduzco, de unos 4 mm de diámetro, con brácteas involucrales tomentosas, las interiores con bordes escariosos. Se diferencia con facilidad del resto de *Artemisias* de las islas por sus hojas con lóbulos planos. En Gran Canaria es una especie común, que encontramos en laderas entre los 50 y los 1500 m de altitud, pudiendo localizarse en el Valle de Agaete, Montaña Amagro,

Los Tilos de Moya, Tamaraceite, Tafira-Bandama, entre San Mateo y Valsequillo, Guayadeque, Temisas, Tirajana, Fataga, Ayagaures, Arguineguín, etc^{38,39}.

Como describimos previamente en los resultados del captador de Fargas el polen de Artemisia comienza a aparecer a finales de mayo para alcanzar sus máximos (191 granos/m³ de media diaria) durante junio.

Hasta ahora se han descrito los siguientes alérgenos de la *Artemisa vulgaris*:

- **Art v 1:** es el alérgeno mayoritario, presente en más del 95% de pacientes alérgicos al polen de artemisa⁴¹. Pertenece a la familia de proteínas de defensa. Contiene dos dominios, un dominio N-terminal, rico en cisteína homólogo a las defensinas, y un dominio C-terminal, rico en residuos de prolina con un forma helicoidal izquierda extendida. Es por tanto una glicoproteína rica en residuos de hidroxiprolina y con un tamaño muy heterogéneo (24-28 kDa) por su pesada O-glicosilación que es responsable del 30-40% de su peso molecular⁴². Se ha producido un Art v 1 recombinante (rArt v 1), que curiosamente, presenta sólo un 30% de inhibición de reactividad IgE al Art v 1 natural. Este hecho enfatiza la importancia de las modificaciones post-traslacionales del Art v 1 para su reconocimiento por la IgE⁴².
- **Art v 2:** glicoproteína dimérica de 34-38 kDa formada por dos subunidades idénticas de 17,5 kDa unidas por puentes disulfuro⁴³. Pertenece al grupo de familias de proteínas relacionadas con la patogénesis tipo 1 (PR-1)⁴⁴.
- **Art v 3:** descritas 4 isoformas, pertenece a la familia de proteínas no específicas de transferencia de lípidos (nsLTP), panalérgenos del grupo de las prolaminas⁴⁵. Su secuencia N-terminal muestra un 50% de similitud con las nsLTP de castaña, manzana, melocotón y abedul⁴².
- **Art v 4:** descritas dos isoformas, que se han clonado y secuenciado, y que son reconocidas por el 36% de los pacientes alérgicos a artemisa. Pertenecen al grupo de las profilinas y se pueden encontrar como homodímeros o tetrámeros, probablemente estabilizados por interacciones sulfhidrilo o iónicas^{42,43}.

- **Art v 5:** con dos dominios en mano EF (hélice-bucle-hélice), pertenece al grupo de las procalcinas⁴².
- **Art v 6:** pertenece al grupo de las pectato liasas⁴² y presenta reactividad cruzada con Amb a 1 (alérgeno mayoritario del polen de *Ambrosia artemisiifolia*), con el comparte un 65% en la secuencia de aminoácidos⁴⁶.
- **Art v 60 kDa:** su secuencia no ha sido descrita hasta el momento pero está presente en un 70% de los pacientes alérgicos al polen de artemisa⁴⁷.

Se ha descrito reactividad cruzada del polen de artemisa con el polen de otras compuestas como el polen de girasol, el de crisantemo o el de dalia⁴⁸ y menor con el polen de *Ambrosia*⁴⁹. También, como veremos más adelante, se ha descrito reactividad cruzada entre polen de artemisa y alimentos de origen vegetal.

1.3. Alergia a alimentos

1.3.1. Concepto y epidemiología

La alergia a alimentos se define como una reacción adversa a alimentos en la que se demuestran mecanismos inmunológicos subyacentes⁵⁰⁻⁵². Por tanto, la alergia a alimentos, puede ser debida a mecanismos inmunológicos que involucran IgE específica (mediada por IgE), a mecanismos inmunológicos mediados por células (no mediada por IgE), o a mecanismos inmunológicos mixtos, que impliquen a los dos anteriores⁵⁰.

Las reacciones IgE mediadas a alimentos son aquellas producidas por un mecanismo de hipersensibilidad tipo I o inmediata, que da lugar a un gran espectro de manifestaciones clínicas que describiremos más adelante.

En las alergias a alimentos de mecanismo mixto, mediado por células y por IgE, incluimos la dermatitis o eccema atópico (asociada a alergia a alimentos en un 30-40% de los niños con dermatitis moderada-grave), la dermatitis alérgica de contacto y los trastornos gastrointestinales eosinofílicos, cuyos síntomas varían, según la porción del tracto digestivo afectado y el grado de inflamación eosinofílica^{50,53}. Dentro de estas últimas se incluye la esofagitis eosinofílica, enfermedad inflamatoria inmunoalérgica crónica del esófago, cuya prevalencia se ha incrementado en los últimos años. Puede afectar tanto a niños como a adultos, siendo el síntoma más frecuente en los adultos la disfagia, que puede ser intermitente o persistente, produciéndose característicamente impactación de los alimentos de forma ocasional. La esofagitis eosinofílica se ha relacionado con diversas alergias alimentarias, y los pacientes, ocasionalmente, mejoran al eliminar los alimentos vinculados de la dieta, no obstante, su etiología sigue siendo desconocida. Para el diagnóstico es importante el hallazgo en las biopsias de más de 15 eosinófilos por campo de gran aumento (x400) en el epitelio escamoso esofágico, y descartar otras patologías esofágicas como el reflujo gastroesofágico⁵⁴.

Las alergias a alimentos mediadas por células comprenden dos cuadros poco frecuentes, la proctitis/proctocolitis, inducida por proteínas de la dieta (deposiciones con sangre y moco), y el síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (retraso del crecimiento, diarrea, vómitos y letargo en la exposición crónica y diarrea, vómitos e hipotensión horas después de la ingestión en la re-exposición tras dieta de exclusión)^{50,53}

Todos los estudios de los últimos años apuntan que la prevalencia de la alergia a alimentos va en aumento. Recientemente, se ha publicado un meta-análisis de alergia a alimentos realizado en Europa, que recogía estudios publicados desde el 1 de enero del 2000 hasta el 30 de septiembre del 2012, y cuyo objetivo era estimar la prevalencia de las alergias alimentarias más frecuentes en Europa⁵⁵.

A nivel global, la alergia a alimentos referida por paciente, presentó una prevalencia a lo largo de la vida de un 17,3%, y una prevalencia punto (en un momento concreto) del 5,9%, siendo similares los porcentajes al dividir la población en niños y adultos. La prevalencia punto era del 10,7%, cuando la alergia se diagnosticaba por IgE específica positiva al menos a un alérgeno, del 3%, cuando se valoraba un prick test positivo al menos a un alérgeno, del 1,5 %, cuando se valoraran tanto los síntomas referidos como un prick positivo al menos a un alimento, y del 0,9%, cuando el diagnóstico se realizaba por una prueba de exposición oral controlada con el alimento⁵⁰.

Los alimentos más prevalentes, descritos en este meta-análisis, cuando la alergia a alimentos era referida por los pacientes, fueron: leche de vaca (6%), huevo (2,5%), trigo (3,6%), soja (1,5%), cacahuete (0,4%), otros frutos secos (1,3%), pescado (2,2%) y marisco (1,3%). Sin embargo, estos porcentajes de prevalencia eran menores cuando la alergia a alimentos era diagnosticada por prueba de exposición o provocación oral controlada con alimentos: leche de vaca (0,6%), huevo (0,2%), trigo (0,1%), soja (0,3%), cacahuete (0,2%), otros frutos secos (0,5%), pescado (0,1%) y marisco (0,1%)⁵⁵. En los niños pequeños, la alergia a la leche de vaca y al huevo fueron las más frecuentes, mientras que, en niños mayores, eran más comunes los cacahuetes, otros frutos secos, los pescados y los mariscos. No se encontraron datos suficientes para estimar la prevalencia por grupos de edad con la soja y el trigo⁵⁵. Al analizar las prevalencias de alergia a alimentos por regiones de Europa, las más bajas se observaban en el sur de Europa⁵⁰, hecho que puede ser explicado porque, entre los alimentos más comunes estudiados en este meta-análisis, no se incluyeron las frutas que, como sabemos, son una causa muy frecuente de alergia a alimentos en el área Mediterránea⁵⁶.

A nivel mundial, al analizar los alimentos implicados en alergia, existen múltiples diferencias en los estudios publicados, dependiendo de los grupos de edad estudiados, la localización geográfica y los hábitos de consumo. Así, en niños, en general, la alergia a la leche de vaca y al huevo son las más frecuentes, sin embargo, el resto de alimentos implicados varían según diferencias geográficas. De

este modo, el pescado también es una causa frecuente de alergia en niños en países de gran consumo como España⁵⁷ mientras que en Estados Unidos lo es la alergia a cacahuete por la misma razón. En los adultos, los alimentos implicados con mayor frecuencia en Europa, son las frutas y las verduras, mientras que en Estados Unidos, lo son el cacahuete, los frutos secos, los pescados y los mariscos⁵⁸.

Además de los hábitos de consumo, en lo relativo al tipo de alimento consumido, también es importante la forma en que dicho alimento se ingiere. Así, vemos que el consumo de cacahuetes por habitantes es similar en Estados Unidos y China, sin embargo, la alergia al cacahuete es muy importante en el país norteamericano, donde es habitual el consumo de cacahuetes tostados, a diferencia del país asiático, donde el consumo es sobre todo frito o hervido, siendo la alergia a cacahuete aquí poco frecuente. Parece que el tostado en seco y a altas temperaturas (180°C), aumenta la alergenicidad de las proteínas del cacahuete^{59,60}.

En España, las causas más frecuentes de alergia a alimentos en niños son la leche de vaca, el huevo y los pescados, mientras que en adultos, los alimentos más frecuentemente implicado son las frutas. En Canarias, los alimentos más observados en niños son los mismos que en el resto de la población española, mientras que en adultos, la alergia a alimentos más frecuente es la alergia a mariscos^{57,61,62}.

1.3.2. Clasificación de la alergia a alimentos

En los primeros años de vida la inmadurez del tracto gastrointestinal juega un papel importante en el desarrollo de la alergia alimentaria, sin embargo, en los adultos, la aparición de la alergia a alimentos puede ir precedida de una sensibilización respiratoria previa, debido a un fenómeno de reactividad cruzada.

Breiteneder y Ebner, en el año 2000⁶³, distinguen dos tipos de alergia alimentaria en base a la clínica, el tipo de alérgenos y el mecanismo inmunológico implicado:

- **Alergia a los alimentos de clase I:** en la que la sensibilización primaria se produce en el tracto gastrointestinal. Suele aparecer en niños, siendo rara en adultos. Los alérgenos implicados son termoestables y resistentes al pH ácido del estómago y a las proteasas⁶⁴, evitando así su digestión enzimática y facilitando su absorción. En esta clase de alergia a alimentos es frecuente la aparición de reacciones sistémicas, ya que se producen por alérgenos completos (capaces de sensibilizar y desencadenar una reacción alérgica). La mayoría son glicoproteínas, solubles en agua, con un peso molecular entre 10-70 kDa.

- **Alergia a los alimentos de clase II:** en la que la alergia a alimentos se produce por una sensibilización primaria a alérgenos inhalados por vía respiratoria, apareciendo principalmente en niños mayores, adolescentes y adultos. Generalmente los alérgenos responsables son termolábiles y sensibles al pH ácido y enzimas digestivas⁵⁸. Son los denominados alérgenos incompletos (capaces de desencadenar una reacción alérgica pero no de sensibilizar), que son inactivados en el tracto gastrointestinal siendo incapaces de producir sensibilización, pero sí que pueden producir clínica, en pacientes sensibilizados previamente por vía respiratoria, por reactividad cruzada.

1.3.3. Alérgenos alimentarios

Independientemente de la vía de exposición y sensibilización, cualquier alérgeno debe ser capaz de producir una respuesta específica de anticuerpos de alta afinidad, y para ello, es necesario una masa molecular de al menos 4-6 kDa y la presencia de epítomos T capaces de inducir una respuesta Th2⁶⁵. Además, para que el alérgeno induzca una reacción alérgica, es necesario que se una al menos a dos moléculas de IgE del mastocito, para lo que debe poseer al menos 20-25 aminoácidos para permitirle tener un mínimo de dos epítomos B de unión de IgE⁶⁵.

A grandes rasgos podemos dividir los alérgenos alimentarios en alérgenos de origen animal y alérgenos de origen vegetal según la fuente alérgica.

1.3.3.1. Alérgenos alimentarios de origen animal

Los alérgenos de origen animal que con mayor frecuencia se describen como responsables de alergia a alimentos, son los pertenecientes a la leche de vaca, el huevo, los pescados, los mariscos y las carnes.

La mayoría de los pacientes alérgicos a la **leche de vaca** están sensibilizados a más de un alérgeno⁶⁶. Los que con mayor frecuencia inducen respuesta IgE mediadas son la caseína (Bos d 8) y la beta-lactoglobulina (Bos d 5, BLG), seguidas por la alfa-lactoalbúmina (Bos d 4, ALA).

La clara de **huevo** es más alergénica que la yema, siendo el alérgeno más importante de la misma el ovomucoide (Gal d 1, OVM), seguido por la ovoalbúmina (Gal d 2, OVA) y la conalbúmina (Gal d 3). El ovomucoide es un inhibidor de proteasas que puede ser útil como marcador de persistencia clínica de alergia al huevo y para predecir la tolerancia al huevo cocido⁶⁷. En la yema el principal alérgeno es la α -livetina o albúmina sérica de gallina (Gal d 5), implicada en el síndrome de alergia cruzada ave-huevo.

Los alérgenos mayoritarios del **pescado** son las parvalbúminas, un grupo de proteínas musculares que controlan el flujo de calcio a través de la membrana celular. Existe una gran similitud entre las parvalbúminas de las diferentes especies de pescado⁶⁸, pero la alergenicidad puede variar de unas especies a otras⁶⁹.

La alergia al **marisco** es más frecuente en adultos, y los crustáceos están implicados en mayor frecuencia que los moluscos y los cefalópodos. Se han descrito tropomiosinas alergénicas en la gamba (Pen a 1)⁷⁰ y en otros crustáceos así como en moluscos. También se han descrito en otros invertebrados como los ácaros o la cucaracha⁷¹.

La alergia a **carnes** es poco frecuente. Los alérgenos que con más frecuencia se implican en alergia a carne de ternera son la albúmina sérica bovina (BSA, Bos d 6) y la gammaglobulina (IgG) bovina (Bos d 7).

1.3.3.2. Alérgenos alimentarios de origen vegetal

Los alérgenos alimentarios de origen vegetal constituyen un nutrido grupo de proteínas de plantas presentes en alimentos que podemos clasificar en tres grandes grupos: proteínas de reserva, proteínas de defensa y un grupo heterogéneo de proteínas con distintas funciones.

Las **proteínas de reserva** tienen como función el suministro de nutrientes durante la germinación. Se pueden dividir en dos superfamilias cuyos miembros comparten motivos estructurales conservados, las prolaminas y las cupinas⁷².

- **Superfamilia de las prolaminas:** son muy importantes en la alimentación y en el procesamiento de alimentos. Se subdividen en dos grupos de proteínas con secuencias de aminoácidos muy poco relacionadas, aunque con algún motivo conservado a base de cisteínas:

- Prolaminas: son proteínas mayoritarias de las harinas de cereales. Son las prolaminas propiamente dichas, insolubles en agua y soluciones salinas diluidas. Incluyen alérgenos responsables de asma del panadero, por inhalación de harina de trigo, y de dermatitis atópica⁷³, por ingestión de la misma. Además se ha demostrado la asociación de la gliadina ω -5 (Tria a 19) con la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de ingestión de trigo⁷⁴⁻⁷⁶.

- Albúminas 2S: son proteínas solubles en agua con coeficiente de sedimentación de 2 Svedbergs (S). Son alérgenos mayoritarios de las leguminosas, frutos secos y especias. Presentan una masa molecular entre 10 y 14 kDa con un tamaño de unos 90 a 135 aminoácidos. Se han descrito como alérgenos relevantes en la alergia a mostaza, amarilla y oriental^{77,78}, pipas de girasol⁷⁹, sésamo⁸⁰, cacahuete⁸¹, nuez de Brasil⁸² y nuez inglesa⁸³ y probablemente tengan también un papel importante en la alergia a guisante, soja, almendra, avellana, anacardo y col. La colza y la mostaza amarilla, ambos miembros de la familia *Brassicaceae*, presentan alérgenos 2S muy semejantes (Sin a 1, Bra j 1 y Bn III), con una identidad de secuencia entre 86-92%, dando lugar a reactividad cruzada entre ellos^{78,84}. Sin embargo, otras albúminas 2S como la del cacahuete o del girasol presentan baja similitud en sus secuencias de aminoácidos y escasa o nula reactividad cruzada. En

general las albúminas 2S son muy resistentes a proteasas y tratamientos térmicos, por lo que atraviesan las vías digestivas sin apenas ser alteradas, produciendo síntomas graves incluyendo anafilaxia.

- **Superfamilia de las cupinas:** presentan en su estructura tridimensional dominios característicos en "barril β ", también llamados dominios cupina. Presentan secuencias conservadas en posiciones específicas de las cadenas polipeptídicas⁸⁵. La mayoría son proteínas de reserva no catalíticas. Se subdividen en tres grupos:

- Germinas: son homo-hexámeros de unos 250 kDa cuyos monómeros son cadenas de 25 kDa. La primera descrita fue en el trigo. Más tarde, se han identificado proteínas similares en numerosas plantas y, para distinguirlas de la del trigo, se denominan proteínas similares a las germinas (GLP, del inglés germin-like proteins). Son glicoproteínas solubles y resistentes a la temperatura y a las enzimas proteolíticas. El papel alergénico de las germinas no está claro, si bien, la GLP de la pimienta negra ha sido clasificada como miembro de la familia de proteínas de defensa de plantas PR-16, y ha sido relacionado con el síndrome de alergia cruzada apio-abadul-artemisa-especias⁸⁶.

- Leguminas o globulinas 11S: son homo-hexámeros de unos 300-450 kDa cuyos monómeros son cadenas de 50-60 kDa. Poseen una estabilidad térmica moderada y una relativamente alta estabilidad frente a proteasas. Se han descrito leguminas relevantes en la mostaza amarilla (Sin a 2)⁸⁷, soja, el cacahuete, la nuez de Brasil, al avellana, el anacardo, la nuez, el coco, el sésamo y la almendra^{80,82,88-91}.

- Vicilinas o globulinas 7S: son trímeros de 150-180 kDa con monómeros de 40-80 kDa. Tienen una baja similitud de secuencia de aminoácidos con las leguminas, pero una estructura tridimensional y organización de subunidades similar, por lo que también presentan una estabilidad térmica moderada y una relativamente alta estabilidad frente a proteasas. Las vicilinas alergénicas más estudiadas son la del cacahuete⁹² y la soja⁹³. También se ha demostrado su existencia en la lenteja y el guisante (alérgenos mayoritarios en ambos, con una

identidad de secuencia del 90%)^{94,95}, y en la nuez negra, nuez inglesa, anacardo, avellana y sésamo.

Las **proteínas de defensa** actúan como protectoras frente a las invasiones de patógenos o plagas. Muchas se denominan proteínas PR (del inglés "pathogenesis-related proteins"). Están ampliamente distribuidas y presentan una estrecha relación estructural entre miembros de una misma familia, por lo que son muy importantes en las reactividades cruzadas entre alimentos vegetales, y entre éstos y los pólenes^{72,96}. Por tanto, dentro de este grupo existen muchas familias con proteínas alergénicas:

- Homólogos del Bet v 1 (PR10): tienen un peso molecular de 18 kDa. El Bet v 1 es el alérgeno principal del polen de abedul, y como veremos más adelante, es responsable de un síndrome de alergia cruzada entre dicho polen y alimentos vegetales⁹⁷. Se encuentran alérgenos de este grupo en el apio, la zanahoria, la manzana, la soja y el cacahuete. Son termolábiles y rápidamente degradables por las enzimas digestivas, por lo que la clínica predominante es local y leve, síndrome de alergia oral (SAO), en la mayoría de los casos.
- Proteínas no específicas de transferencia de lípidos (LTP) (PR14): son una familia de polipéptidos básicos de 9 kDa. Se han identificado en frutas rosáceas (melocotón, manzana, etc.), naranja, uva, lechuga, maíz, avellana, castaña, col, espárrago, látex y también en pólenes (olivo, *Parietaria judaica* y el Art v 3 en la *Artemisia vulgaris*). Se ha demostrado reactividad cruzada entre varios de estos alérgenos⁹⁸. Son resistentes a las proteasas digestivas y termoestables^{99,100}, lo que facilita su absorción en tracto gastrointestinal en forma inmunológicamente activa y que mantenga su potencial alergénico en alimentos y bebidas procesados¹⁰¹. Por tanto se asocian a síntomas sistémicos y graves.
- Quitinasas y proteínas de dominio heveína (PR3,4,8): las quitinasas de clase I se han identificado en el látex, aguacate, kiwi, castaña y plátano y son los principales alérgenos responsables del síndrome de alergia cruzada látex-frutas¹⁰². Las quitinasas de clase IV, muy similares a las anteriores, se han descrito como alérgenos principales en la uva¹⁰³ y algunos pólenes. Estas enzimas tienen actividad

antifúngica y presentan un tamaño de 32 kDa. Poseen dos dominios, uno heveína N-terminal de 4,7 kDa y otro catalítico de 26 kDa. El dominio heveína tiene un alto nivel de identidad de secuencia (60-70%) con la heveína del látex.

- Taumatinas (PR5): son proteínas antifúngicas de 23 kDa. Se han identificado como alérgenos del kiwi, manzana, melocotón, cereza y pimienta, además de en algunos pólenes. En general son resistentes a proteasas y termoestables.

- Inhibidores de α -amilasas: compuesta por una amplia proporción de las proteínas solubles presentes en las harinas de cereales, con un peso molecular de 12-16 kDa y resistentes al calor. Producen clínica por ingestión (sobre todo el trigo y el arroz)¹⁰⁴ y también asma del panadero por inhalación.

- β -1,3-glucanasas (PR2): proteínas antifúngicas descritas como alérgenos del látex¹⁰⁵ y del polen de olivo¹⁰⁶. Se ha sugerido su presencia en el tomate, plátano, pimienta y papa.

- Proteasas: se han identificado dos, la cisteín-proteasa del kiwi de 30 kDa, y la serín-proteasa del melón de 66 kDa.

- Peroxidasas (PR9): algunas peroxidadas glicosiladas de 36 kDa, presentes en harinas de cereales, han sido implicadas en reacciones alérgicas por ingestión y también en asma del panadero por inhalación.

- Proteínas PR1: sólo se ha asociado a alergia en el melón.

- Inhibidores de proteasas: se han descrito como potenciales alérgenos distintos inhibidores de proteasas presentes en la papa.

Un tercer grupo de alérgenos alimentarios de origen vegetal estaría formado por **proteínas con distintas funciones como estructurales, catalíticas o reguladoras**. Es un grupo muy amplio, donde se incluyen alérgenos como la glioxalasa I del arroz o la β -fructofuranosidasa del tomate. Sin embargo el máximo exponente de este grupo lo constituyen las profilinas. Las **profilinas** de las plantas son proteínas citosólicas de 14 kDa que participan en la regulación del grado de

polimerización de los filamentos de actina. Mantienen más del 70% de identidad de secuencia entre la mayoría de sus miembros y se han descrito en casi todas las fuentes alergénicas de origen vegetal estudiadas. Se degradan rápidamente por las proteasas digestivas, por lo que se suelen asociar a síntomas locales y leves (síndrome de alergia oral). Pueden ser alérgenos mayoritarios en algunos pólenes y alimentos (soja, naranja, melón)¹⁰⁷

1.3.4. Clínica de la alergia a alimentos mediada por IgE

Generalmente, los síntomas por alergia a alimentos mediada por IgE aparecen entre unos minutos y dos horas tras la ingestión del alimento y se pueden manifestar clínicamente en uno o varios órganos, incluyendo la mucosa oral, la piel, las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular.

El síndrome de alergia oral (SAO), recientemente acuñado como urticaria de contacto de la orofaringe, es de lejos, la presentación clínica más frecuente de la alergia a alimentos en pacientes adolescentes y adultos¹⁰⁸. Los síntomas generalmente aparecen dentro de los 5-15 minutos tras la ingestión del alimento y consisten en prurito de labios, lengua, paladar, orejas y garganta, a veces asociado a un leve angioedema en esas mismas zonas. La característica principal es que, en la mayoría de los casos, el cuadro se resuelve espontáneamente en 10-30 minutos, aunque, en algunos pacientes, puede ir seguido de una reacción sistémica. Cualquier alimento puede producir esta clínica, si bien, se observa con más frecuencia como síntoma aislado, en pacientes alérgicos a pólenes con alergia asociada a frutas y frutos secos. Sin embargo, la alergia a frutas frescas y frutos secos sin alergia a polen asociada, suele inducir síntomas de mayor gravedad^{109,110}.

La piel es el segundo órgano en frecuencia afectado en las reacciones alérgicas a alimentos. La manifestación cutánea más frecuente es la urticaria aguda generalizada, acompañada o no de angioedema. A veces, sólo se observa un eritema pruriginoso, y más raramente, una urticaria de contacto localizada en el sitio de contacto con el alimento⁵⁰.

Los síntomas respiratorios son también frecuentes, aunque no suelen aparecer de forma aislada y pueden consistir en rinoconjuntivitis y/o asma. A veces estos síntomas pueden ser desencadenados por inhalación de la proteína del alimento, como por ejemplo, por el vapor de cocción de los crustáceos⁵⁰.

Los síntomas gastrointestinales pueden incluir náuseas, vómitos, diarreas o dolor abdominal, y aunque no son muy frecuentes, pueden ser la única manifestación de la alergia a alimentos, sobre todo en niños.

La clínica más grave que se puede producir en la alergia a alimentos es la anafilaxia. Aunque durante años ha existido controversia con su definición, hoy en día se define como una reacción de hipersensibilidad generalizada o sistémica grave con compromiso vital^{111,112}. Estos problemas con la definición, así como la falta de criterios clínicos claros para su diagnóstico, hacen pensar que clásicamente haya sido una entidad subestimada, siendo su incidencia muy variable, 3,2-30 por 100.000 personas/año. En los últimos años y probablemente gracias a las múltiples guías y consensos internacionales publicados esta tendencia está cambiando, reconociéndose cada vez más y mejor este cuadro. También en los últimos años se han propuesto criterios clínicos de diagnóstico^{111,112}, considerándose que la anafilaxia es muy probable cuando se cumple 1 de los 3 siguientes criterios:

1. Instauración aguda (minutos-horas) de cuadro clínico con afectación de la piel, tejido mucoso o ambos y al menos uno de los siguientes:
 - Compromiso respiratorio.
 - Compromiso cardiovascular.

2. Dos o más de los siguientes cuando aparecen rápidamente (minutos-horas) tras la exposición a un posible alérgeno para el paciente:
 - Afectación de piel o tejido mucoso.
 - Compromiso respiratorio.
 - Compromiso cardiovascular.
 - Síntomas gastrointestinales persistentes.

3. Hipotensión tras la exposición a un alérgeno conocido para el paciente (minutos-horas).

En general se trata de un cuadro sistémico que aparece de forma aguda con síntomas y signos rápidamente progresivos, siendo generalmente los síntomas de piel y mucosas los primeros en aparecer y los más frecuentes, más del 80% de los casos. No obstante, estos síntomas pueden retrasarse o no existir. Puede afectarse cualquier órgano o sistema, apareciendo manifestaciones respiratorias, digestivas, o cardíacas, incluyendo el shock anafiláctico.

El riesgo de anafilaxia es más alto en pacientes con episodios previos de anafilaxia o pacientes con asma grave, y también aumenta por la presencia de determinados cofactores conocidos, como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), el ejercicio, las infecciones y la mastocitosis.

Además, como hemos descrito previamente, existen alérgenos que producen cuadros de anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de alimento. En estos pacientes, las manifestaciones clínicas de anafilaxia se presentan igual que se ha descrito arriba, por alergia a un alimento, pero existiendo un desencadenante, el ejercicio físico. Característicamente, muchos de estos pacientes no presentan clínica tras la ingestión de los alimentos implicados en ausencia de dicho desencadenante. Un ejemplo es la gliadina ω -5 (Tria a 19), relacionada con la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de ingestión de trigo⁷⁴⁻⁷⁶.

1.3.5. Diagnóstico de la alergia a alimentos

Cuando se sospecha alergia a algún alimento por la historia clínica referida por el paciente, la primera aproximación diagnóstica es realizar las **pruebas percutáneas por punción o prick test**, para demostrar la sensibilización a dicho alimento. Muchos de los extractos de alérgenos alimentarios comercializados no están estandarizados biológicamente, lo que conlleva que los prick test con dichos extractos, sobre todo con los alérgenos de alimentos de origen vegetal, muestren una baja sensibilidad, dando lugar a un elevado número de resultados falsos negativos¹¹³. Para obviar este inconveniente, en muchos casos es preferible recurrir a realizar la prueba cutánea con el alimento nativo, mediante la técnica de prick-prick^{114,115}. Esta técnica se puede realizar tanto con el alimento en crudo como cocinado, y sus principales limitaciones son que suele ser difícil la comparación de resultados, debido entre otros factores, a la variedad del alimento usado, al grado de madurez del mismo, así como al proceso de almacenamiento y conservación al que ha sido sometido¹¹⁶. Además, el prick-prick tiene una menor especificidad, es decir, un mayor porcentaje de resultados falsos positivos, que deben ser correctamente evaluados con la historia clínica y los otros métodos diagnósticos disponibles.

Otra forma de demostrar la sensibilización es la **determinación de anticuerpos IgE específicos** frente a los alimentos sospechosos¹¹⁷. Además, en los últimos años, se han desarrollado técnicas *in vitro* para determinar IgE

específica frente a proteínas alergénicas concretas, mediante diagnóstico molecular o diagnóstico separado por componentes, si bien, los resultados de dichas pruebas deben ser correctamente interpretados por personal experimentado y acorde al contexto clínico^{118,119}

La **determinación de los niveles de IgE total** puede ser de ayuda para interpretar los resultados de sensibilización, ya que niveles muy elevados de IgE total pueden ir asociados a múltiples resultados positivos de prick test o IgE específica, que pueden no ser clínicamente relevantes⁵⁰.

La **determinación de IgG o IgG₄ específica** frente a alimentos no aporta ninguna información clínicamente relevante sobre el diagnóstico de alergia a alimentos¹²⁰. A pesar de que su uso ha aumentado en los últimos años, no existen estudios que lo avalen.

Es importante diferenciar entre la sensibilización, que es un hallazgo inmunológico, que se demuestra mediante las pruebas cutáneas *in vivo* o mediante pruebas *in vitro* para determinar IgE, y la clínica, es decir, que dicha sensibilización se traduzca en síntomas asociados a la ingestión del alimento en cuestión. Esto es especialmente importante en los síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos de origen vegetal, donde se puede observar una gran cantidad de sensibilizaciones a distintos alimentos, pero no todas ellas tienen por qué tener relevancia clínica. Para discernir cuáles son clínicamente relevantes, hay que apoyarse en la historia clínica, y si aún así existen dudas, recurrir a las pruebas de exposición o provocación oral controlada.

En determinados tipos de alergia alimentaria se puede instaurar una **dieta de eliminación** con fines diagnósticos. Esta consiste en eliminar el o los alimentos sospechosos, basándose en una historia clínica detallada y pruebas alérgicas en prick test y/o determinación de IgE específica. La duración de esta dieta de eliminación debe ser la necesaria para la desaparición de los síntomas, generalmente 2-4 semanas para síntomas IgE-mediados, y más larga para síntomas no IgE-mediados (hasta 6 semanas para la esofagitis eosinofílica)⁵⁰.

Las **pruebas de exposición o provocación oral controlada** son la única herramienta diagnóstica que permite diferenciar entre verdadera alergia a alimentos y sensibilizaciones asintomáticas⁵⁰. Con las frutas y los vegetales, estas pruebas deben ser realizadas con el alimento preparado en fresco. Las pruebas de

exposición oral en abierto, es decir, sin enmascarar el alimento, sólo son válidas si dan un resultado negativo, o un resultado claramente positivo con síntomas objetivos. La provocación oral controlada doble ciego contra placebo (POCDCCP), con el alimento nativo, es el mejor método disponible para el diagnóstico de confirmación de la alergia a alimentos^{50,117}. Existen varios consensos europeos de protocolos para la estandarización de las POCDCCP^{121,122}. La prueba se basa en la preparación de dos comidas, con idéntico color, consistencia y sabor, una de ellas con el alimento a probar en una cantidad conocida, y otra sin él. Se administra aleatoriamente el placebo o la comida problema, de manera que se asegure que el observador encargado de evaluar la prueba lo desconozca, y se administran dosis progresivas a intervalos fijos hasta alcanzar la dosis total, o hasta que aparezcan síntomas objetivos que obliguen a suspender la prueba. A veces se puede comenzar con una exposición mucosa. La cantidad de alérgeno que se introduce en la comida varía, dependiendo del alérgeno en cuestión y también de la historia del paciente.

1.3.6. Tratamiento de la alergia a alimentos

1.3.6.1. Tratamiento de las reacciones agudas

El tratamiento de las reacciones es sintomático y varía según la gravedad de las mismas, pudiendo ser necesaria la administración de antihistamínicos, corticoides o adrenalina⁵⁰.

Existe una débil evidencia que apoya los beneficios del uso de antihistamínicos, en niños y adultos, para el tratamiento de reacciones alérgicas leves por ingestión de alimentos¹²³, sin embargo, no existe evidencia de la eficacia de su uso en el tratamiento de las reacciones más graves⁵⁰. Además, la administración profiláctica de antihistamínicos puede enmascarar los síntomas precoces de una anafilaxia, pudiendo dar lugar a un peligroso retraso en la administración de adrenalina⁵⁰.

La **adrenalina** es el tratamiento de elección y de primera línea en una reacción grave (anafilaxia) por alergia a alimentos¹¹¹. Su administración debe ser intramuscular, adrenalina al 1:1.000, a dosis de 0,3-0,5 ml en adultos y 0,1 ml/kg de peso en niños (máximo de 0,3-0,5 ml). La absorción es mejor en la región anterolateral del muslo (vasto lateral), pero también se puede administrar en la

zona deltoidea. Se debe repetir la dosis cada 5-15 minutos hasta control de los síntomas y la presión arterial¹¹².

1.3.6.2. Tratamiento a largo plazo

Con todo lo expuesto anteriormente, es evidente que la dieta de eliminación del alimento sólo se recomienda si existe una sensibilización con una clara historia clínica, o bien tras un resultado claramente positivo tras la prueba de exposición oral⁵⁰. La educación es el pilar fundamental en las dietas de eliminación a largo plazo. Los pacientes, sus familiares, personas cercanas, profesores y cuidadores, deben ser instruidos en la lectura de las etiquetas de los alimentos, y en cómo evitar los alérgenos alimentarios implicados, tanto dentro como fuera de casa. Es importante recordar que los niveles de tolerancia pueden cambiar en el tiempo, sobre todo en niños, por lo que los pacientes deben ser evaluados a intervalos regulares, para valorar si han desarrollado tolerancia y evitar así dietas de eliminación innecesarias⁵⁰.

Los fármacos estabilizadores de los mastocitos, como el cromoglicato sódico, que inhibe la degranulación de los mismos, han demostrado eficacia en algunos estudios, pero la evidencia disponible no es suficiente para su recomendación en el tratamiento preventivo de las reacciones alérgicas¹²³.

La inmunoterapia específica con alérgenos ha obtenido buenos resultados en algunos casos de reactividad cruzada pólenes-alimentos en diversos estudios^{124,125}, sin embargo, en otros estudios los resultados obtenidos no son satisfactorios¹²⁶⁻¹²⁸.

El tratamiento con Omalizumab, anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado, autorizado para el tratamiento del asma y la urticaria, se ha estudiado en varios trabajos publicados de alergia a alimentos y sus resultados parecen ser beneficiosos, incrementando la dosis umbral de tolerancia al alimento¹²³ y la rapidez en desensibilizaciones a alimentos, cuando se usa como adyuvante¹²⁹.

1.4. Alergia a mostaza

La planta de la mostaza pertenece a la familia *Brassicaceae*, también denominada *Cruciferaeae* (crucíferas), a la que también pertenecen el brécol, la col, la coliflor, las coles de Bruselas, el nabo, el colinabo, el rábano, la colza y el berro. Desde hace siglos la mostaza se ha usado en la cocina, sobre todo en salsas, pero también como condimento en distintos platos, o en aderezos de ensaladas.

Existen dos grandes tipos de semillas de mostaza, la amarilla (*Sinapsis alba* o mostaza blanca) y la oriental (*Brassica juncea* o mostaza marrón). Las semillas de mostaza amarilla son más grandes que las de la oriental, pero mucho menos picantes, y suelen ser el ingrediente principal en las mostazas americanas. Sin embargo, en Europa y China, suelen predominar las mostazas con semillas orientales, mientras que en el Reino Unido suelen contener una mezcla de ambas semillas. En España el consumo de mostaza predomina en general, en forma de salsas de mostaza. Las semillas de mostaza se pueden comercializar enteras en grano, en polvo y procesadas en salsas de mostaza donde predominan las semillas de mostaza amarilla.

A pesar de que es un alimento cuyo consumo es relativamente frecuente en la mayoría de países, la alergia a mostaza clásicamente se ha considerado una entidad poco frecuente, tanto en niños como adultos. No obstante, en los últimos años, cada vez va teniendo más importancia dentro de las alergias alimentarias. Así, en un estudio realizado en niños en Francia en 1999¹³⁰, al estudiar los alimentos que con más frecuencia causaban alergia, la mostaza aparece, sorprendentemente, en cuarto lugar, tras leche de vaca, el huevo y los cacahuetes. El mismo grupo de trabajo investigó, posteriormente, un grupo de 36 niños con prick test positivo a mostaza, demostrando alergia en 15 de ellos mediante provocación oral controlada simple ciego contra placebo¹³¹. En este estudio concluyen que la alergia a mostaza comienza con frecuencia a edades tempranas y que en niños, la clínica asociada a la misma no parece ser tan grave como en adultos¹³¹.

También se ha estudiado la alergia a mostaza en adultos, así Caballero y cols. en 2002 describen las características clínicas de un grupo de 29 pacientes alérgicos a mostaza, refiriendo casi el 50% de ellos reacciones anafilácticas¹³². Estos hallazgos contrastan con los datos que existían hasta entonces con sólo algunas publicaciones relatando casos de anafilaxia por alergia a mostaza en

adultos¹³³⁻¹³⁸. Morisset y cols. en 2003 estudian 28 niños y 2 adultos sensibilizados a mostaza y realizan POCDCCP y también en simple ciego contra placebo en 24 de ellos con un resultado positivo en el 23,3%¹³⁹.

Otro aspecto a tener en cuenta es que, en algunas ocasiones, la mostaza se puede presentar como un alérgeno oculto, difícil de identificar, con los consiguientes problemas diagnósticos que este hecho implica^{133,138,140}.

Este aumento de incidencia de alergia a mostaza en los últimos años, junto con su posible presentación como alérgeno oculto, puede ser la razón de que las directivas de etiquetado de alimentos de la Unión Europea (Reglamento nº 1169/2011)¹⁴¹ la incluyan en las listas de alimentos potencialmente más alergénicos.

Se han identificado varios alérgenos en la mostaza:

- **Sin a 1:** alérgeno mayoritario de la mostaza amarilla (*Sinapsis alba*)^{77,78,142}. Es una proteína de reserva que pertenece a la familia de las albúminas 2S, con un peso molecular de 14 kDa, resistente a proteasas y tratamientos térmicos^{143,144}. Se ha sugerido su papel como marcador diagnóstico de alergia a la mostaza¹⁴⁵.
- **Sin a 2:** alérgeno minoritario de la mostaza amarilla, de 51 kDa, formado por dos cadenas polipeptídicas de 36 y 23 kDa, que pertenece a la familia de las leguminas (globulinas 11S)^{87,146}. Se ha sugerido su papel como marcador de gravedad de alergia a la mostaza¹⁴⁵.
- **Sin a 3:** alérgeno minoritario de la mostaza amarilla, es una LTP de unos 12 kDa que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 54% con la LTP del melocotón¹⁴⁷.
- **Sin a 4:** alérgeno minoritario de la mostaza amarilla, de 13-14 kDa que pertenece a la familia de las profilinas y que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% con la profilina del melón¹⁴⁷.
- **Bra j 1:** alérgeno mayoritario de la mostaza oriental¹⁴⁸, que al igual que Sin a 1, pertenece a la familia de las albúminas 2S, con un peso molecular de aproximadamente 16 kDa.

1.5. Reactividad cruzada

El anticuerpo IgE reconoce tan sólo a un número limitado de aminoácidos del antígeno, denominado epítipo, que puede ser lineal o conformacional. Dado que son suficientes sólo unos pocos aminoácidos para formar un epítipo, basta con que dos proteínas muestren una homología parcial en su secuencia de aminoácidos para que pueda existir reactividad cruzada entre ellas, es decir, para que sean reconocidas por un mismo anticuerpo IgE. Muchas veces, estos epítipos forman parte de proteínas con funciones similares¹⁴⁹.

Por tanto, es comprensible que exista reactividad cruzada entre especies pertenecientes a la misma familia o a familias estrechamente relacionadas, tanto entre alérgenos inhalados, como entre alérgenos alimentarios, debido a las similitudes estructurales entre dichas especies, que hacen que compartan múltiples proteínas similares. Así, están ampliamente descritas, entre otras, las reactividades cruzadas entre distintos ácaros del polvo¹⁵⁰⁻¹⁵², entre pólenes de gramíneas¹⁵³⁻¹⁵⁵, entre cacahuete y otras leguminosas^{156,157}, entre la leche de vaca y otras leches de origen animal^{158,159}, etc.

Sin embargo, sí que llama la atención que en niños mayores, adolescentes y adultos, hasta el 60% de las alergias alimentarias mediadas por IgE están asociadas a alergias a alérgenos inhalados, existiendo en este caso una reactividad cruzada entre especies muy distintas entre sí. Además, a diferencia de la alergia alimentaria clásica, donde la vía de sensibilización primaria parece ser que ocurre en el tracto gastrointestinal, y va dirigida sobre todo a alérgenos alimentarios estables, la sensibilización primaria en la mayoría de los síndromes de reactividad cruzada entre inhalantes y alimentos, parece ser contra los alérgenos inhalados⁹⁶.

Para denominar a estos antígenos responsables de reactividad cruzada entre especies que pertenecen a varias familias taxonómicas, se usa el término panalérgeno¹⁶⁰. Muchos de estos panalérgenos son proteínas cuya secuencia se ha conservado en la evolución filogenética porque cumplen una función importante en la especie correspondiente; así, pertenecen a grupos de proteínas de defensa, a proteínas del citoesqueleto o a proteínas musculares¹⁶¹. También se ha descrito reactividad cruzada IgE a hidratos de carbono, pero en la mayoría de los casos sin significación clínica¹⁶².

1.5.1. Reactividad cruzada pólenes-alimentos

Aunque los datos epidemiológicos son escasos, no hay duda de que el aumento de la alergia a pólenes va a ir acompañado de un incremento de las alergias cruzadas entre pólenes y alimentos^{55,163,164}. En los últimos años se han descrito múltiples reactividades cruzadas de este tipo, pero los resultados publicados, en la mayoría de los casos no son concordantes. Esta discordancia no es difícil de entender, si tenemos en cuenta que los pacientes pueden estar sensibilizados a más de un tipo de polen e incluso a otros alérgenos inhalados, la existencia de reactividades cruzadas entre pólenes, las variedades de pólenes a los que los pacientes están expuestos debido a las diferencias geográficas, y las diferencias de hábitos nutricionales entre las distintas poblaciones estudiadas.

La clínica de alergia alimentaria más frecuentemente observada en estos pacientes es el SAO^{96,108}, seguido en segundo lugar de las manifestaciones cutáneas⁹⁶ y, si bien son relativamente poco frecuentes, también pueden aparecer reacciones graves anafilácticas^{165,166}. Como se describió previamente, esta clínica va precedida habitualmente en el tiempo por la clínica respiratoria asociada a la alergia al polen, siendo sólo excepcional que la alergia al polen permanezca silente debutando primero la clínica alimentaria, por sensibilización a alimentos debida a la reactividad cruzada¹⁶⁷.

Los síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos de origen vegetal que más se han descrito en literatura se resumen a continuación.

1.5.1.1. Síndrome abedul-alimentos vegetales

El síndrome abedul-alimentos vegetales es el más frecuente y también el más estudiado, porque el polen de abedul (*Betula spp*) es la causa principal de polinosis primaveral en el norte y centro de Europa, y en algunas zonas de América del Norte y Australia. La mayor parte de los pacientes también están sensibilizados a otros árboles del orden *Fagales* como el avellano, y en más de la mitad de los casos, presentan alergia a alimentos de origen vegetal. Los alimentos más frecuentemente implicados son las frutas rosáceas (sobre todo la manzana), las avellanas y las hortalizas de la familia *Apiaceae* (o *Umbelliferae*) como el apio y la zanahoria. En menor frecuencia, también se ha descrito asociaciones a otros

alimentos, como leguminosas (soja y cacahuete, fundamentalmente), kiwi, e incluso a caqui y jaca.

La mayoría de los pacientes presentan manifestaciones clínicas leves, siendo la más frecuente el SAO, aunque se ha descrito reacciones sistémicas graves, incluyendo anafilaxia, con soja^{165,166,168}, con apio¹⁶⁹ y zanahoria¹⁷⁰ (sobre todo si asocian también sensibilización al polen de artemisa), con caqui¹⁷¹ y con jaca¹⁷². De forma característica, la mayoría de los pacientes toleran estos alimentos una vez cocinados, debido a la presencia de alérgenos termolábiles.

Más del 95% de los pacientes con alergia a abedul reconocen el alérgeno mayoritario Bet v 1. Alérgenos relacionados en alimentos de origen vegetal, homólogos al Bet v 1 (PR-10), han sido descritos como alérgenos mayoritarios en los pacientes con alergia a alimentos con este síndrome de reactividad cruzada abedul-alimentos vegetales⁶³. Existen también alérgenos minoritarios (reconocidos por el 10-32% de los pacientes alérgicos a abedul), dentro de los cuáles también se ha descrito algunos implicados en la reactividad cruzada con alimentos vegetales: Bet v 2, Bet v 6, Bet v 7 y Bet v 8. La reactividad cruzada entre Bet v 1, Bet v 2 o Bet v 6 y frutas exóticas, ha sido descrita como causa de reacciones graves incluso tras la ingestión por primera vez del alimento. Los alérgenos homólogos al Bet v 1 generalmente están poco representados en los extractos comerciales para prick test, lo que debe tenerse en cuenta cuando se sospeche este síndrome.

1.5.1.2. Síndrome artemisa-apio-especias

Cómo hemos descrito previamente, el polen de *Artemisia vulgaris* es una causa frecuente de polinosis a final del verano en Europa. Aunque la reactividad cruzada con alimentos es menos frecuente que con el polen de abedul, la clínica de estas alergias alimentarias asociadas puede ser más grave, cómo muestra el hecho de que se haya descrito un número importante de casos de anafilaxia por apio en pacientes mono-sensibilizados al polen de *Artemisia*^{169,173}.

La alergia a las umbelíferas y su asociación a la alergia al polen de artemisa fué descrita por primera vez por Wühtrich y cols. en 1984 en Suiza, donde al estudiar un grupo de 31 pacientes alérgicos a apio, se observó que el 87% de ellos eran alérgicos al polen de artemisa y el 52% alérgicos a la zanahoria¹⁷⁴. Además del apio y la zanahoria, estos pacientes presentaban múltiples sensibilizaciones, a menudo asintomáticas, a especias de la familia de las umbelíferas (anís, perejil,

hinojo, alcaravea, cilantro y anís). También se han asociado alimentos de otras familias como *Solanaceae* (pimentón), *Piperaceae* (pimienta), *Anacardiaceae* (mango) y *Liliaceae* (ajo y cebolla)¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. En el síndrome artemisa-apio-especias, el SAO aislado es poco frecuente (0-10%), mientras que sí lo son las reacciones sistémicas, sobre todo la urticaria-angioedema, y en un porcentaje no desdeñable el shock anafiláctico (3-23%). Estos pacientes presentan generalmente la clínica tanto tras el consumo del alimento crudo como cocinado^{86,169,170,173-175,178,179}, sugiriendo que los alérgenos responsables deben ser termoestables y resistentes a las proteasas digestivas.

Existe un pequeño grupo de pacientes que, además de presentar reactividad cruzada artemisa-apio-especias, presentan también sensibilización a abedul, mostrando un cuadro clínico variable, con una mayor frecuencia del SAO (no tanto como en el síndrome abedul-alimentos vegetales), pero también un número importante de reacciones sistémicas.

Desgraciadamente, todavía no se ha identificado un alérgeno concreto del polen de *Artemisia* responsable de este síndrome de reactividad cruzada artemisa-apio-especias, reconociendo estos pacientes profilinas, determinantes carbohidratos de glicoproteínas y alérgenos con un peso molecular entre 40 y 60 KDa^{160,169,170,177,179,180}.

Recientemente se ha identificado el *Art v 3*, la LTP de la artemisa, como el alérgeno responsable de la sensibilización a dicho polen en un grupo de pacientes chinos alérgicos a melocotón¹⁸¹.

1.5.1.3. Síndrome artemisa-alimentos vegetales en España

En España existen tres estudios pioneros que describen la existencia de una asociación significativa entre la sensibilización al polen de artemisa y la alergia a alimentos de origen vegetal¹⁸²⁻¹⁸⁴, sugiriendo una reactividad cruzada que en uno de ellos se demuestra mediante ensayos de RAST-inhibición¹⁸².

En nuestro país se ha descrito una reactividad cruzada importante entre los miembros de la familia *Compositae*, tanto entre los pólenes (*Artemisia*, *Chrysanthemum*, *Matricaria*, *Ambrosia*, etc.), como entre alimentos de la misma familia (lechuga, manzanilla, etc.) y el polen de artemisa¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. También se ha

demostrado reactividad cruzada con el cacahuete, frutos secos, frutas rosáceas^{182,184}, y con la miel, aunque este último parece estar en relación con la presencia de polen de artemisa y de otras compuestas en la miel¹⁸⁹.

La clínica descrita en los distintos estudios en este grupo de pacientes varía de SAO a reacciones sistémicas, como urticaria, o más graves, como anafilaxia, lo que sugiere la implicación de alérgenos estables. Aunque los datos de los estudios publicados hasta la fecha en España no son concluyentes acerca de cuáles son los alérgenos implicados, parece ser que abarcan principalmente a las profilinas y las LTP. La sensibilización a LTP, presente en el polen de artemisa (*Art v 3*) y en múltiples alimentos vegetales, es frecuente en la población española, a diferencia del centro de Europa, lo que podría explicar el distinto perfil de sensibilizaciones a alimentos observado en la reactividad cruzada con polen de artemisa. En los pacientes alérgicos a frutas rosáceas en España, las LTP son los alérgenos responsables más frecuentes^{109,190}, existiendo a menudo sensibilización asociada a *Art v 3*¹⁹¹. También se ha descrito reactividad cruzada entre el *Art v 3* y las LTP de melocotón (*Pru p 3*) y de manzana (*Mald d 3*)¹⁹¹. Además, como ya se ha mencionado, las LTP son alérgenos estables y más propensos a provocar reacciones sistémicas.

En Gran Canaria, nuestro grupo de investigación ha identificado una LTP en la col, *Bra o 3*, que podría explicar la reactividad cruzada entre crucíferas y otros alimentos vegetales como el melocotón, y que es reconocida por el 86% de los pacientes alérgicos a col, presentando reactividad cruzada con *Art v 3* y *Pru p 3*¹⁹² (ver Anexo III).

1.5.1.4. Otros síndromes pólenes-alimentos vegetales

Se ha descrito otras muchas reactividades cruzadas entre pólenes y alimentos de origen vegetal, si bien muchas de ellas no están bien definidas, y en muchos casos los alérgenos responsables no han sido identificados.

También se ha descrito reactividad cruzada entre polen de *Platanus acerifolia* y alimentos vegetales¹⁹³, sin embargo, ninguno de los alérgenos mayoritarios (*Pla a 1* y *Pla a 2*), ni la profilina de este polen, parecen ser los responsables. En cambio, sí que se ha descrito el alérgeno minoritario *Pla a 3*, una LTP, como responsable de alergia cruzada entre polen de *Platanus acerifolia* y melocotón en el área Mediterránea¹⁹⁰. Cabe destacar que la alergia a frutas

rosáceas es muy frecuente en esta área Mediterránea, incluida España, donde es la alergia a alimentos más frecuente en adolescentes y adultos jóvenes⁵⁶. En nuestro país (así como en Italia), el alérgeno con más frecuencia implicado es la LTP, siendo la vía de sensibilización primaria la ingestión de las frutas. Pero también existe un grupo de pacientes alérgicos a frutas rosáceas donde el alérgeno responsable es una profilina, de modo que la sensibilización primaria es, en este grupo, la inhalación de los pólenes.

En el sur de Europa y en la costa Mediterránea, la alergia al polen de *Olea europea* es muy frecuente, habiéndose descrito reactividad cruzada con distintos alérgenos del olivo: profilina, LTP y glucanasa¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

Hace años se postuló la posibilidad de reactividad cruzada entre polen de *Ambrosía*, melón y plátano¹⁹⁸, sin embargo, esto es poco probable, dado que en una serie de 140 pacientes mono-sensibilizados al polen de ambrosía, ninguno de ellos presentó reacciones adversas por alimentos vegetales, incluidos melón y plátano.

Aunque a nivel mundial el polen de gramíneas es el alérgeno inhalado más importante⁹⁶, su papel en síndromes de reactividad cruzada con alimentos vegetales no está claro. Se ha identificado profilinas en los pólenes de gramíneas, pero la mayoría de los pacientes con reactividad cruzada entre estas profilinas y otras similares de alimentos vegetales, no muestran clínica en las pruebas de exposición oral con el alimento correspondiente¹⁹⁹. Se ha observado también reactividad cruzada IgE a determinantes carbohidratos de glicoproteínas en pacientes alérgicos al polen de gramíneas, pero con pobre valor biológico^{162,200}.

1.5.2. Otros síndromes de reactividad cruzada con alimentos

Además de los síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos vegetales, existen otras asociaciones ampliamente descritas entre otros alérgenos inhalados y alimentos.

Sin duda, en nuestro entorno, el síndrome de alergia cruzada más importante es el **síndrome de alergia ácaros-mariscos**. De hecho, los alérgenos inhalados más frecuentes en las Islas Canarias son los ácaros y la alergia alimentos más frecuente en pacientes adultos es la alergia a mariscos⁶². La alergia cruzada

ácaros-mariscos es debida a la tropomiosina, proteína muscular responsable de muchos casos de reactividad cruzada entre invertebrados, y presente en los ácaros del polvo: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 10) y *Dermatophagoides farinae* (Der f 10); en la cucaracha: *Periplaneta americana* (Per a 7) y en la gamba: *Penaeus aztecus* (Pen a 1). La clínica alimentaria abarca desde reacciones de SAO hasta cuadros de anafilaxia y, en ocasiones, se puede producir simplemente por inhalación del vapor de cocción de los mariscos. Es muy frecuente el rechazo al alimento por parte de los pacientes como única expresión clínica. Los más frecuentemente implicados son los crustáceos (gambas, langostinos, cangrejos, etc.) y, en mucha menor frecuencia, los moluscos (almejas, mejillones, etc.) o los cefalópodos (pulpo y calamar).

El **síndrome de alergia látex-frutas** se describió por primera vez en 1991²⁰¹. Desde entonces, se han descrito reactividades cruzadas entre la alergia al látex (*Hevea brasiliensis*) y múltiples alimentos, siendo los más frecuentes el plátano, el aguacate, la castaña y el kiwi, que además son más propensos a causar reacciones graves^{202,203}. Otros alimentos, también asociados pero con menor frecuencia, son el higo, la papaya, la papa, la piña, el tomate, la yuca, el curry, etc. Las quitinasas de clase I (Hev b 6, Hev b 11) parecen ser los panalérgenos responsables del síndrome látex-frutas^{102,204}, aunque otros alérgenos como la profilina (Hev b 8) o la LTP (Hev b 12), pueden también jugar un papel importante en algunos casos.

En el **síndrome gato-cerdo**, los pacientes presentan clínica respiratoria por alergia a epitelio de gato y clínica alimentaria por la ingestión de carne de cerdo²⁰⁵⁻²⁰⁷. El alérgeno responsable parece ser la albúmina de mamífero²⁰⁷, aunque otros alérgenos podrían estar involucrados.

El **síndrome ave-huevo** agrupa pacientes con clínica respiratoria por plumas, o derivados dérmicos de aves, y con alergia alimentaria a yema de huevo de gallina. El alérgeno responsable es la albúmina sérica de ave²⁰⁸, siendo la vía primaria de sensibilización su inhalación²⁰⁹. Es por tanto lógico que pueda aparecer reactividad cruzada con huevos y plumas de otras especies de aves²¹⁰.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La alergia a alimentos es una patología cuya prevalencia va en aumento en los últimos años. Según datos de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) la alergia a alimentos afecta a más de 17 millones de europeos, especialmente a los niños. En España, los alergólogos estiman que cerca de dos millones de personas son alérgicas a alimentos. Además, una de las causas más frecuentes de anafilaxia son los alimentos.

Aunque tradicionalmente la alergia a mostaza se ha considerado una entidad poco frecuente, desde hace unos años cada vez va teniendo más importancia dentro de las alergias alimentarias, no sólo por su frecuencia sino también por la gravedad de las reacciones que produce, como demuestra el hecho que las directivas de etiquetado de alimentos de la Unión Europea la incluyan en las listas de alimentos potencialmente más alergénicos.

Este hecho se viene observando también en la última década en las consultas de alergología de los dos Hospitales de referencia de nuestra isla, dónde hemos atendido con frecuencia creciente a pacientes con sospecha de haber padecido una reacción alérgica tras la ingestión de mostaza.

En los últimos años se han descrito múltiples síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos de origen vegetal con una clara influencia geográfica en cuanto a los pólenes y a los alimentos implicados, explicada en parte por la variabilidad polínica entre los distintos hábitats y la variabilidad de las costumbres dietéticas en las distintas regiones.

Para el diseño del presente estudio nuestra hipótesis de trabajo es que en nuestro medio la alergia a mostaza es una patología relevante y su asociación con la alergia al polen de artemisa, así como con la alergia a otros alimentos de origen vegetal, puede ser explicada por la existencia de un nuevo síndrome de reactividad cruzada.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos primarios

De acuerdo con la hipótesis anterior el presente estudio se diseñó con los siguientes objetivos primarios:

- Analizar e identificar las reactividades cruzadas entre polen de artemisa y alimentos de origen vegetal en el área centro y norte de Gran Canaria.
- Describir y analizar las características clínicas de los pacientes alérgicos a mostaza en el área centro y norte Gran Canaria.

3.2. Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios de este estudio han sido:

- Estimar la prevalencia de alergia al polen de artemisa en la población que acude a la consulta de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.
- Establecer un protocolo fiable y reproducible de pruebas de exposición oral controlada doble ciego contra placebo para el diagnóstico de alergia a mostaza.
- Identificar, si es posible, un punto de corte de prueba percutánea (prick test) con mostaza que muestre una alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de alergia a mostaza.
- Evaluar la reactividad cruzada entre la mostaza y otros miembros de la familia *Brassicaceae*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el diseño del estudio se reclutaron dos grupos de pacientes, un grupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa de nuevo diagnóstico y otro grupo de pacientes alérgicos a mostaza.

4.1. Pacientes

El grupo de pacientes alérgicos a artemisa se seleccionó de la muestra de pacientes que acudieron por primera vez a consulta en la Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, donde se atienden tanto niños como adultos, durante un período de reclutamiento de siete meses. El único criterio de inclusión fue la sensibilización cutánea (prick test positivo) al polen de *Artemisia vulgaris*. Los criterios de exclusión fueron el padecimiento de alguna patología médica o psiquiátrica que impidiera la realización del protocolo de estudio o, claro está, que el paciente rehusara la participación en el mismo.

El grupo de pacientes alérgicos a mostaza se seleccionó de entre todos los pacientes, tanto de nuevo diagnóstico como ya conocidos, que acudieron a nuestra Sección de Alergología durante el periodo de un año. Se eligieron tanto a niños como adultos, siendo los criterios de inclusión el presentar una sensibilización cutánea (prick test positivo) a extracto comercial de mostaza y referir historia clínica de reacción adversa inmediata tras la ingestión de mostaza sugestiva de ser mediada por IgE. Los criterios de exclusión fueron los mismos que en el grupo anterior.

El protocolo de estudio aplicado a ambos grupos consistió en la cumplimentación de un cuestionario clínico detallado, la realización de pruebas cutáneas con una extensa batería de alérgenos, tanto de alérgenos inhalados como de alérgenos alimentarios, y en la extracción de sangre para pruebas *in vitro*.

El cuestionario clínico, que se muestra en el Anexo I, incluyó datos de filiación de los pacientes (edad, fecha de nacimiento, sexo, raza, lugar de residencia habitual y número de historia clínica), una anamnesis respiratoria completa (naturaleza, evolución y gravedad de la patología respiratoria y tratamientos actuales y previos), así como una anamnesis detallada de alergia

alimentaria (alimentos implicados y alimentos tolerados, número de reacciones, tiempo de latencia entre la ingestión del alimento y la clínica, tipo e intensidad de las reacciones, duración de las mismas y tratamiento precisado para su control). Además, se recogieron otros antecedentes personales médicos y quirúrgicos relevantes y también los antecedentes familiares (atópicos y no atópicos), de todos los pacientes incluidos en el estudio.

Al grupo de pacientes alérgicos a mostaza se les sometió además a pruebas de exposiciones orales controladas doble ciego contra placebo con mostaza, siempre y cuando estas provocaciones no estuvieran contraindicadas y el paciente aceptara por escrito someterse a dicha prueba.

La parte experimental de la presente tesis se llevó a cabo cumpliendo con las normas de buena práctica clínica y con los principios éticos recogidos en la Declaración de Helsinki²¹¹. Todos los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio, así como de las características de las exploraciones complementarias y de los posibles riesgos e inconvenientes asociados con las mismas. Todos ellos otorgaron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

4.2. Sujetos controles

Para el grupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa se seleccionaron como controles pacientes alérgicos a ácaros del polvo que acudían por primera vez a consulta de alergia.

Para el grupo de pacientes alérgicos a mostaza se seleccionó como población control sujetos alérgicos a ácaros del polvo, siendo un criterio de exclusión presentar sensibilización a mostaza o referir algún tipo de clínica tras la ingestión de la misma.

A todos los sujetos controles se les realizó el mismo protocolo de estudio (cuestionario clínico, pruebas cutáneas en prick con alérgenos y extracción de sangre para estudio *in vitro*), a excepción de las pruebas de exposición oral con mostaza.

Para comprobar el correcto enmascaramiento de la salsa de mostaza en el vehículo elegido para las pruebas de exposición oral controlada se eligieron quince voluntarios sanos no alérgicos a mostaza a los que sólo se les realizó dicha prueba de exposición oral controlada en doble ciego contra placebo.

Todos los sujetos controles seleccionados aceptaron voluntariamente su inclusión en el estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

4.3. Pruebas percutáneas por punción

Las pruebas percutáneas por punción o "prick test" se realizaron siguiendo el procedimiento estándar²¹²⁻²¹⁸. Se depositó sobre la piel una gota de cada extracto comercial alérgico a testar y, posteriormente se puncionó a través de cada gota, en dirección perpendicular a la piel, con una lanceta estéril con una punta de 1 mm (ALK-Abelló, España)²¹⁹. Se usó una lanceta individual para cada extracto. Las gotas correctamente identificadas de cada uno de los extractos a testar se colocaron en la superficie volar del antebrazo, manteniendo una separación entre ellas mayor de 2 cm, a una distancia de 5 cm de la muñeca y de 3 cm de la fosa antecubital²²⁰. Se utilizó clorhidrato de histamina (10 mg/ml) como control positivo y una solución de glicerina y suero fisiológico al 50% como control negativo. La lectura de la prueba se realizó a los 15 minutos tras la punción, midiéndose el diámetro promedio de la pápula o habón, resultado de la suma del diámetro mayor y el ortogonal obtenido en su punto medio, medidos en milímetros, dividido por dos. Se consideró positivo un resultado mayor ó igual a 3 mm comparado con el control negativo^{212-217,221}.

En algunas ocasiones los extractos comerciales de alimentos son de una calidad menor a la deseable, lo que da lugar a falsos negativos en los prick test. Por ello se realizó con determinados alimentos la técnica de "prick-prick test", que consiste en puncionar en primer lugar el alimento fresco (la fruta o el vegetal correspondiente) y posteriormente con la misma lanceta puncionar la piel.^{114,115}

Antes de realizar las pruebas percutáneas en cada paciente, se confirmó que no habían recibido tratamiento previo con aquellos medicamentos que pueden inhibir el resultado de dichas pruebas (antihistamínicos,²²²⁻²²⁴ β -adrenérgicos,²²⁵

antidepresivos²²⁶⁻²²⁸ o corticoides^{229,230}), según los plazos establecidos que se reflejan en la Tabla MM1.

Tabla MM1. Medicamentos que inhiben los resultados de los prick test: período en el que deben evitarse antes de la prueba.

Antihistamínicos:	
- Difenhidramina, clorfeniramina, tripelenamina:	1-3 días
- Loratadina, desloratadina, terfenadina, prometacina, rupatadina:	3-4 días
- Azelastina, cetirizina, levocetirizina, ciproheptadina, ebastina, fexofenadina, hidroxicina, mequitazina, mizolastina:	3-10 días
- Ketotifeno:	1-2 meses
β-adrenérgicos: sólo por vía oral o parenteral:	24-48 horas
Antidepresivos:	
- Doxepina:	7 días
- Desimipramina:	2 días
Corticoides tópicos:	7 días

Las pruebas percutáneas se realizaron con una batería de extractos comerciales (ALK-Abelló, Bial-Arístegui, CBF-Leti y Allergy Therapeutics; España) de alérgenos inhalados habituales, incluyendo:

- Ácaros del polvo:
 - *Dermatophagoides pteronyssinus*
 - *Dermatophagoides farinae*
 - *Tyrophagus putrescentiae*
 - *Euroglyphus maynei*
 - *Lepidoglyphus destructor*
 - *Acarus siro*
 - *Blomia tropicalis*

- Hongos:
 - *Aspergillus fumigatus*
 - *Cladosporium herbarum*
 - *Alternaria Alternata*

- Pólenes de árboles:
 - *Olea europea*
 - *Betula verrucosa*
 - *Corylus avellana*
 - *Fagus grandifolia*
 - *Quercus alba*
 - *Ulmus americana*
 - *Platanus acerifolia*
 - *Fraxinus excelsior*
 - *Populus alba*
 - *Cupressus sempervirens*

- Pólenes de gramíneas:
 - *Lolium perenne*
 - *Dactylis glomerata*
 - *Anthoxanthum odoratum*
 - *Cynodon dactylon*
 - *Poa pratensis*
 - *Secale cereale*
 - *Avena Sativa*
 - *Triticum aestivum*
 - *Hordeum vulgare*
 - *Zea mays*

- Pólenes de malezas:
 - *Artemisia vulgaris*
 - *Chrysanthemum leucanthemum*
 - *Taraxacum vulgare*
 - *Plantago lanceolata*
 - *Chenopodium alba*
 - *Salsola Kali*
 - *Solidago virgaurea*

- *Atriplex lentiformis*
- *Helianthus annuus*
- *Parietaria judaica*
- *Urtica dioica*

- Epitelios de animales:
 - gato
 - perro
 - conejo
 - caballo
 - cucaracha

- Látex

Del mismo modo, se realizaron pruebas cutáneas con una batería de alimentos comunes, incluyendo:

- Alimentos de origen animal:
 - Leche de vaca
 - Clara de huevo
 - Yema de huevo
 - Pescado blanco
 - Pescado azul
 - Langosta
 - Calamar

- Alimentos de origen vegetal:
 - Frutos secos: avellana, castaña, pipa de girasol y nuez
 - Frutas rosáceas: melocotón, almendra y manzana
 - Harinas: trigo, maíz y cebada
 - Leguminosas: soja, cacahuete, lenteja, garbanzo y guisante
 - Umbelíferas: apio y zanahoria
 - Crucíferas o *Brassicaceae*: mostaza (*Sinapsis alba*), col y coliflor
 - Otros: plátano, kiwi, aguacate y pimienta

Las pruebas cutáneas con apio, zanahoria, pimienta, col y coliflor fueron realizadas con la técnica de prick-prick test, que también fue la técnica usada para las pruebas con la salsa de mostaza en los pacientes a los que se les realizó las

pruebas de exposición oral controlada con mostaza. El resto de pruebas cutáneas con alimentos se realizaron mediante prick test con extractos comerciales.

4.4. Pruebas de exposición oral con alimentos

Las pruebas de exposición o provocación oral controlada doble ciego contra placebo (POCDCCP) se realizaron según los consensos internacionales de alergia^{50,122,231,232}. Por tanto, no se realizaron en aquellos pacientes con una historia clínica clara de anafilaxia¹¹¹ por ingestión de mostaza o cualquier otra contraindicación para la prueba de provocación^{231,232}.

4.4.1. Enmascaramiento de la salsa de mostaza

Para las POCDCCP se usó una salsa de mostaza amarilla comercial libre de metabisulfitos, cuya composición era: semillas de *Sinapsis alba* (14%), agua, vinagre, sal, cúrcuma, pimentón y clavo. Para camuflar dicha salsa de mostaza, de manera que el paciente no fuera capaz de identificarla, se realizaron varias recetas de enmascaramiento que se probaron en voluntarios sanos, hasta conseguir una receta compuesta por una mezcla de yogur natural, extractos de limón y vainilla, azúcar, sal y colorante amarillo, cuya composición exacta se muestra en la Tabla MM2.

En dichos voluntarios sanos se realizó una POCDCCP con 10 gramos de salsa de mostaza, recogiendo datos no sólo de si eran capaces de identificar la presencia de mostaza en las muestras, sino también si presentaban alguna sensación de picor o parestesias que pudiera confundirse con síntomas asociados a un SAO.

Obviamente, se comprobó que todos los pacientes toleraban todos los ingredientes que formaban parte de dicha receta, así como los ingredientes de la salsa de mostaza, exceptuando claro está las semillas de mostaza.

Tabla MM2: Recetas de enmascaramiento de la salsa de mostaza para las provocaciones orales controladas doble ciego contra placebo en pacientes alérgicos a mostaza.

Placebo	Salsa de mostaza
125 g de yogur natural + 0,5 ml de vinagre + 0,25 ml de colorante amarillo + una pizca de sal	115 g de yogur natural + 10 g de salsa de mostaza
4 ml de extracto de vainilla + 1,75 ml de extracto de limón + 16 g de azúcar	

4.4.2. Preparación y aleatorización del doble ciego

Para asegurar el doble ciego, una vez elaboradas las preparaciones de placebo y de salsa de mostaza, se ponían en recipientes idénticos y la misma persona que se encargaba de dicha preparación marcaba ambos recipientes, para identificar placebo *versus* salsa de mostaza. Posteriormente forraba los recipientes con papel de aluminio ocultando las marcas identificativas. Esta persona ya no volvía a participar en la POCDCCP.

A continuación, otra persona marcaba sobre el papel de aluminio las preparaciones como "A" ó "B", sin saber cuál correspondía a la salsa de mostaza.

Previamente se habían preparado 100 sobres idénticos con una nota dentro, dónde se especificaba el orden de administración de las preparaciones, 50 sobres dónde la primera preparación era A y 50 sobres dónde la primera era B. Dichos sobres estaban todos mezclados en una caja de dónde se extraían aleatoriamente antes de cada POCDCCP.

4.4.3. Administración de las preparaciones

Las recetas se elaboraban la misma mañana en el laboratorio de pruebas *in vivo* de la Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, administrándose a cada paciente las dos preparaciones con un intervalo de 2 horas, de manera aleatoria primero el placebo o la salsa de mostaza, tal y como se describe en el apartado anterior. Se administraron dosis crecientes (80, 240, 800, 2400 y 6480 mg) a intervalos de 15 minutos, hasta la aparición de síntomas o

hasta alcanzar una dosis acumulada de salsa de mostaza de 10 gramos (correspondiente a 1400 mg de semillas de mostaza amarilla).

Para confirmar el diagnóstico de alergia a mostaza, el paciente debía presentar síntomas sugestivos de ser mediados por IgE tras la exposición oral con salsa de mostaza y, además, ausencia de los mismos tras la exposición oral al placebo. A aquellos pacientes que presentaron un resultado negativo en la POCDCCP que querían comer mostaza sin restricciones se les propuso una prueba de exposición oral controlada en abierto con 25 gramos de salsa de mostaza (3500 mg de semillas de mostaza amarilla).

4.5. Pruebas de laboratorio

Todas las pruebas *in vitro*, incluidos los ensayos de CAP-inhibición se realizaron en el laboratorio de la Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.

4.5.1. IgE total e IgE específicas.

Tanto en todos los pacientes que participaron en este estudio como en los sujetos controles incluidos se realizaron determinaciones de IgE total y de IgE específica al polen de artemisa, a mostaza, col, coliflor, brécol y cualquier otro alimento sospechoso de ser la causa de una reacción adversa. Para dichas determinaciones se usó el sistema de inmunoensayo enzimático automatizado UniCAP (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia)^{233,234}, siguiendo las instrucciones del fabricante. Aunque algunos autores han propuesto nuevos valores de referencia de la IgE total²³⁵ en nuestro estudio preferimos continuar usando los clásicos propuestos por Dati *et al*²³⁶:

- Recién nacidos: <1,5 kU/L
- De 1 a 5 años: <60 kU/L
- De 6 a 9 años: <90 kU/L
- De 10 a 15 años: <200 kU/L
- Adultos: <100 kU/L

Se consideraron IgE específicas positivas las superiores a 0,35 kU/L²³⁷.

4.5.2. Ensayos de CAP-inhibición

Para investigar la posible existencia de reactividad cruzada *in vitro* se realizaron ensayos de CAP-inhibición. Estos ensayos, de manera general, consisten en tratar de demostrar la reactividad cruzada entre dos alérgenos, A y B. Para ello, se selecciona un suero que posea anticuerpos IgE específicos, conocidos y en cantidad suficiente (>3,5 kU/L), frente a los dos alérgenos. Dicho suero se incubaba con distintas concentraciones del alérgeno A y, posteriormente, se determinan las IgE específicas frente a B. De este modo, si los niveles de IgE específicas frente a B disminuyen a medida que aumenta la concentración del alérgeno A, existe reactividad cruzada entre A y B. La explicación de este hecho, como describimos previamente, es la similitud de secuencia de aminoácidos entre los epítomos de A y B, que conlleva que la IgE específica frente a B se una también al alérgeno A en el suero, produciendo así una disminución de los valores de IgE específica libre frente a B cuando realizamos las determinaciones en CAP.

En nuestro estudio, se mezcló el suero de 5 pacientes alérgicos a la mostaza, todos ellos con valores de IgE específicas elevados (superiores a 3,5 kU/L), tanto frente a mostaza como frente al polen de artemisa. De esa mezcla de sueros sin diluir se extraía 50 µl, para añadirle seguidamente otros 50 µl de 5 diluciones progresivas al 1/10 de una solución inhibidora en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, conteniendo 0,03% (peso/volumen) de albúmina sérica. Los inhibidores usados fueron extractos comerciales de mostaza (Bial-Arístegui, España), *Artemisia vulgaris* (ALK-Abelló, España) y *Cladosporium herbarum* - hongo que se usó como control negativo- (ALK-Abelló, España). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente se determinó mediante el sistema UniCAP los niveles de IgE específica a mostaza y polen de artemisa para averiguar la tasa de inhibición recíproca. El protocolo de laboratorio se puede consultar en el Anexo II. Se realizaron ensayos de inhibición similares con los 5 sueros de manera individual y con los mismos extractos inhibidores, pero en este caso sin diluir.

Del mismo modo se obtuvo el suero de 11 pacientes con IgE específicas superiores a 3,5 kU/L frente a col, coliflor y brécol, y que además referían síntomas tras la ingestión de dichos vegetales. De la mezcla de dichos sueros se extrajeron muestras de 50 µl que, a su vez, se mezclaron con 50 µl de los mismos extractos inhibidores mencionados arriba, determinando esta vez los valores de IgE específicas frente a col, coliflor y brécol, también mediante el sistema UniCAP.

4.6. Análisis estadístico

Para la realización de todos los análisis estadísticos se usó el programa informático SPSS v15.

Para comprobar la distribución normal de las variables continuas se usó el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar medias de variables continuas se usó la prueba de t de Student realizando previamente la prueba de Levene para evaluar la igualdad de las varianzas. Se usó la prueba de chi-cuadrado para comparar las variables categóricas cualitativas.

Para el manejo estadístico de los datos de IgE, se asignó el valor 0 kU/L a los resultados de <0,35 kU/L, el valor 2000 kU/L para resultados >2000 kU/L y el valor 100 kU/L para los resultados >100 kU/L. Para hallar las medias de la IgE total en las muestras se eligió la media geométrica, debido a las características de la variable. Sin embargo, para determinar las medias de la IgE específica se prefirió la media aritmética, ya que la media geométrica sólo es relevante si todos los datos de la muestra son positivos, de modo que si uno de los datos es 0 entonces la media geométrica sería 0.

Para evaluar el rendimiento diagnóstico de la prueba cutánea en prick con extracto comercial de mostaza, del prick-prick con salsa de mostaza y de la IgE específica a mostaza, se recurrió al cálculo del área bajo la curva (AUC), de la curva ROC (característica operativa del receptor).

Un valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características generales

5.1.1. Grupo de alérgicos a artemisa

Durante el periodo de inclusión de siete meses, un total de 1080 pacientes acudieron por primera vez a nuestra Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, siendo atópicos (historia clínica personal o familiar de alergia + prick test positivo a alérgenos inhalados) el 65,6% de ellos (708 pacientes). Sólo cuarenta y dos de los 1080 pacientes estaban sensibilizados al polen de artemisa (3,9%) y fueron incluidos en el estudio. Por tanto, la prevalencia de sensibilización al polen de artemisa en los sujetos atópicos, vistos en nuestra consulta en un periodo de siete meses, fue del 5,93%.

Las características generales demográficas de estos cuarenta y dos pacientes alérgicos al polen de artemisa se resumen en la Tabla R1. La edad media \pm desviación estándar (DE) fue de $24,8 \pm 11,5$ años, con un rango de 6 a 72, y con sólo cinco pacientes por debajo de 14 años. En la muestra existía un predominio de mujeres (23:19).

El motivo de consulta más frecuente fue la clínica nasal, en veinticuatro de ellos (57,1%), seguido de clínica bronquial, en cuatro pacientes (9,5%). Otros motivos de consulta fueron:

- urticaria/angioedema: tres pacientes (7,1%)
- anafilaxia: tres pacientes (7,1%),
- reacción adversa con medicamentos: tres pacientes (7,1%)
- reacción adversa con alimentos: tres pacientes (7,1%)
- clínica tanto nasal como bronquial: un paciente (2,3%)
- dermatitis: un paciente (2,3%)

Tabla R1. Características generales de los 42 pacientes alérgicos al polen de artemisa.

Nº de paciente	Edad	Sexo	Síntomas atópicos (clínica respiratoria)	IgE total (kU/L)
1	26	F	Rinitis	57
2	23	F	Rinitis	361
3	14	F	Rinitis	350
4	25	M	-	50
5	29	F	Rinitis, Asma Bronquial	221
6	24	M	Rinitis, Asma Bronquial	115
7	24	F	Rinitis, Asma Bronquial	1234
8	39	F	Rinitis	294
9	11	M	Rinitis	83
10	27	F	Rinitis, Asma Bronquial	681
11	6	M	Rinitis, Asma Bronquial	>2000
12	15	M	Asma Bronquial	130
13	29	M	Rinitis	314
14	28	M	Rinitis, Asma Bronquial	735
15	7	M	Rinitis, Asma Bronquial	488
16	10	M	Rinitis, Asma Bronquial	254
17	34	M	Asma Bronquial	141
18	34	M	Rinitis	105
19	23	M	Rinitis	26
20	72	M	Rinitis	898
21	19	M	Rinitis	145
22	19	M	Rinitis	635
23	17	M	Rinitis, Asma Bronquial	78
24	33	M	Rinitis, Asma Bronquial	113
25	16	M	Rinitis	653
26	30	F	Rinitis, Asma Bronquial	171
27	30	F	Rinitis	166
28	18	F	Rinitis	294
29	15	F	Rinitis	771
30	15	F	Rinitis, Asma Bronquial	194
31	30	F	Rinitis	242
32	24	F	Rinitis, Asma Bronquial	261
33	24	F	Rinitis, Asma Bronquial	895
34	23	F	Rinitis	256
35	23	F	Rinitis, Asma Bronquial	650
36	34	F	Rinitis	71
37	20	F	Rinitis, Asma Bronquial	197
38	44	F	Rinitis	120
39	32	F	Rinitis	36
40	31	F	Rinitis	490
41	10	M	Rinitis, Asma Bronquial	238
42	33	F	Rinitis, Asma Bronquial	113

F: femenino; M: masculino.

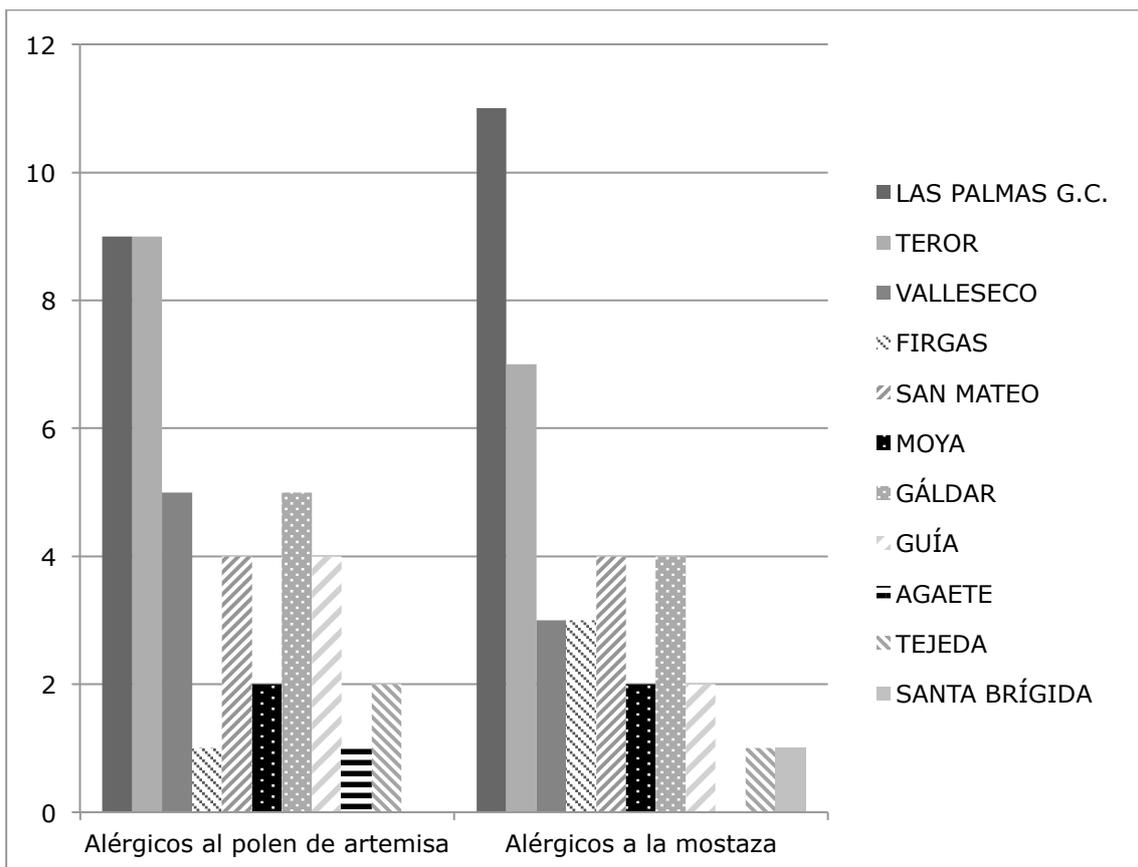
Todos los pacientes a excepción de uno referían clínica respiratoria (97,6%). De estos cuarenta y un pacientes atópicos alérgicos al polen de artemisa, veintiuno padecían rinitis (51,2%), dieciocho padecían tanto rinitis como asma bronquial (43,9%) y dos sólo presentaban asma bronquial (4,9%). No se encontraron diferencias significativas en los distintos motivos de consulta ($p=0,986$) ni en la

clínica respiratoria diagnosticada ($p=0,722$) entre el grupo de estudio y el grupo control.

La IgE total variaba en un rango que iba desde 26 hasta >2000 kU/L, con una media geométrica de 232,28 kU/L, estando dentro de los límites normales²³⁶ en nueve pacientes (21,4%) y sin existir diferencias significativas con el grupo control.

En la Figura R1 se muestran los municipios donde residían habitualmente los pacientes del presente estudio. Observamos que los pacientes del grupo de alérgicos al polen de artemisa vivían en Las Palmas de Gran Canaria y Teror en su mayoría, y el resto distribuidos en Valleseco, Gáldar, Guía y San Mateo, principalmente.

Figura R1: Municipio habitual de residencia del grupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa y del grupo de alérgicos a la mostaza



5.1.2. Grupo de alérgicos a mostaza

Treinta y ocho pacientes fueron incluidos en el grupo de alérgicos a mostaza (Tabla R2). La edad media (\pm DE) fue de $22,3 \pm 9,1$ años (rango de 3 a 41), con cinco pacientes menores a 14 años y con un ligero predominio de la mujeres (20:18).

Treinta y cinco pacientes (92,1%) referían clínica respiratoria y, entre ellos, la clínica más frecuentemente observada fue rinitis asociada a asma bronquial, que aparecía en veinte de los treinta y cinco (57,1%), mientras que trece de ellos sólo presentaban rinitis (37,1%) y dos sólo asma bronquial (5,7%). En cuatro pacientes se observó dermatitis atópica asociada a la clínica respiratoria.

El rango de IgE total era de 12 a 2000 kU/L, con una media geométrica de 250,4 kU/L, estando dentro de los límites normales²³⁶ en diez pacientes (26,3%).

La mayoría de estos pacientes alérgicos a mostaza vivían en Las Palmas de Gran Canaria (Figura R1), siendo el segundo lugar de residencia habitual Teror, seguido en menor frecuencia por, San Mateo, Gáldar, Firgas y Valleseco, principalmente.

Tabla R2. Características generales de los 38 pacientes alérgicos a mostaza

Nº de paciente	Edad	Sexo	Síntomas atópicos (clínica respiratoria)	IgE total (kU/L)
1	24	F	Rinitis, Asma bronquial	1234
2	18	F	Rinitis, Asma bronquial	12
3	23	F	Rinitis	361
4	39	F	Rinitis	294
5	14	F	Rinitis	350
6	26	F	Rinitis	57
7	25	M	-	49
8	31	M	Rinitis, Asma bronquial	158
9	29	F	Rinitis, Asma bronquial	221
10	15	F	Rinitis,	95
11	24	M	Rinitis, Asma bronquial	115
12	15	M	Rinitis, Asma bronquial	1516
13	28	F	Rinitis, Asma bronquial	322
14	17	M	Rinitis	78
15	41	F	Rinitis, Asma bronquial	241
16	15	M	Rinitis, Asma bronquial	212
17	11	M	Rinitis	82
18	26	F	Rinitis	596
19	8	M	Rinitis	309
20	9	M	Rinitis, Asma bronquial	>2000
21	27	F	Rinitis, Asma bronquial	681
22	6	M	Rinitis, Asma bronquial	>2000
23	15	M	Asma bronquial	130
24	3	M	Rinitis, Asma bronquial	308
25	29	M	Rinitis	314
26	16	M	Rinitis	739
27	24	F	Asma bronquial	895
28	23	F	Rinitis	256
29	20	F	-	45
30	33	F	Rinitis, Asma bronquial	113
31	35	F	Rinitis, Asma bronquial	36
32	28	M	Rinitis	294
33	37	F	Rinitis, Asma bronquial	>2000
34	29	M	Rinitis, Asma bronquial	448
35	28	F	-	39
36	17	M	Rinitis, Asma bronquial	349
37	23	F	Rinitis, Asma bronquial	650
38	15	M	Rinitis, Asma bronquial	309

F: femenino; **M:** masculino.

5.2. Sensibilizaciones a alérgenos inhalados

5.2.1. Grupo de alérgicos a artemisa

En la Tabla R3 se muestra la sensibilización a otros alérgenos inhalados en los pacientes alérgicos a artemisa. Obviamente, dado que era un criterio de inclusión en el estudio, las pruebas cutáneas en prick test con polen de artemisa eran negativas en todos los sujetos controles y positivas en todos los pacientes de la muestra, con una diámetro de pápula (media \pm DE) de $5,9 \pm 2,6$ mm (rango de 3 a 15). La IgE específica a artemisa fue positiva en treinta pacientes (71,4%) con una media (\pm DE) de $11,39 \pm 22,35$ kU/L (rango de $<0,35$ a >100), siendo negativa en todos los controles.

Treinta y un pacientes (73,8%) estaban sensibilizados ácaros del polvo y veinticinco (59,5%) a epitelios de animales. Se encontró sensibilización a hongos en cuatro pacientes (9,5%) y a látex en dos pacientes (4,8%). No se objetivaron diferencias significativas respecto al grupo control en las sensibilizaciones a animales ($p=0,51$), hongos ($p=0,167$) o látex ($p=0,152$).

En total, cuarenta y un pacientes, es decir un 97,6% de los pacientes alérgicos al polen de artemisa, estaban sensibilizados a otros pólenes (Tabla R3), mostrando diferencias muy significativas ($p<0,001$) respecto al grupo control. Treinta y nueve pacientes presentaron prick positivo al polen de otras malezas (92,9%), siendo las más frecuentes *Chrysanthemum* ($n=30$), *Taraxacum* ($n=20$) y *Plantago* ($n=20$). En treinta y un casos se observó sensibilización al polen de árboles (73,8%), con *Ulmus* ($n=19$), *Fraxinus* ($n=15$) y *Olea* ($n=13$) como máximos representantes, siendo menor la sensibilización a polen de *Betula* ($n=9$); y en veintitrés pacientes apareció sensibilización al polen de gramíneas (54,8%), siendo las más observadas *Triticum* ($n=16$), *Avena* ($n=15$), *Poa* ($n=15$) y *Lolium* ($n=15$).

Tabla R3. Sensibilizaciones a alérgenos inhalados en pacientes alérgicos al polen de artemisa.

Nº	Polen de artemisa		Otros pólenes*	Otros alérgenos inhalados
	Prick (mm)	IgE específica (kU/L)		
1	6	5,26	malezas, gramíneas, árboles	-
2	7	3,29	malezas, árboles	-
3	5	42,9	malezas, árboles	ácaros, animales
4	3	1,44	malezas, árboles	-
5	4	1,15	malezas, árboles	-
6	4	<0,35	malezas, árboles	ácaros, animales
7	10	64,7	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
8	3	<0,35	malezas, árboles	ácaros, animales, hongos
9	3	<0,35	-	ácaros
10	5	24,6	malezas, árboles	ácaros, animales
11	9	83,5	malezas	ácaros, animales
12	3	0,55	malezas, gramíneas, árboles	animales, hongos
13	7	1,4	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
14	3	<0,35	malezas, árboles	ácaros, animales
15	5	18,26	malezas	ácaros
16	5	<0,35	malezas, árboles	ácaros
17	6	<0,35	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
18	15	17,19	malezas, gramíneas, árboles	animales, látex
19	3	<0,35	gramíneas	ácaros, animales
20	7	13,26	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales, látex
21	7	0,82	gramíneas	-
22	8	2,87	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
23	4	1,74	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
24	7	<0,35	malezas, gramíneas, árboles	animales
25	5	2,71	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales, hongos
26	6	12,97	malezas, gramíneas	ácaros, animales
27	4	1	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
28	7	>100	malezas, árboles	ácaros
29	10	6,96	malezas, árboles	ácaros, animales
30	3	<0,35	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
31	5	7,91	Malezas	ácaros, animales
32	5	<0,35	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
33	5	15	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales, hongos
34	3	0,65	malezas, gramíneas	ácaros,
35	5	28,1	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
36	5	<0,35	malezas	-
37	9	1,09	malezas	ácaros, animales
38	10	11,29	malezas, árboles	ácaros
39	5	<0,35	malezas, gramíneas, árboles	animales
40	3	5,17	malezas, gramíneas	-
41	3	0,44	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
42	4	2,16	malezas, árboles	ácaros, animales

Nº: número de paciente.

* Otros pólenes excluyendo polen de artemisa.

5.2.2. Grupo de alérgicos a mostaza

Igualmente se objetivaron múltiples sensibilizaciones a alérgenos inhalados en los pacientes alérgicos a mostaza (Tabla R4). Veinte y seis de ellos estaban sensibilizados a ácaros del polvo (68,4%), veintidós a epitelios de animales (57,9%), seis a hongos (15,8%) y cuatro mostraban prick positivo a látex (10,5%). No se encontraron tampoco diferencias significativas en sensibilización a hongos, animales o látex, entre este grupo de pacientes alérgicos a mostaza y el grupo control.

Treinta y siete de los treinta y ocho pacientes alérgicos a mostaza (97,4%) mostraron sensibilización cutánea al polen de *Artemisia vulgaris*, con una diámetro de pápula (media \pm DE) de $5,6 \pm 3,2$ mm (rango de 1 a 20). Además, treinta y cuatro de ellos también presentaron IgE específica positiva al polen de artemisa, con una media (\pm DE) de $11,67 \pm 21,76$ kU/L (rango de $<0,35$ a 83,5). Esta asociación fue muy significativa en comparación con el grupo control de alérgicos a ácaros del polvo ($p < 0,001$) (Tabla R4).

Treinta y cinco pacientes (92,1%) además estaban sensibilizados a otros pólenes. Los treinta y cinco estaban sensibilizados a pólenes de otras malezas (excluyendo artemisa), con *Chenopodium* y *Chrysantemun* (26 casos cada uno) como máximos exponentes; veintiocho pacientes (73,7%) al polen de árboles, siendo *Ulmus* ($n=25$) y *Platanus* ($n=15$) los más frecuentes, mientras que el de *Betula* ($n=11$) se observó con una frecuencia menor; y veinte pacientes (52,6%) al polen de gramíneas, con predominio de *Poa* ($n=14$), *Lolium* ($n=13$) y *Anthoxanthum* ($n=13$). Estas asociaciones fueron estadísticamente muy significativas ($p < 0,001$) cuando se compararon con el grupo control.

Tabla R4. Sensibilizaciones a alérgenos inhalados en pacientes alérgicos a mostaza

Nº	Polen de artemisa		Otros pólenes*	Otros alérgenos inhalados
	Prick (mm)	IgE específica (kU/L)		
1	10	64,70	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
2	4	0,76	malezas, árboles	-
3	7	3,29	malezas, árboles	-
4	3	<0,35	malezas, árboles	ácaros, hongos, animales
5	5	42,90	malezas, árboles	ácaros, animales
6	6	5,26	malezas, gramíneas, árboles	animales, látex
7	3	1,44	malezas, árboles	-
8	1	<0,35	-	ácaros, animales
9	4	1,15	malezas, árboles	-
10	6	7,75	malezas, árboles	ácaros
11	4	<0,35	malezas, árboles	ácaros, animales
12	6	3,79	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
13	5	0,64	malezas, árboles	ácaros, animales, látex
14	5	4,01	malezas	hongos
15	10	3,51	malezas, gramíneas	-
16	6	0,77	malezas, árboles	-
17	3	<0,35	-	ácaros
18	20	4,63	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
19	8	21,10	malezas, gramíneas	ácaros, hongos, animales
20	5	24,60	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, hongos, animales, látex
21	7	23,70	malezas, árboles	ácaros, animales
22	9	83,50	malezas	ácaros, animales
23	3	0,55	malezas, gramíneas, árboles	hongos, animales
24	4	2,67	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
25	7	1,40	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
26	9	0,46	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
27	5	15,00	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, hongos, animales
28	3	0,65	malezas, gramíneas	ácaros
29	8	2,62	malezas, gramíneas, árboles	-
30	4	2,16	malezas, árboles	ácaros, animales
31	4	82,80	malezas, gramíneas, árboles	ácaros
32	4	0,69	malezas, gramíneas, árboles	-
33	4	0,57	malezas, gramíneas	ácaros, animales, látex
34	5	1,00	malezas	ácaros
35	3	3,16	-	-
36	3	3,08	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
37	5	28,10	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales
38	3	1,08	malezas, gramíneas, árboles	ácaros, animales

Nº: número de paciente.

* Otros pólenes excluyendo polen de artemisa.

5.3. Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios

5.3.1. Grupo de alérgicos a artemisa

En los cuarenta y dos pacientes alérgicos al polen de artemisa se encontraron sensibilizaciones a alimentos de origen vegetal en treinta y dos de ellos (76,2%), como muestra la Tabla R5, presentando manifestaciones clínicas de alergia alimentaria veintidós (68,8% de los pacientes sensibilizados a alimentos lo que se corresponde con el 52,4% del total de sujetos alérgicos al polen de artemisa). Se identificaron múltiples alimentos de origen vegetal implicados en dichas sensibilizaciones, describiéndose un total de 350 sensibilizaciones alimentarias, siendo sintomáticas 119 de ellas (34%). Las principales manifestaciones clínicas observadas fueron: síndrome de alergia oral (62,2%), urticaria/angioedema (33,6%), anafilaxia (2,5%) y asma bronquial (1,7%).

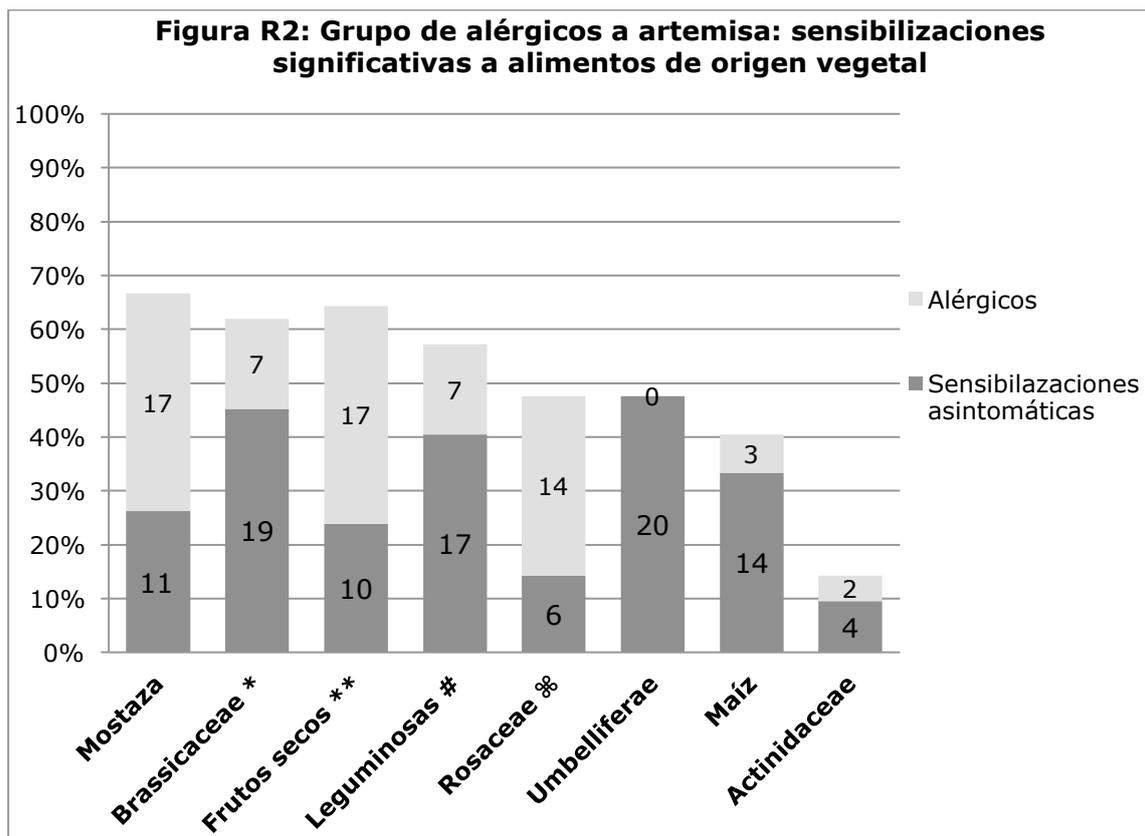
Veintiocho de los cuarenta y dos pacientes alérgicos a artemisa estaban sensibilizados a mostaza (66,7%), con síntomas clínicos asociados en diecisiete de ellos, incluyendo clínica grave de anafilaxia en dos casos (Tabla R5). El resultado del diámetro medio (media \pm DE) del habón en prueba cutánea con extracto de mostaza comercial en los pacientes alérgicos al polen de artemisa fue de $2,7 \pm 2,4$ mm (rango de 0 a 12 mm). La determinación de IgE específica a mostaza fue positiva en 19 pacientes (45,2%), con una media (\pm DE) de $1,11 \pm 1,97$ kU/L (rango de $<0,35$ a $7,71$ kU/L). Veinte y seis pacientes (61,9%) estaban sensibilizados a otros miembros de la familia *Brassicaceae* (excluyendo mostaza), refiriendo síntomas siete de ellos: cinco relataban SAO y los otros dos urticaria/angioedema. Tanto las sensibilizaciones a mostaza como a otros miembros de la familia *Brassicaceae* en los pacientes alérgicos al polen de artemisa fueron muy significativas ($p < 0,001$), comparadas con el grupo control (Figura R2).

Tabla R5. Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios en pacientes alérgicos al polen de artemisa

Nº	Mostaza			Otras sensibilizaciones a alimentos de origen vegetal
	Prick (mm)	IgE específica (kU/l)	Clínica referida	
1	5	1,74	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, umb, act
2	5	0,85	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, umb
3	5	7,69	U/AE	bra, ros, leg, sec, maíz, umb, act
4	4	1,22	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, act
5	3	<0,35	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz
6	3	<0,35	U/AE	bra, sec, maíz, umb
7	3	1,17	U/AE	bra, ros, leg, sec, maíz, umb
8	3	0,95	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, umb
9	3	1,1	SAO	bra, leg, sec
10	4	2,06	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz
11	3	4,69	U/AE	bra, leg, sec, umb, act
12	12	2,35	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, umb
13	3	6,22	U/AE	bra, ros, leg, sec, maíz, umb, act
14	3	<0,35	-	bra, ros, leg, sec, umb
15	3	<0,35	-	-
16	0	<0,35	-	-
17	3	<0,35	-	bra, ros, leg, sec, maíz, umb
18	3	1,15	-	bra, leg, sec
19	0	<0,35	-	-
20	3	<0,35	-	leg, sec, umb
21	0	<0,35	-	-
22	0	<0,35	-	leg
23	3	<0,35	-	bra, ros, leg, sec, maíz
24	0	<0,35	-	-
25	0	<0,35	-	-
26	0	<0,35	-	ros, sec
27	0	<0,35	-	-
28	0	0,57	-	umb
29	3	<0,35	-	bra, sec, umb
30	5	<0,35	-	bra, leg, sec, maíz, umb
31	0	<0,35	-	-
32	6	<0,35	-	bra, ros, sec, umb
33	6	1,31	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz, umb, act
34	4	2,01	SAO	bra, ros, leg, sec, maíz
35	3	7,71	A	bra
36	0	<0,35	-	-
37	0	<0,35	-	-
38	3	1,06	-	bra, leg, sec, umb
39	0	<0,35	-	ros
40	0	<0,35	-	-
41	4	0,86	-	bra, ros, leg, sec, umb
42	4	2,06	A	bra, ros, leg, sec, maíz, umb

Nº: número de paciente; **U/AE**: urticaria/angioedema; **SAO**: síndrome de alergia oral; **A**: anafilaxia; **bra**: familia *Brassicaceae* excluyendo mostaza; **ros**: familia *Rosaceae* incluyendo almendra; **leg**: leguminosas incluyendo cacahuete; **sec**: frutos secos excluyendo almendra y cacahuete; **umb**: familia *Umbelliferae*; **act**: familia *Actinidiaceae*.

Otras sensibilizaciones a alimentos observadas en el grupo de alérgicos a mostaza se muestran también en la Tabla R5 y en la Figura R2: frutos secos (excluyendo cacahuete y almendra) en veinte y siete pacientes (64,3%), diecisiete de ellos con manifestaciones clínicas; leguminosas (incluyendo cacahuete) en veinticuatro (57,1%), siete de ellos con clínica; frutas de la familia *Rosaceae* (incluyendo almendra) en veinte pacientes (47,6%), catorce de ellos con síntomas; familia *Umbelliferae* también en veinte pacientes (47,6%), todos ellos asintomáticos; y maíz en diecisiete pacientes (40,5%), tres de ellos con clínica. Todas estas sensibilizaciones alimentarias observadas fueron estadísticamente muy significativas ($p < 0,001$) al compararlas con el grupo control. También se objetivó una asociación significativa ($p = 0,011$) con la familia *Actinidiaceae* (kiwi) respecto al grupo control, apareciendo esta sensibilización en 6 pacientes (14,3%), dos de ellos con manifestaciones clínicas.



* Excluyendo mostaza.

** Excluyendo almendra y cacahuete.

Incluyendo cacahuete.

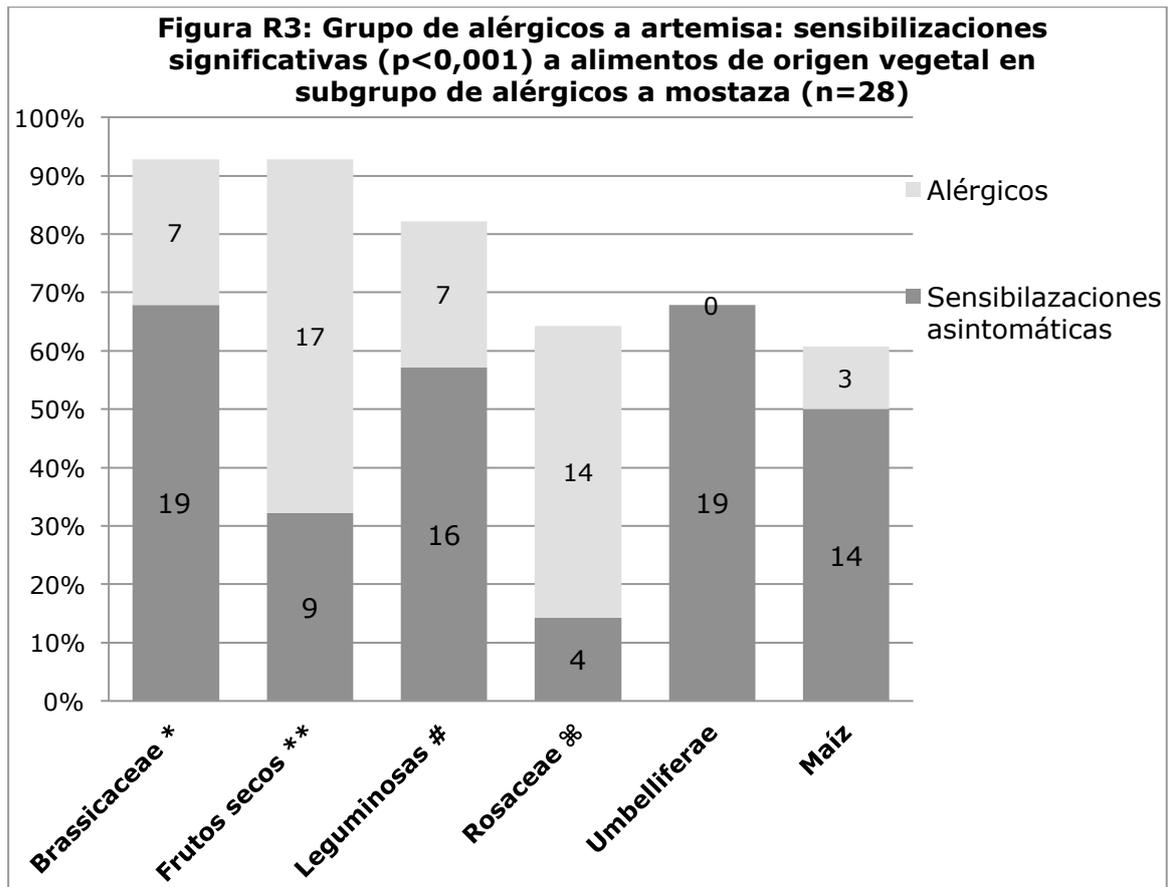
% Incluyendo almendra.

Se observaron otras sensibilizaciones alimentarias en el grupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa, pero sin que alcanzaran significación estadística respecto al grupo control, entre ellas, a la pimienta en cinco pacientes (11,9%), todos ellos asintomáticos; a otros alimentos de origen vegetal, pero en porcentajes mucho menores; y a mariscos en seis pacientes (14,3%).

Ningún paciente del grupo de los cuarenta y dos alérgicos al polen de artemisa presentó clínica de anafilaxia inducida por ejercicio por alergia a alimentos.

Veinte y uno de los veintidós pacientes alérgicos al polen de artemisa que presentaban alergia a alimentos (95,5%), referían que la clínica respiratoria había precedido a la clínica de alergia alimentaria. En el paciente restante este dato fue imposible de determinar con seguridad.

Cuando se analizó sólo el subgrupo de pacientes alérgicos al polen de artemisa que además estaban sensibilizados a mostaza (n=28), los porcentajes de sensibilización a alimentos de origen vegetal observados fueron mucho más altos (Figura R3), mostrando sensibilización a otros alimentos de la familia *Brassicaceae* (excluyendo mostaza) veintiséis pacientes (92,9%), a frutos secos (excluyendo cacahuete y almendra) también veintiséis sujetos (92,9%), a leguminosas (incluyendo cacahuete) veintitrés casos (82,1%), a la familia *Rosaceae* (incluyendo almendra) dieciocho (64,3%), a la familia *Umbelliferae* (apio y zanahoria) diecinueve pacientes (67,9%) y a maíz diecisiete (60,7%). Además, al comparar estas asociaciones alimentarias que acabamos de describir entre los dos subgrupos de pacientes alérgicos al polen de artemisa, esto es, el subgrupo de sensibilizados a mostaza (n=28) frente al subgrupo sin sensibilización a mostaza (n=14) las diferencias encontradas fueron muy significativas ($p < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos subgrupos mencionados respecto a la sensibilización a pimienta, a la familia *Actinidiaceae*, ni a ninguna otra sensibilización alimentaria observada.



* Excluyendo mostaza.

** Excluyendo almendra y cacahuete.

Incluyendo cacahuete.

† Incluyendo almendra

5.3.2. Grupo de alérgicos a mostaza

En esta muestra de alérgicos a mostaza, el prick test con extracto comercial de mostaza fue positivo en todos los pacientes (criterio de inclusión), con una pápula (media \pm DE) de $6,7 \pm 3,6$ mm; y la IgE específica a mostaza fue positiva en treinta y cinco de los treinta y ocho pacientes (92,1%), con una media (\pm DE) de $3,21 \pm 4,85$ kU/L (rango de $<0,35$ a 24 kU/L) (Tabla R6).

La clínica asociada a la ingestión de mostaza más frecuente referida por los pacientes fue el síndrome de alergia oral en dieciocho casos (47,4%), seguido de cerca por urticaria/angioedema en dieciséis (42,1%). Tres pacientes referían anafilaxia (7,9%) y otro anafilaxia inducida por ejercicio (2,7%).

Tabla R6. Sensibilizaciones a alérgenos alimentarios en pacientes alérgicos a mostaza

Nº	Mostaza			Prick-prick salsa de mostaza**	POCDCCP (síntomas- dosis# #)	Otras sensibilizaciones a alimentos de origen vegetal
	Prick*	IgE#	Clª%‡			
1	3	1,17	U/AE	4	neg	bra, sec, leg, ros, umb
2	14	1,68	SAO	6	SAO-44,8	bra, sec, leg, maíz, ros, umb, act
3	5	0,85	SAO	6	SAO-44,8	bra, sec, leg, ros, umb
4	3	0,95	SAO	5	neg	bra, sec, leg, ros, umb
5	5	7,69	U/AE	4	neg	bra, sec, leg, ros, umb, act,
6	5	1,74	SAO	6	SAO-44,8	bra, sec, leg, ros, umb, act
7	4	1,22	SAO	6	neg	bra, sec, leg, ros, act
8	10	0,75	U/AE	9	SAO-156,8	bra, sec, leg, maíz, ros, umb
9	3	<0,35	SAO	6	SAO-44,8	bra, sec, leg, ros
10	8	0,46	U/AE	6	neg	bra, sec, leg, maíz, ros, umb
11	3	<0,35	U/AE	6	neg	bra, sec, umb
12	10	1,73	SAO	9	SAO-492,8	bra, sec, leg, ros, umb
13	7	1,74	U/AE	5	neg	bra, sec, leg, ros, umb, act
14	10	0,45	U/AE	5	neg	bra, sec, leg, maíz, ros, umb, act
15	15	24	SAO	13	A-156,8	bra, sec, leg, ros, umb, act
16	7	0,91	U/AE	4	U-44,8	bra, sec, leg, ros
17	3	1,10	SAO	3	SAO-156,8	bra, sec, leg, maíz
18	7	0,50	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb
19	6	3,34	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros
20	8	9,75	A	nr	nr	bra, sec, leg, ros
21	4	2,06	SAO	nr	nr	bra, sec, leg, ros
22	3	4,69	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, maíz, umb, act
23	12	2,35	SAO	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb
24	4	0,98	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb, act
25	3	6,22	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros, act, umb
26	9	7,49	SAO	5	SAO-156,8	bra, sec, leg, maíz, ros, umb
27	6	1,30	SAO	6	neg	bra, sec, leg, ros, umb, act
28	4	2,01	SAO	8	neg	bra, sec, leg, ros
29	16	0,70	SAO	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb
30	4	2,06	A	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb
31	10	2,42	SAO	6	SAO-156,8	bra, sec, leg, ros, umb, act
32	7	17	SAO	14	SAO-44,8	bra, sec, leg, ros, umb
33	11	1,99	U/AE	8	AE/AB-156,8	bra, sec, leg, ros, umb, act
34	6	1,85	SAO	5	SAO-44,8	bra, sec, leg, ros
35	5	<0.35	AIE	nr	nr	bra, sec, leg, ros, umb, act
36	6	0,42	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros
37	3	7,71	A	nr	nr	bra, maíz
38	4	0,62	U/AE	nr	nr	bra, sec, leg, ros

* Prick en mm con extracto comercial de mostaza.

IgE específica a mostaza (kU/L).

‡ Clínica por ingestión de mostaza referida por los pacientes en historia clínica.

** Prick prick con salsa de mostaza usada para la prueba de exposición oral controlada.

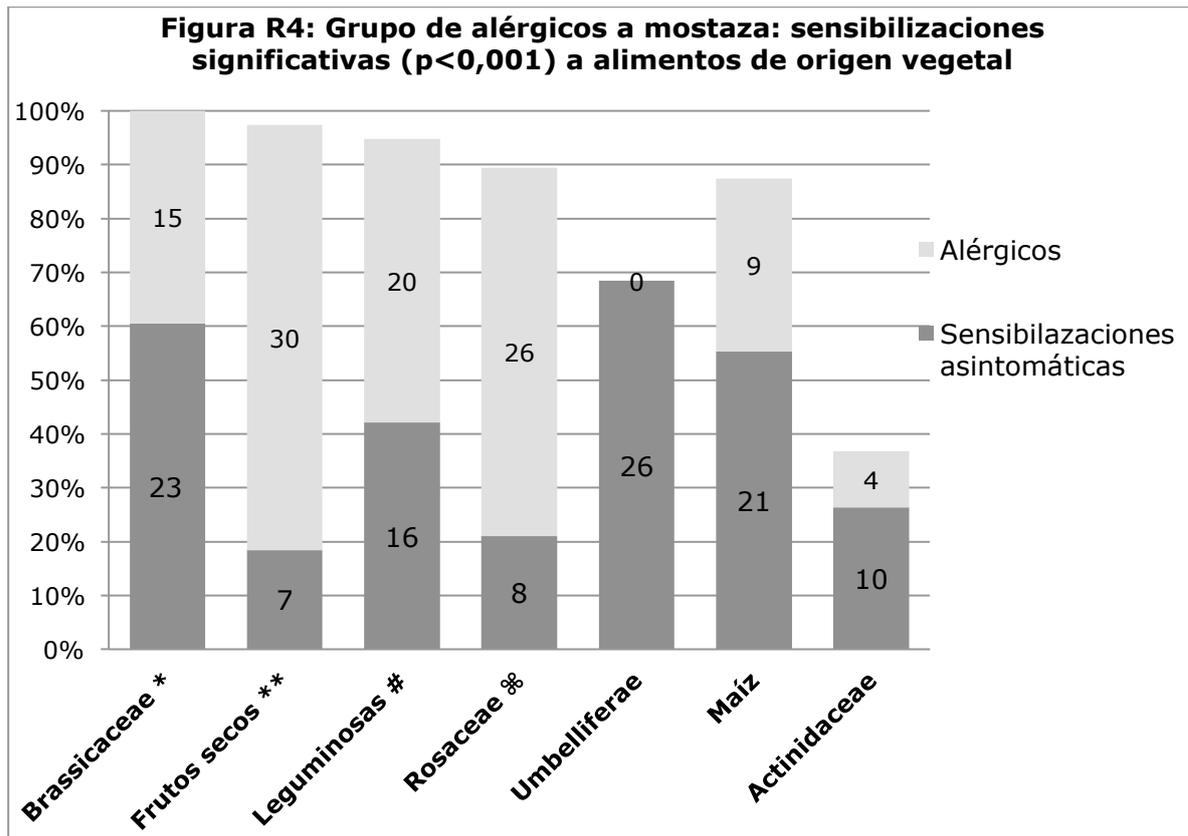
Resultado de la prueba de exposición oral controlada doble ciego contra placebo, síntomas observados y dosis con la que se produce la clínica expresada en miligramos de semillas de mostaza amarilla (14% del total de dosis de salsa de mostaza).

Nº: número de paciente; **U/AE**: urticaria/angioedema; **SAO**: síndrome de alergia oral; **A**: anafilaxia; **AIE**: anafilaxia por alergia a alimentos inducida por ejercicio; **neg**: negativa; **U**: urticaria; **nr**: no realizado; **AE/AB**: angioedema y asma bronquial; **bra**: familia *Brassicaceae* excluyendo mostaza; **sec**: frutos secos excluyendo almendra y cacahuete; **leg**: leguminosas incluyendo cacahuete; **ros**: familia *Rosaceae* incluyendo almendra; **umb**: familia *Umbelliferae*; **act**: familia *Actinidiaceae*.

El grupo de sujetos alérgicos a mostaza también mostró una amplia variedad de sensibilizaciones alimentarias asociadas (Tabla R6), apareciendo 578 sensibilizaciones en los treinta y ocho individuos, refiriendo los pacientes manifestaciones clínicas en 242 de ellas (41,9%). Estas manifestaciones clínicas observadas fueron: SAO (48,8%), urticaria/angioedema (40,1%), anafilaxia (3,7%), anafilaxia inducida por ejercicio por alergia alimentaria (2,5%) y asma bronquial (1,7%).

Todos los pacientes de la muestra (100%) presentaron sensibilización cutánea en prick test a otros alimentos de la familia *Brassicaceae* (excluyendo mostaza), mostrando manifestaciones clínicas quince de ellos (39,5%). Nueve pacientes eran alérgicos tanto a col como a coliflor, cinco de ellos sólo a col y sólo un paciente era alérgico a col, coliflor y brécol. Entre la clínica referida había un caso de anafilaxia y otro de anafilaxia inducida por ejercicio por alergia alimentaria, ambos tras la ingestión de col cruda. Se determinó también IgE específica a col, coliflor y brécol con resultado positivo de al menos alguna de ellas en treinta y siete de los pacientes (97,4%), con unas medias (\pm DE) para col de $9,79 \pm 15,31$ kU/L (rango de $<0,35$ a $76,6$ kU/L), para coliflor de $12,98 \pm 19,47$ kU/L (rango de $<0,35$ a $89,8$ kU/L) y para brécol de $10,94 \pm 15,88$ kU/L (rango de $<0,35$ a $69,3$ kU/L). Estos resultados, tanto de pruebas cutáneas como de IgE específicas con col, coliflor y brécol, fueron muy significativos ($p < 0,001$) al compararlos con el grupo control.

Otras sensibilizaciones a alimentos encontradas en el grupo de alérgicos a mostaza fueron: frutos secos (excluyendo cacahuete y almendra) en treinta y siete pacientes (97,4%), treinta de ellos con manifestaciones clínicas; leguminosas (incluyendo cacahuete) en treinta y seis (94,7%), veinte de ellos alérgicos; frutas de la familia *Rosaceae* (incluyendo almendra) en treinta y cuatro casos (89,5%), veintiséis de ellos con síntomas; maíz en treinta sujetos (78,9%), nueve de ellos con clínica; familia *Umbelliferae* en veintiséis pacientes (68,4%), todos ellos asintomáticos; y familia *Actinidiaceae* en catorce casos (36,8%), cuatro de ellos alérgicos. Todas estas sensibilizaciones alimentarias observadas fueron estadísticamente muy significativas ($p < 0,001$) al compararlas con el grupo control (Figura R4). Además, se encontraron otras sensibilizaciones no significativas como a pimienta en ocho casos (21,1%), sólo en uno de ellos sintomática; y también a otros alimentos de origen vegetal y animal.



* Excluyendo mostaza.

** Excluyendo almendra y cacahuete.

Incluyendo cacahuete.

% Incluyendo almendra.

Seis pacientes fueron diagnosticados de anafilaxia inducida por ejercicio por alergia a alimentos. Los alimentos implicados fueron melocotón, cacahuete, castaña, plátano, pipa de girasol y uno de los pacientes presentó dicho cuadro tanto tras la ingestión de mostaza como de col. El tiempo de latencia entre la ingestión del alimento y la reacción inducida por el ejercicio variaba entre treinta y noventa minutos, y el tipo de ejercicio desencadenante fue jugar al fútbol en tres pacientes, correr en dos de ellos y entrenamiento en gimnasio en uno.

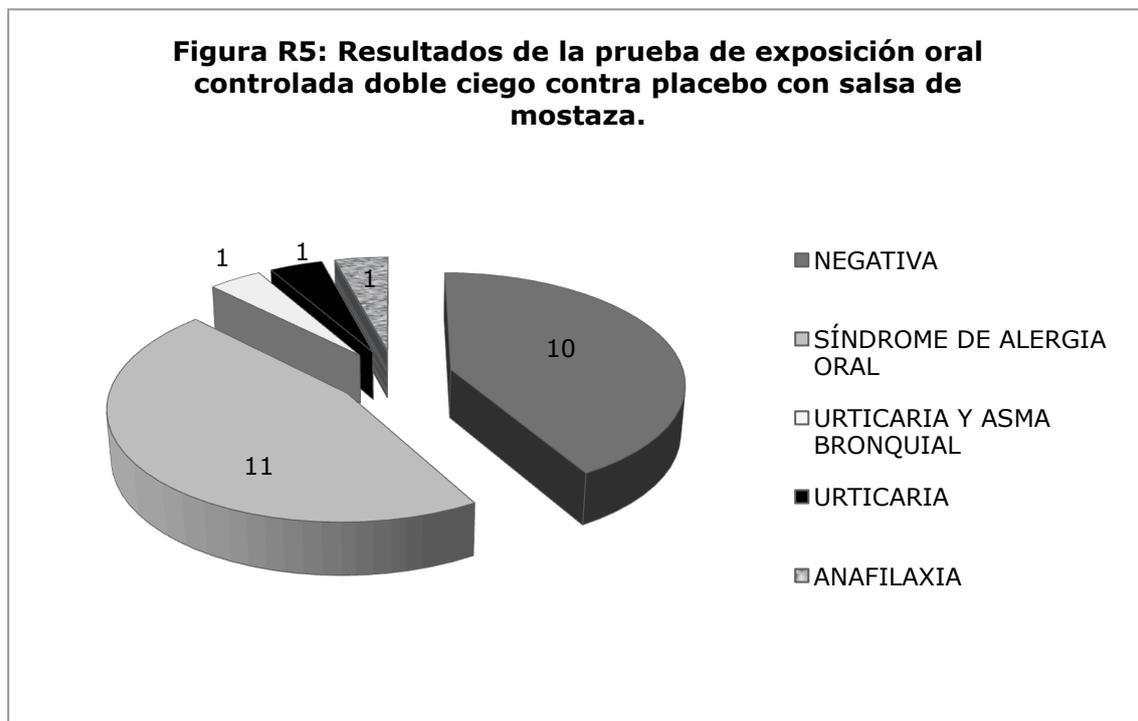
En veintinueve (82,9%) de estos pacientes alérgicos a mostaza la clínica respiratoria había precedido a la clínica de alergia alimentaria.

5.4. Exposición oral controlada en doble ciego

A catorce pacientes del grupo de alérgicos a mostaza no se les realizó la POCDCCP con mostaza, bien porque referían síntomas graves que la contraindicaban^{231,232}(cuatro casos), o bien porque los pacientes no dieron su consentimiento para someterse a ella.

En la Tabla R6 se recogen los resultados de la POCDCCP en los veinticuatro pacientes restantes. Se les realizó prick-prick con la salsa de mostaza que se usó para la provocación oral, siendo el resultado positivo en todos ellos con un diámetro medio de pápula (media \pm DE) de $6,5 \pm 2,6$ mm (rango: 3-14 mm), sin diferencias significativas con los resultados observados con el prick con mostaza comercial en el mismo grupo de pacientes.

El resultado de la POCDCCP (Figura R5) fue positivo en 14 pacientes (58,3%), siendo la manifestación clínica más frecuente observada el SAO, en once pacientes (78,6%).



La clínica de SAO referida por los pacientes fue la clásica descrita para este síndrome: prurito y leve angioedema de labios, lengua, paladar y garganta, con una rápida resolución de los síntomas y sin secuelas. Un paciente presentó angioedema y asma bronquial, otro presentó un cuadro de urticaria, y otro de los pacientes desarrolló un cuadro de anafilaxia (Figura R5).

Todos los pacientes mejoraron por completo tras la reacción en menos de 90 minutos, permaneciendo asintomáticos y sin secuelas antes de ser dados de alta del laboratorio de pruebas *in vivo* de la Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.

La paciente nº 15 presentó un cuadro de anafilaxia tras la administración de la tercera dosis de salsa de mostaza. Aunque tenía unos valores elevados de prueba cutánea en prick y de IgE específica a mostaza, la clínica que refería con la ingestión de la misma era únicamente de SAO. Durante la POCDCCP la paciente presentó, tras una dosis acumulada de 156,8 mg de semillas de mostaza amarilla, una reacción que comenzó con prurito orofaríngeo inmediato a la ingestión de la tercera dosis, seguido de estornudos y prurito nasal, eritema facial, disnea sibilante, vómitos y dificultad para la deglución con hipotensión arterial (TA: 90/50 mmHg con una TA basal previa al inicio de la prueba de 130/90 mmHg). De manera inmediata se administró adrenalina intramuscular al 1:1000 dosis de 0,5 ml, precisando una segunda dosis igual a los 15 minutos. Además se administró metilprednisolona intravenosa (60 mg), salbutamol nebulizado (2 cc en 3 cc de suero fisiológico, tres dosis con intervalos de 20 minutos), solución salina al 0,9% (500 cc en 15 minutos) y dexclorfeniramina intravenosa (5 mg). El cuadro remitió por completo a los 70 minutos permaneciendo la paciente en observación en el servicio de urgencias hasta el día siguiente. Se realizaron determinaciones de triptasa sérica, en el momento de inicio de la reacción, dos horas tras el comienzo de la misma, y una determinación basal una semana después con resultados de 22,3 µg/L, 23,6 µg/L y 11,4 µg/L respectivamente. Además, como se muestra en la Figura R8 con el suero de la paciente se realizó inhibición de CAP a punto final y por duplicado mostrando una inhibición recíproca importante >50% entre polen de artemisa y mostaza.

Como se refleja en la Tabla R6, la mitad de los catorce pacientes con POCDCCP positiva (50%) reaccionaron con la segunda dosis de administración del protocolo, la de 240 mg de salsa de mostaza, es decir, tras recibir una dosis acumulada de 320 mg de salsa de mostaza (equivalente a 44,8 mg de semillas de

mostaza amarilla). Seis pacientes (42,9%) reaccionaron con la tercera dosis, 1120 mg acumulados de salsa de mostaza (equivalente a una dosis acumulada de 156,8 mg de semillas de mostaza amarilla); y sólo un paciente (7,1%) reaccionó tras la cuarta dosis, 3520 mg acumulados de salsa de mostaza (492,8 mg de semillas de mostaza amarilla). No se encontraron asociaciones significativas entre valores de prick test o de IgE específicas y las dosis con las que aparecía la clínica durante la POCDCCP.

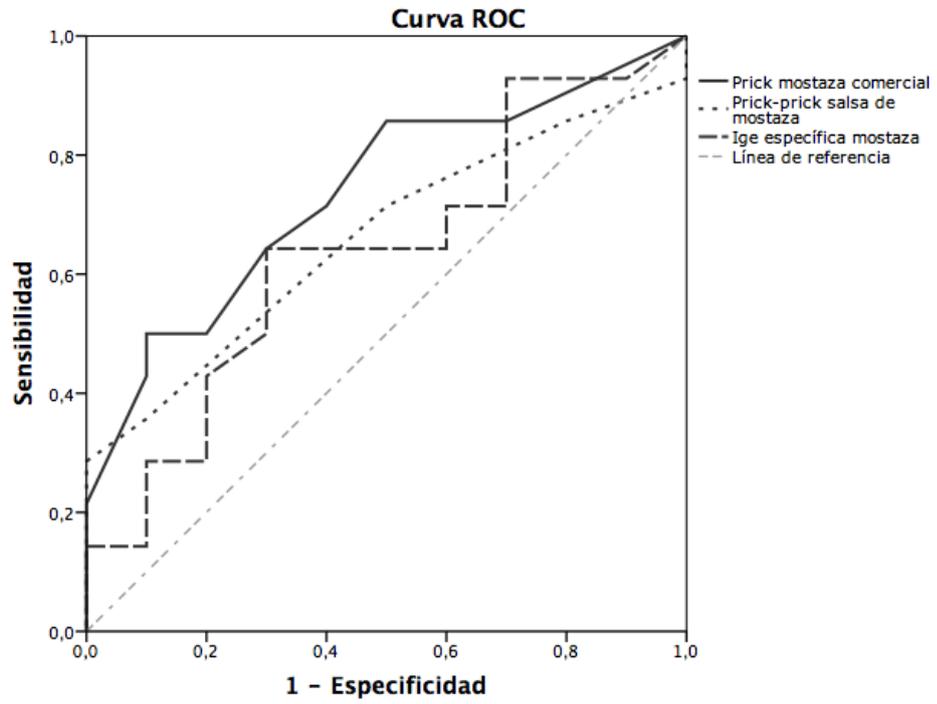
Cuatro de los diez pacientes con resultado de POCDCCP negativo y que querían comer mostaza, aceptaron someterse a una provocación oral en abierto con 25 g de salsa de mostaza (3,5 g de semillas de mostaza amarilla) en una hamburguesa, con buena tolerancia en todos ellos.

Al comparar los resultados del prick test con extracto comercial de mostaza de los pacientes con POCDCCP positiva, con los resultados que mostraban los pacientes con POCDCCP negativa, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con un resultado (media \pm DE) de $8,2 \pm 3,7$ mm en aquellos con provocación positiva, frente a $5,3 \pm 2,4$ mm en los que ésta fue negativa. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, ni al comparar los valores de IgE específica a mostaza, ni al comparar los resultados del prick-prick con salsa de mostaza.

Además, se realizó una curva ROC tanto con los valores de prick con extracto comercial, como con los de prick-prick con salsa de mostaza, así como con los valores de IgE específica a mostaza (Figura R6). Se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,736 con un intervalo de confianza (IC) del 95% de 0,534-0,937 para el prick con extracto comercial de mostaza, siendo los dos puntos de corte mejores para el diagnóstico de alergia a mostaza, el valor de 8,5 mm, con una especificidad del 90% y una sensibilidad del 50%, y el valor de 4,5 mm, con una especificidad del 50% y una sensibilidad del 85,7%.

Para el prick-prick con mostaza y para la IgE específica a mostaza el AUC fue de 0,661 (95% IC, 0,442-0,879) y de 0,636 (95% IC, 0,407-0,879) respectivamente (Figura R6).

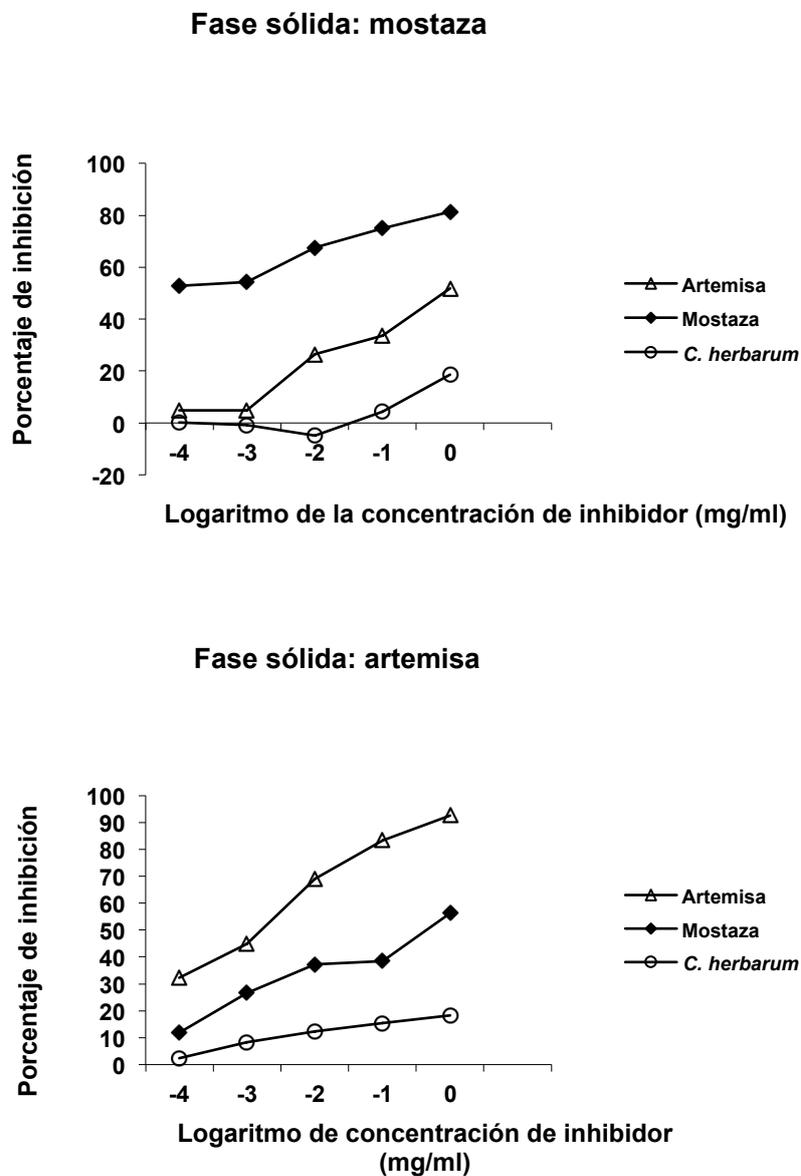
Figura R6. Curvas ROC en pacientes sometidos a exposición oral con mostaza controlada doble ciego contra placebo



5.5. Ensayos de CAP-inhibición

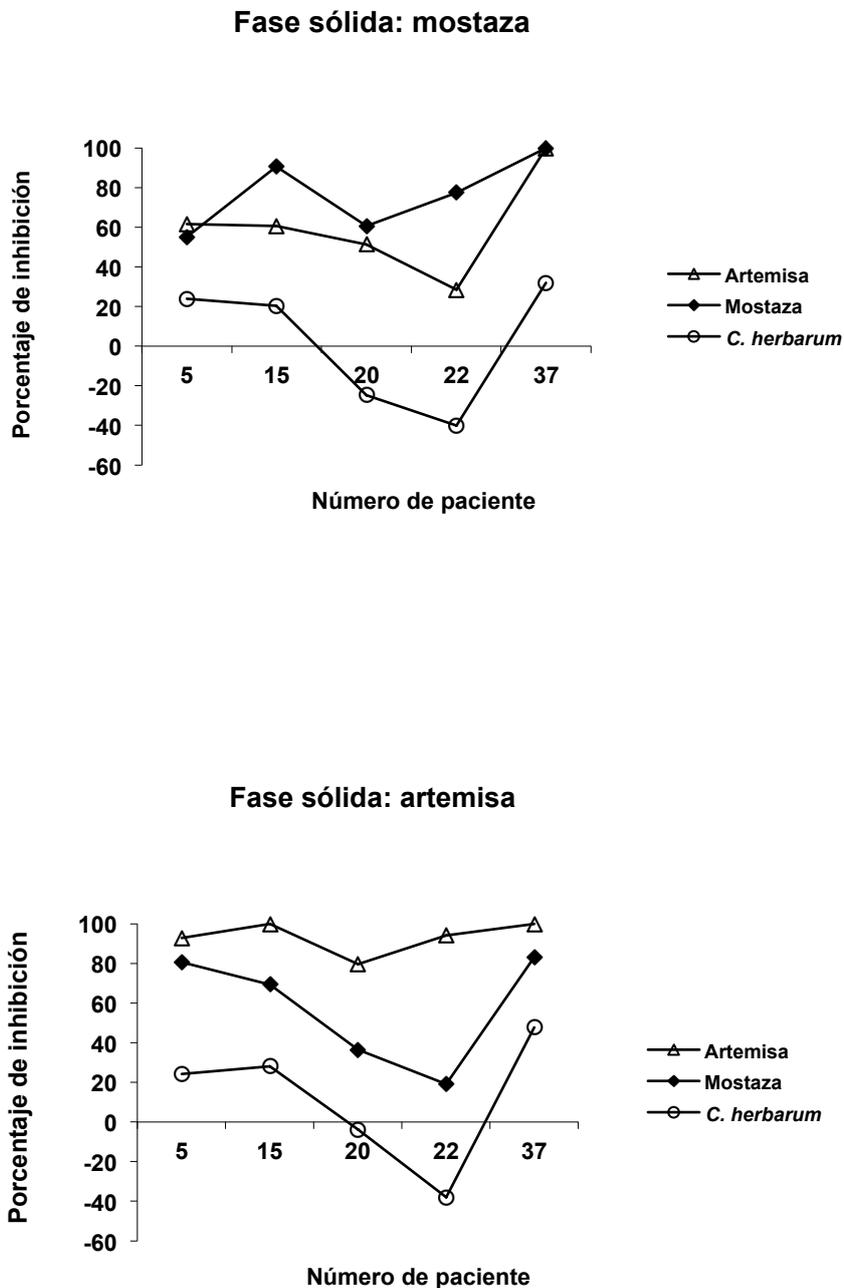
El resultado de los ensayos de CAP-inhibición con la mezcla de sueros de cinco pacientes alérgicos a mostaza se muestra en la Figura R7. El porcentaje de inhibición recíproca entre mostaza y polen artemisa a máximas concentraciones, esto es la capacidad de la mostaza de inhibir la unión de IgE a artemisa en fase sólida y viceversa fue mayor al 50%, alcanzándose inhibiciones menores al 20% con el control de *Cladosporium herbarum*.

Figura R7. Ensayo de CAP-inhibición entre mostaza y artemisa con mezcla de suero de cinco pacientes alérgicos a mostaza.



También se investigó la máxima inhibición recíproca entre mostaza y polen de artemisa con cada uno de los cinco sueros por separado (Figura R8). Cuando se usó mostaza en fase sólida, los niveles máximos de inhibición de polen de artemisa variaron entre un 28 y un 100%; mientras que con artemisa en fase sólida, los porcentajes máximos de inhibición de mostaza oscilaban de un 19 a un 83%, expresando una gran variabilidad individual en la reactividad cruzada.

Figura R8. CAP-inhibición entre mostaza y artemisa con suero individual de los pacientes alérgicos a mostaza números 5, 15, 20, 22 y 37.



Del mismo modo se realizaron experimentos de CAP-inhibición con el suero de once pacientes alérgicos a mostaza que también eran alérgicos a col, coliflor y brécol, cuyos resultados se muestran en las Figuras R9a, R9b y R9c. El extracto comercial de mostaza fue capaz de inhibir la unión a IgE de los respectivos alimentos pertenecientes a su misma familia (*Brassicaceae*) en fase sólida en un porcentaje que iba del 28 al 88%; a su vez el extracto de polen de artemisa lo hizo en un porcentaje del 32 al 90%, mientras que el control con el extracto de *Cladosporium herbarum* no alcanzaba porcentajes de inhibición significativos.

Figura R9a. Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia *Brassicaceae*. Agente inhibidor: mostaza

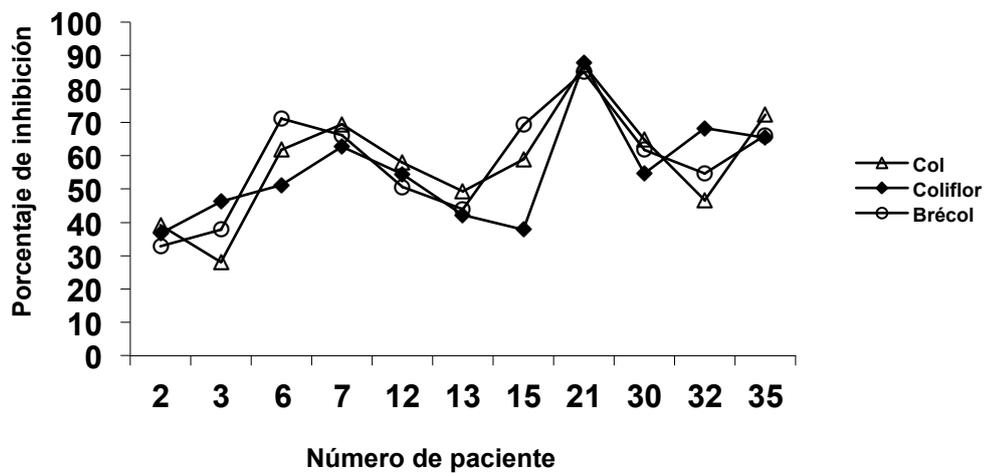


Figura R9b. Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia *Brassicaceae*. Agente inhibidor: artemisa

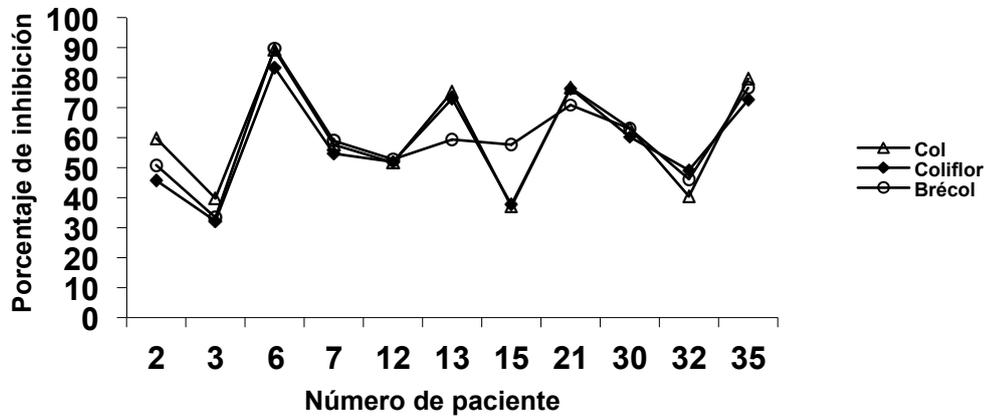
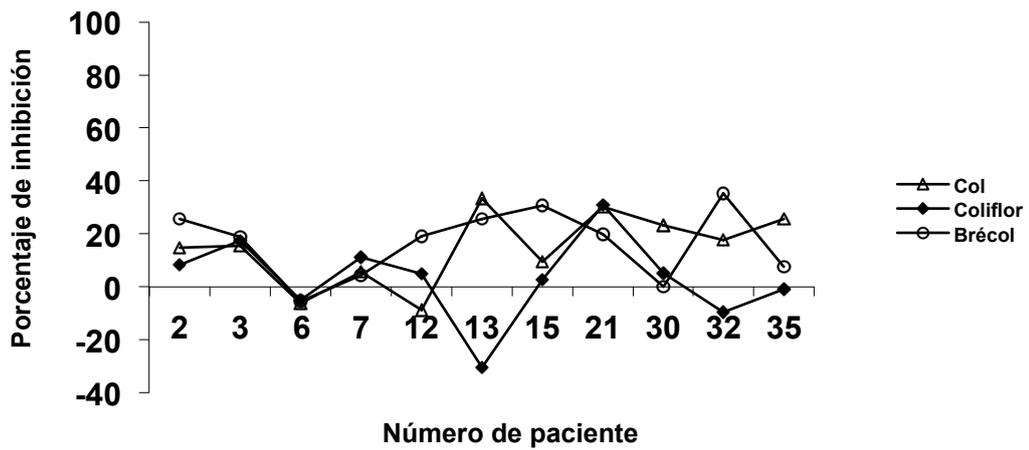


Figura R9c. Ensayos de CAP-inhibición entre artemisa, mostaza y otros miembros de la familia *Brassicaceae*. Agente inhibidor: *Cladosporium herbarum*



6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Aunque la alergia al polen de artemisa no es de las más frecuentes en nuestro medio, afectando a aproximadamente un 6% de los pacientes atópicos vistos en nuestra consulta en un periodo de siete meses, el hecho de que presente una asociación significativa con la alergia a mostaza y con otros alimentos de origen vegetal, le confiere una gran relevancia clínica, como demuestran los datos del presente estudio que analizaremos a continuación.

En Canarias, la principal causa de síntomas alérgicos es la sensibilización a ácaros del polvo, jugando también un papel etiológico importante los epitelios de animales⁵⁷. Por tanto, no es de extrañar que ambas sensibilizaciones aparezcan en un porcentaje elevado en los sujetos de nuestro estudio. Además, la clínica asociada más frecuente en los pacientes de nuestro medio, es la rinitis y el asma bronquial, como también se observa en los pacientes en el presente trabajo (Tablas R1 y R2).

Un hallazgo que no estaba descrito, y que revelan los resultados de nuestro estudio, es la existencia de una intensa asociación, estadísticamente significativa, entre la alergia al polen de artemisa y la alergia a mostaza en la población estudiada, como refleja el hecho de que cerca del 67% de pacientes del grupo de alérgicos a artemisa estén sensibilizados a mostaza; y que un porcentaje aún mayor, superior al 97%, de los pacientes del grupo de alérgicos a mostaza, muestre sensibilización al polen de artemisa. Lejos de quedarse ahí, esta asociación va acompañada de múltiples sensibilizaciones significativas a distintos alimentos de origen vegetal, que varía en los dos grupos de nuestro estudio, de un promedio superior a 8 sensibilizaciones por paciente en el grupo de alérgicos a artemisa, hasta un promedio por encima de 15 sensibilizaciones por paciente en el grupo de alérgicos a mostaza; con un porcentaje de clínica asociada a dichas sensibilizaciones en torno al 34% y al 42%, respectivamente. Es decir, no sólo existen una cantidad extraordinariamente elevada de sensibilizaciones alimentarias, sino que además, dichas sensibilizaciones se traducen en manifestaciones clínicas en un porcentaje importante de las mismas.

Al igual que se ha descrito en otros síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos^{96,175,177,238-241}, aparece una gran variedad de familias de alimentos de origen vegetal implicadas. Desde el punto de vista metodológico,

decidimos agrupar las familias de alimentos siguiendo en la medida de lo posible el orden taxonómico. Por ello, la almendra la incluimos en el grupo de las rosáceas y el cacahuete en el de las leguminosas. De esta manera, encontramos asociaciones estadísticamente significativas con las familias *Brassicaceae*, *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Umbelliferae*, *Actinidiaceae*, así como con los frutos secos y el maíz, como se refleja en las Figuras R2, R3 y R4. Llama la atención que cuando se analiza la sensibilización a alimentos en el grupo de alérgicos a artemisa, comparando los dos subgrupos de esa muestra (alérgicos a artemisa con o sin sensibilización a mostaza), se encuentran diferencias estadísticamente significativas, lo que nos hace pensar que la mostaza es un alimento especialmente relevante en este síndrome de reactividad cruzada que hemos descrito.

Analizando todos los pacientes del estudio, observamos que, dentro de las familias de alimentos con asociación significativa, además de la mostaza, los más frecuentes son otros miembros de la familia *Brassicaceae* y los frutos secos, con porcentajes de asociación superiores al 90%, seguido de las leguminosas, con porcentajes superiores al 80% y, por detrás, las rosáceas y el maíz, con unos porcentajes más variables de asociación (entre un 60 y un 90%). Todos estos alimentos mencionados, a los que nuestros pacientes están sensibilizados, son responsables de reacciones alérgicas en distintos porcentajes, que van desde un 30% hasta el 80%, según los grupos.

Además de ser estadísticamente significativas, estas asociaciones se presentan en unos porcentajes de sensibilización y de repercusión clínica superiores a los descritos en otros estudios en nuestro país, siendo estas diferencias mucho más llamativas con la mostaza, así como con las otras crucíferas. Hernández y cols.¹⁸² ya en 1985, describen en Murcia a 40 pacientes alérgicos a múltiples alimentos de origen vegetal, encontrando sensibilizaciones en al menos el 25% de ellos, a nuez, pipa de girasol, almendra, dátil, castaña, cacahuete, uva, avellana y melocotón (por orden decreciente). Además, la sensibilización polínica más frecuente y significativa asociada fue el polen de artemisa (72%). Mediante RAST-inhibición, se comprobó que la artemisa inhibía en un 80-90% al guisante y al cacahuete. Con posterioridad, Caballero y cols.¹⁸³, describen en niños una asociación entre sensibilización al polen de artemisa y otras compuestas, con alimentos vegetales de las familias *Compositae*, *Fagaceae*, *Brassicaceae*, *Betulaceae* y *Leguminosae*. Otro estudio interesante en nuestro país, es el de García Ortiz y cols.¹⁸⁴, ya que describen 84 pacientes monosensibilizados al polen de artemisa, encontrando alergia a alimentos en el 27% de ellos, siendo los

alimentos más frecuentes implicados la miel (61%), la pipa de girasol (48%) y, en porcentajes menores (4-17%), la manzanilla, el pistacho, la avellana, la lechuga, la cerveza, la almendra, el cacahuete, la zanahoria y la manzana.

A diferencia de los estudios publicados en nuestro país, no encontramos en nuestro grupo de pacientes asociaciones significativas a lechuga o la manzanilla. Sin embargo, sí que encontramos, al igual que en dichos estudios, sensibilizaciones significativas a la pipa de girasol, que también pertenece a la familia *Compositae*. Tampoco aparece en nuestro grupo de pacientes asociación significativa a la miel. Sin embargo, dado que se ha postulado que esta asociación entre polen de artemisa y alergia a miel, puede estar relacionada con la presencia de dicho polen en la miel¹⁸⁹, la explicación podría ser el patrón de polinosis a artemisa en nuestra área geográfica, así como los hábitos de consumo de miel en nuestro entorno.

Por otro lado, otra asociación significativa observada en nuestro trabajo, y que también se ha descrito en algún estudio español aislado con porcentajes bajos de asociación¹⁸⁴, pero sobre todo descrita en el centro y norte de Europa^{96,175,176,177}, es con las umbelíferas. La sensibilización a umbelíferas en nuestros pacientes alcanza porcentajes cercanos al 70%. Sin embargo, llama la atención que, a diferencia de otros síndromes de reactividad cruzada descritos en Europa^{169,170}, en los pacientes de nuestro estudio, dichas sensibilizaciones no se traducen en ninguna manifestación clínica, siendo asintomáticas en todos ellos. Una posible explicación podría ser los hábitos dietéticos de nuestra zona, donde las umbelíferas se suelen consumir habitualmente cocinadas y con mucha menor frecuencia crudas. La pimienta, otro alimento implicado en la reactividad cruzada con el polen de artemisa^{96,175,177}, también aparece en nuestra población de estudio con una asociación porcentualmente importante (de un 12 a un 20%), aunque no estadísticamente significativa y con escasa relevancia clínica (sólo un paciente con síntomas).

Otros dos alimentos que destacan en nuestro trabajo de manera estadísticamente significativa, y no descritos en estudios previos de reactividad cruzada entre polen de artemisa y alimentos vegetales, son la harina de maíz y el kiwi (familia *Actinidicaceae*). El maíz o "millo", como se denomina comúnmente en Canarias, es un alimento habitual en la gastronomía de nuestra Comunidad, tanto para elaborar variedades de gofio (harina de maíz tostada), como para formar parte de los potajes, añadiendo la "piña" (mazorca) de millo o bien como producto procesado en conserva para acompañar distintos platos. Es, por tanto, un alimento

que se consume ampliamente en nuestro entorno, si bien, siempre cocinado, lo que puede explicar la poca clínica asociada en los sujetos de nuestro estudio que estaban sensibilizados. En cuanto al kiwi, alimento originario de China, es una fruta que se ha introducido hace relativamente poco en Europa, aunque en los últimos años se está viviendo un incremento, tanto de su consumo como de su cultivo en nuestro país. También en Gran Canaria se ha implantando su cultivo en diferentes zonas de la isla (Valleseco, Valsequillo, etc.).

En la mayoría de los pacientes de nuestra muestra que presentaban alergia a alimentos y alergia respiratoria, la clínica respiratoria precedía a la clínica alimentaria, lo que sugiere que nos encontramos ante una alergia a alimentos de clase II y, por tanto, ante una reactividad cruzada entre polen de artemisa y alimentos vegetales. Además, en el grupo de pacientes alérgicos a mostaza, llama la atención que los cuatro niños descritos también presentaban sensibilización a pólenes y otros alérgenos inhalados y, la clínica respiratoria también precedía a la clínica alimentaria en tres de ellos, siendo imposible de determinar este hecho en el paciente de 3 años de edad.

Para demostrar que estas asociaciones observadas eran debidas a un fenómeno de reactividad cruzada, se llevó a cabo ensayos de CAP-inhibición, demostrando una reactividad cruzada recíproca parcial entre el polen de artemisa y la mostaza al usar mezcla de sueros de cinco pacientes alérgicos a mostaza (Figura R6). Sin embargo al realizar los mismos ensayos, pero esta vez, con los sueros de los cinco pacientes por separado, se observó una gran variabilidad individual (Figura R7), lo que podría a su vez explicar que la inhibición cruzada recíproca fuese sólo parcial al usar la mezcla de sueros.

Se observa en los pacientes del estudio sensibilizaciones a múltiples pólenes además del polen de artemisa. Dado que el criterio de inclusión en uno de los grupos era la alergia al polen de artemisa, y que hemos demostrado la asociación de la alergia a la mostaza con la alergia a dicho polen, este hallazgo concomitante era de esperar. No solo se explica por la posible reactividad cruzada existente entre el polen de artemisa y otros pólenes, sino también, porque la mayoría de los pacientes residían en ambientes rurales de la zona centro y norte de la isla (Figura R1). Un hecho llamativo es que, a pesar de que los pólenes de la familia *Betulaceae* aparecen en niveles elevados en los recuentos de uno de nuestros captadores, no parece ser una causa importante de polinosis en nuestra área, como sugiere el dato de que sea una sensibilización relativamente poco frecuente en nuestro grupo de

estudio. Este hallazgo, junto con el tipo de sensibilizaciones alimentarias observadas, confirma que no estamos ante un síndrome de alergia cruzada abedul-artemisa-apio-especias¹⁷⁸, como el observado en algunas regiones de Europa.

Los pacientes del presente trabajo residían en la zona centro y norte de Gran Canaria (Figura R1), por lo que es lógico pensar que la especie de artemisa que está involucrada tanto en la sensibilización como en la clínica de estos pacientes, es la *Artemisia thuscula* o *Artemisia canariensis*, que, como hemos descrito, es un endemismo canario con una gran presencia en nuestra isla, entre los 50 y los 1500 metros de altitud, habiéndose identificado en todos los municipios de Gran Canaria. Menos probable es que nuestros pacientes estén sensibilizados al polen de *Artemisia ramosa* que predomina en el suroeste o al de la *Artemisia reptans* que predomina en la vertiente oriental de la isla. Además, como hemos mencionado previamente, el recuento de polen de artemisa en el centro-norte de la isla es importante, pudiendo alcanzar picos de hasta 190 granos/m³ de media diaria en el mes de Junio.

El que la especie de artemisa responsable de la clínica y sensibilizaciones asociadas de nuestro grupo de estudio sea un endemismo canario, podría tener implicaciones clínicas y diagnósticas importantes. Observamos que algunos de los pacientes con clínica asociada a polinosis por artemisa y un perfil de sensibilizaciones a alimentos de origen vegetal que concuerda con el síndrome de describimos, muestran, sin embargo, niveles bajos de sensibilización, tanto de prick test como de IgE específica, al polen de artemisa. Una posible explicación, podría ser que los medios diagnósticos disponibles en el mercado no fuesen del todo eficaces para identificar a todos o parte de nuestros pacientes alérgicos a polen de *Artemisia canariensis*. En este sentido, el mismo hecho, también podría explicar en parte, que no hayamos sido capaces de identificar, al menos por el momento, el alérgeno responsable del síndrome de alergia cruzada que describimos.

Tampoco se ha identificado un alérgeno concreto del polen de *Artemisia* responsable del síndrome artemisa-apio-especias, pero los pacientes reconocen profilinas, determinantes carbohidratos de glicoproteínas y alérgenos con un peso molecular entre 40 y 60 KDa^{160,169,170,177,179,180}. Además, el Art v 3, la LTP de la artemisa, se ha asociado a la alergia al melocotón¹⁸¹. Algo similar pasa con la mostaza, donde se ha descrito reactividad cruzada entre la legumina de la mostaza (Sin a 2) con leguminas del cacahuete y otros frutos secos²⁴², pero otros autores sugieren que el alérgeno de la mostaza responsable de su reactividad cruzada con

pólenes y con alimentos vegetales de la familia *Rosaceae* podría ser la LTP de la mostaza (Sin a 3) o su profilina (Sin a 4)¹⁴⁵.

Queda claro que son necesarios más estudios para intentar identificar el alérgeno o alérgenos implicados en estos síndromes de reactividad cruzada, y que, en nuestro entorno, dichos estudios deberían, probablemente, tener en cuenta el endemismo de la *Artemisia canariensis*.

La clínica de alergia alimentaria más frecuente descrita en los pacientes de nuestro estudio fue el SAO (58-62%), seguido en segundo lugar por la urticaria/angioedema (33-40%) y, en tercer lugar, por la anafilaxia (2,5-5,2%). Los alimentos con mayor porcentaje de sensibilizaciones clínicas fueron, además de la mostaza, los frutos secos y las frutas rosáceas; existiendo alimentos con sensibilizaciones sin ninguna repercusión clínica, como el caso ya comentado de las umbelíferas. Estos datos contrastan de nuevo con los observados en el síndrome artemisa-apio-especias, donde el SAO aislado es poco frecuente^{169,170}. Las manifestaciones clínicas observadas en nuestros pacientes concordarían más con las descritas en el síndrome abedul-artemisa-apio-especias, que asocia un cuadro clínico variable, con una mayor frecuencia del SAO, pero también, un número importante de reacciones sistémicas¹⁷⁸.

La anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de alimento es un cuadro bien definido que suele ser desencadenado por alimentos concretos²⁴³. El alimento que se ha implicado con mayor frecuencia en este cuadro es el trigo, siendo el alérgeno responsable la gliadina ω -5 (Tria a 19)⁷⁴⁻⁷⁶. Sin duda, es un hallazgo importante que seis de los pacientes de nuestro estudio presenten este cuadro. Además, en ninguno de ellos el causante fue el trigo e incluso, un paciente había presentado episodios tanto por mostaza como por col. Estos hallazgos sugieren que el síndrome de alergia cruzada que describimos es una causa importante de anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de alimento.

En el presente trabajo se describe también un grupo de 38 pacientes alérgicos a mostaza, confirmando la sospecha de que esta entidad es un problema cada vez más frecuente en nuestro entorno. El aumento de esta patología podría explicarse, en parte, por el aumento del consumo de salsas de mostaza asociado al notable incremento de los "restaurantes" de comida rápida donde son un ingrediente común.

Aparte de las sensibilizaciones y alergias asociadas tanto al polen de artemisa y otros pólenes, como a otras crucíferas y alimentos de origen vegetal, existen otros datos interesantes observados en este grupo de alérgicos a mostaza. A diferencia de otros estudios publicados¹³⁰, en nuestro grupo de pacientes la alergia a mostaza aparece con más frecuencia en adultos. Además, la dermatitis atópica ha sido descrita como la manifestación clínica más frecuente de la alergia a mostaza en niños¹³¹, sin embargo, en los cuatro menores a 14 años de nuestra muestra, la clínica observada es de urticaria/angioedema en tres de ellos y de anafilaxia en el que resta (Tabla R6, pacientes nº 19, 20, 22 y 24). Al evaluar conjuntamente los 38 pacientes observamos que, aunque la clínica más frecuente referida tras la ingestión de mostaza es el SAO, existe un porcentaje de anafilaxia sistémica superior al 10%, con la importante repercusión clínica que esto implica.

Sin duda, la POCDCCP es la prueba diagnóstica de confirmación (estándar de oro o "gold standard") en la alergia a alimentos^{50,117}. Sin embargo, su realización es compleja, y más aún con la mostaza, cuyo intenso sabor no es fácil de enmascarar. Este problema lo hemos solventado en nuestro trabajo creando una receta con una base de yogur, donde hemos camuflado una dosis total de 10 g de salsa de mostaza (equivalente a 1400 mg de semillas de mostaza amarilla). En estudios previos, Rance y cols.¹³¹, encuentran un resultado positivo en el 42% de las pruebas de exposición oral controlada en simple ciego contra placebo (POCSCCP) realizadas en niños sensibilizados a mostaza. Por otro lado, Morisset y cols. encuentran un porcentaje menor (23,3%), al realizar POCDCCP y POCSCCP con mostaza en 24 pacientes sensibilizados¹³⁹. En nuestro estudio, el porcentaje observado es considerablemente superior a los anteriores, casi un 60% de POCDCCP con mostaza son positivas, lo que podría estar relacionado con los criterios de inclusión de los pacientes. Al igual que en publicaciones previas de POCDCCP con alimentos vegetales^{169,244}, objetivamos en nuestro trabajo una discrepancia también entre la clínica referida por los pacientes y los síntomas observados durante la POCDCCP. Otro hallazgo que llama la atención es que se describe una asociación estadísticamente significativa entre los resultados de los prick test con extracto de mostaza comercial y los resultados de la POCDCCP, no existiendo, sin embargo, diferencias significativas al compararlo con los resultados de prick-prick test con la salsa de mostaza usada para dichas pruebas de exposición oral. No encontramos una explicación plausible para este hallazgo. Cabe recordar que, si bien la POCDCCP es la prueba de referencia para el diagnóstico de alergia a alimentos, esta prueba no está exenta de riesgos, como observamos en

nuestro estudio con un caso de urticaria y asma bronquial; y otro caso de anafilaxia durante la misma.

Con los resultados obtenidos del prick test con extracto comercial de mostaza y de la POCDCCP con la misma, en los 24 pacientes a los que se les realizó, se dibujó una curva ROC (Figura R7), o lo que es lo mismo, un gráfico con las razones de verdaderos positivos (sensibilidad) y las razones de falsos positivos (1-especificidad). El área bajo la curva ROC es la probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo sea más correcto que el de una persona sana. Al definir como verdaderos alérgicos a mostaza (verdaderos positivos) a aquellos pacientes con resultados positivos en la POCDCCP, se obtuvo una AUC de 0,736, lo que equivale a decir que existe una probabilidad del 73,6% de que, el diagnóstico realizado a un paciente alérgico a mostaza, mediante prick test positivo con extracto comercial de mostaza, sea más correcto que el de una persona sana. Además, definimos dos puntos de corte del prick test con extracto comercial de mostaza, el de 8,5 mm con una especificidad del 90% y una sensibilidad del 50%, y el de 4,5 mm, con una especificidad del 50% y una sensibilidad del 87,5%. Desde el punto de vista práctico, los dos puntos de corte nos pueden ser útiles según la situación a la que nos enfrentemos. Si lo que buscamos es clasificar correctamente el mayor número de pacientes alérgicos a mostaza, es decir, los verdaderamente enfermos, entonces debe primar la sensibilidad, y el punto de corte elegido debería ser el de 4,5 mm, como por ejemplo, a la hora de plantearnos pruebas de exposición oral controlada en pacientes donde sospechemos reacciones moderadas por ingestión de mostaza o con alguna contraindicación relativa para la realización de las mismas. Por el contrario, si lo que buscamos es clasificar correctamente al mayor número de pacientes sanos, no alérgicos a mostaza, debe primar la especificidad, y entonces, el punto de corte elegido debería ser el de 8,5 mm, como por ejemplo, a la hora de elegir con qué alimentos comenzar una dieta de eliminación en niños o adolescentes con dermatitis atópica y múltiples sensibilizaciones alimentarias.

La reactividad cruzada entre los miembros de la familia *Brassicaceae* está descrita desde hace años²⁴⁵, si bien clásicamente, se describe en general como poco frecuente^{131,246}. Todos los pacientes del grupo de alérgicos a mostaza de nuestro trabajo están sensibilizados a otras crucíferas, presentando cerca del 40% clínica asociada al menos a una de ellas, lo que sugiere que la reactividad cruzada dentro de la familia es muy frecuente y clínicamente relevante. Para demostrar esta reactividad cruzada se realizaron ensayos de CAP-inhibición con el suero de once

pacientes alérgicos a crucíferas, mostrando la mayoría de éstos, inhibiciones, al menos parciales, de las distintas crucíferas (col, coliflor y brécol) tanto con la mostaza como con la artemisa.

Un ejemplo claro de la complejidad de los pacientes que presentan síndromes de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos vegetales, es el paciente número 15 del grupo de pacientes alérgicos a mostaza. Si tomamos este paciente como ejemplo, nos hacemos una idea de las dificultades de manejo de este grupo de pacientes, tanto desde el punto de vista diagnóstico, como terapéutico. Este paciente es una mujer de 41 años que había sido remitida a nuestra consulta para estudio de reacciones adversas a alimentos. La paciente refería historia de clínica respiratoria desde la infancia, habiendo sido diagnosticada de rinitis y asma bronquial por alergia a pólenes de malezas (vivía en Firgas, en una zona con abundante presencia de plantas de artemisa). Sin embargo, además de esto, refería que en los últimos tres años previos al estudio, había presentado cuadros de prurito oral y faríngeo con latencia inmediata y sin otros síntomas asociados, en relación con la ingestión de mostaza, col, coliflor, frutos secos (avellana, pipas de girasol, castaña y nuez), melocotón, manzana, almendra, garbanzo, cacahuete y gofio. En una ocasión, un año antes de la consulta, presentó un cuadro de urticaria generalizada, angioedema lingual y disnea sibilante unos diez minutos después de la ingestión de cuatro avellanas, precisando asistencia urgente en su Centro de Salud, pero sin poder precisar el tratamiento recibido. Tras ese episodio no volvió a comer ningún fruto seco.

Como vemos resumidos en las Tablas R4 y R6 al realizar el estudio alergológico la paciente mostró prick test positivos a pólenes de malezas (*Artemisia*, *Chrysanthemum* y *Chenopodium*), a pólenes de gramíneas (*Lolium*, *Avena*, *Anthoxanthum* y *Poa*), y a múltiples alimentos de origen vegetal (mostaza, melocotón, manzana, almendra, avellana, pipa de girasol, castaña, nuez, cacahuete, lenteja, harina de soja, garbanzo, guisante, harina de maíz, y kiwi). También presentó un resultado positivo de prick-prick con col y con coliflor. En los estudios *in vitro* se objetivaron IgE específicas positivas al polen de *Lolium*, polen de *Artemisia*, mostaza, col, col de Bruselas, brécol, melocotón, cacahuete, garbanzo y maíz. Además, a pesar de que la clínica que refería en relación con la ingestión de mostaza siempre había sido SAO, durante la POCDCCP con mostaza presentó un cuadro de anafilaxia, que hemos descrito previamente.

Se trata como hemos descrito, de una paciente que presenta múltiples alergias a alimentos de origen vegetal, asociadas a una clara alergia respiratoria por polen de artemisa. La gravedad de las reacciones alimentarias es variable según las familias implicadas, pareciendo más intensa con los frutos secos. Pero, además, observamos que una reacción leve previa, no excluye del riesgo de presentar una reacción grave posterior con la ingestión del mismo alimento, incluso pudiendo padecer un shock anafiláctico.

En resumen, es un ejemplo del nuevo síndrome de reactividad cruzada entre polen de artemisa, mostaza y otros alimentos de origen vegetal que describimos, el síndrome de alergia cruzada artemisa-mostaza.

De lo descrito arriba se infiere que es imprescindible identificar a estos pacientes, para diagnosticar todas las reactividades cruzadas asociadas, no sólo aquellas que el paciente refiera o sospeche, sino todas las que puedan estar relacionadas pero que no hayan aflorado aún, bien porque no hayan provocado clínica, o bien porque no estén incluidas en la dieta habitual del paciente. Por tanto, es tarea del alergólogo conocer los síndromes de reactividad cruzada existentes, sobre todo, las peculiaridades clínicas de los más frecuentes en su entorno. Sólo así podrá realizar un correcto diagnóstico y será capaz de ofrecer al paciente un consejo dietético razonado, así como una adecuada educación, para saber reconocer las reacciones más graves y tratarlas correctamente de manera inmediata, ya que, cómo hemos visto, pueden llegar incluso a comprometer la vida.

En este sentido, es importante tener en cuenta que la existencia de una sensibilización mediante prick test o estudios *in vitro*, no es suficiente prueba de relevancia clínica. Es más importante realizar una buena historia clínica que buscar sensibilizaciones por protocolo a posibles alérgenos con reactividad cruzada. Tampoco se deben pautar medidas dietéticas generales, basándose en listas conocidas de reactividades cruzadas entre pólenes y alimentos. Las dietas de exclusión sólo se deben basar en el diagnóstico correcto de alergia alimentaria. En caso de que la historia clínica no esté clara, es necesario realizar pruebas de exposición o provocación oral controlada con el alimento sospechoso antes de recomendar una dieta de exclusión⁵⁰.

Por último, sería muy interesante realizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes de nuestro estudio con el objeto de comprobar cual es el comportamiento de este nuevo síndrome de alergia cruzada artemisa-mostaza.

7. CONCLUSIONES

7.CONCLUSIONES

- Se describe la existencia de un síndrome de reactividad cruzada, entre la alergia al polen de artemisa y a los alimentos de origen vegetal, en el área centro y norte de Gran Canaria.
- Este nuevo síndrome de reactividad cruzada involucra a múltiples alimentos de origen vegetal, destacando por su frecuencia, la alergia a la mostaza, de ahí que propongamos denominarlo: síndrome de alergia cruzada artemisa-mostaza.
- Otros alimentos asociados a este síndrome con significación estadística son: otros miembros de la familia *Brassicaceae* (col, coliflor, brécol), alimentos de la familia *Rosaceae* (manzana, almendra, melocotón), leguminosas (cacahuete, garbanzo, soja, guisante, lenteja), umbelíferas (apio, zanahoria), otros frutos secos (nuez, castaña, pipa de girasol, avellana), kiwi y maíz.
- La prevalencia de alergia al polen de artemisa obtenida en siete meses, entre pacientes alérgicos que acuden por primera vez a consulta en la Sección de Alergología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, es del 5,93%.
- La prueba de provocación oral controlada doble ciego contra placebo (POCDCCP) permite confirmar el diagnóstico de alergia a mostaza, si bien dicha prueba no está exenta de riesgos. Describimos un procedimiento y una receta de enmascaramiento para la correcta realización de dicha prueba.
- Obtenemos dos puntos de corte de resultados de prueba cutánea en prick test con extracto comercial de mostaza para el diagnóstico de alergia a dicho alimento, el de 8,5 mm, cuando lo que se busca es una mayor especificidad y el de 4,5 mm, cuando lo que se necesita es una una mayor sensibilidad.
- Se demuestra la existencia de una reactividad cruzada entre la mostaza y otros miembros de la familia *Brassicaceae* (col, coliflor y brécol).
- Son necesarios más estudios para identificar el panalérgeno responsable del síndrome de alergia cruzada artemisa-mostaza, valorando la posibilidad de que esté presente en el endemismo canario *Artemisia canariensis*.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Uzzaman A, Cho SH. Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 2012; 33 Suppl 1: S96-9.
2. Coombs R, Gell P. The classification of allergic reactions underlying disease. 1 ed. Oxford: Blacwell Sc.; 1963.
3. Shearer W, Fleisher T. The Immune System. 5 ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.; 1998.
4. Sell S. Immunopathology. Mosby ed. St. Louis; 1996.
5. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annual review of immunology* 1999; 17: 931-72.
6. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl): B24-30.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology : functions and disorders of the immune system. Fourth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2014.
8. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. Kuby immunology. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2013.
9. Male DK. Immunology. 8th ed. Edinburgh: Elsevier/Saunders; 2013.
10. Ishizaka K, Ishizaka T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG-globulin. *The Journal of allergy* 1966; 37(3): 169-85.
11. Ishizaka K, Ishizaka T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 3. Further studies on the reaginic antibody in gamma-A-globulin preparations. *J Allergy* 1966; 38(2): 108-19.
12. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *Journal of immunology* 1966; 97(1): 75-85.
13. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 1966; 97(6): 840-53.
14. Ishizaka K, Ishizaka T, Lee EH. Physicochemical properties of reaginic antibody. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-isoheamagglutinin and gamma-D-globulin. *J Allergy* 1966; 37(6): 336-49.
15. Prausnitz C, Küstner H. Studien über die ueberempfindlichkeit. *Zentralbl Bakteriol Parasit Infektion Hygiene* 1921; 86: 160-9.
16. Coca A, Grove E. Studies in hypersensitiveness XIII. A study of atopic reagins. *J Immunol* 1925; 10: 445-8.

17. Potaczek DP, Kabesch M. Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2012; 42(6): 852-71.
18. Feijen M, Gerritsen J, Postma DS. Genetics of allergic disease. *British medical bulletin* 2000; 56(4): 894-907.
19. Bieber T, de la Salle H, de la Salle C, Hanau D, Wollenberg A. Expression of the high-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) on human Langerhans cells: the end of a dogma. *The Journal of investigative dermatology* 1992; 99(5): 10S-1S.
20. Novak N, Kraft S, Bieber T. IgE receptors. *Current opinion in immunology* 2001; 13(6): 721-6.
21. Nag A, Monine MI, Blinov ML, Goldstein B. A detailed mathematical model predicts that serial engagement of IgE-Fc epsilon RI complexes can enhance Syk activation in mast cells. *Journal of immunology* 2010; 185(6): 3268-76.
22. Espinoza FA, Wester MJ, Oliver JM, et al. Insights into cell membrane microdomain organization from live cell single particle tracking of the IgE high affinity receptor FcRI of mast cells. *Bulletin of mathematical biology* 2012; 74(8): 1857-911.
23. Mudde GC, Hansel TT, von Reijsen FC, Osterhoff BF, Bruijnzeel-Koomen CA. IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture? *Immunology today* 1990; 11(12): 440-3.
24. Mudde GC, Bheekha R, Bruijnzeel-Koomen CA. IgE-mediated antigen presentation. *Allergy* 1995; 50(3): 193-9.
25. Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *Jama* 1997; 278(22): 1815-22.
26. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83(12): 4464-8.
27. Weidner N, Austen KF. Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1990; 63(1): 63-72.
28. Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1997; 100(6 Pt 1): S2-24.
29. Blackley C. Experimental Researches on the Nature and Causes of Catarrhus Aestivus. Londres: Bailliere, Tindal & Cox.
30. Alergológica-2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socio-económicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Madrid: Edgraf SA; 2006.
31. Garcia Cobaleda I, De la Torre Morin F, Hardisson de la Torre A. Historical background of aeropalynology in the Canary Islands. *Allergologia et immunopathologia* 1996; 24(6): 269-84.

32. Zuberbier T, Bachert C, Bousquet PJ, et al. GA(2) LEN/EAACI pocket guide for allergen-specific immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2010; 65(12): 1525-30.
33. Durham OC. The volumetric incidence of atmospheric allergens; a proposed standard method of gravity sampling, counting, and volumetric interpolation of results. *The Journal of allergy* 1946; 17: 79-86.
34. Bush RK. Aerobiology of pollen and fungal allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1989; 84(6 Pt 2): 1120-4.
35. Hirst J. An automatic volumetric spore trap. *Ann Appl Biol* 1952; 39: 257-65.
36. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1997; 27(1): 52-9.
37. Buch C. *Physikalische Beschreibung der Canarischen Inseln*. Berlín: Druckerei der Königlichen Akademie der Wissenschaften; 1825.
38. Jardín Botánico Viera y Clavijo. Cabildo Insular de Gran Canaria. Flora de Gran Canaria. Disponible en: <http://www.jardincanario.org/busqueda-de-la-flora-de-gran-canaria> (Fecha de consulta 05/10/2015).
39. Gil ML. Flora Vasculare de Canarias (Fecha actualización: 28/08/2015). Disponible en: <http://www.floradecanarias.com/artemisa.html> (Fecha de consulta: 05/10/2015).
40. Ley 4/2010, de 4 de junio, del Catálogo Canario de Especies Protegidas. «BOE» núm. 150, de 21 de junio de 2010: 53388-406.
41. Moverare R, Larsson H, Carlsson R, Holmquist I. Mugwort-sensitized individuals from North Europe, South Europe and North America show different IgE reactivity patterns. *International archives of allergy and immunology* 2011; 154(2): 164-72.
42. Wopfner N, Gadermaier G, Egger M, et al. The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen. *International archives of allergy and immunology* 2005; 138(4): 337-46.
43. Nilsen BM, Paulsen BS. Isolation and characterization of a glycoprotein allergen, Art v II, from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *Molecular immunology* 1990; 27(10): 1047-56.
44. 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. *Molecular immunology* 2007; 44(15): 3653-60.
45. Gadermaier G, Harrer A, Girbl T, et al. Isoform identification and characterization of Art v 3, the lipid-transfer protein of mugwort pollen. *Molecular immunology* 2009; 46(10): 1919-24.

46. Jahn-Schmid B, Hauser M, Wopfner N, et al. Humoral and cellular cross-reactivity between Amb a 1, the major ragweed pollen allergen, and its mugwort homolog Art v 6. *Journal of immunology* 2012; 188(3): 1559-67.
47. Gadermaier G, Hauser M, Ferreira F. Allergens of weed pollen: an overview on recombinant and natural molecules. *Methods* 2014; 66(1): 55-66.
48. Lee YW, Choi SY, Lee EK, Sohn JH, Park JW, Hong CS. Cross-allergenicity of pollens from the Compositae family: *Artemisia vulgaris*, *Dendranthema grandiflorum*, and *Taraxacum officinale*. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2007; 99(6): 526-33.
49. Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, et al. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 101(2 Pt 1): 196-206.
50. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 2014; 69(8): 1008-25.
51. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 113(5): 832-6.
52. Sackeyfio A, Senthinathan A, Kandaswamy P, et al. Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people: summary of NICE guidance. *Bmj* 2011; 342: d747.
53. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; 125(2 Suppl 2): S116-25.
54. Furuta GT, Katzka DA. Eosinophilic Esophagitis. *The New England journal of medicine* 2015; 373(17): 1640-8.
55. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014; 69(8): 992-1007.
56. Fernandez Rivas M. Alergia a los alimentos. SEAIC Alergológica 2005. Madrid: Luzán 5, S.A. de Ediciones; 2006: 227-53.
57. Alergológica-2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socio-económicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Madrid: Edgraf SA; 2006.
58. Sampson HA. Update on food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 113(5): 805-19; quiz 20.
59. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2000; 106(4): 763-8.
60. Beyer K, Morrow E, Li XM, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001; 107(6): 1077-81.

61. Friedlander JA, DeBoer EM, Soden JS, et al. Unsedated transnasal esophagoscopy for monitoring therapy in pediatric eosinophilic esophagitis. *Gastrointestinal endoscopy* 2015.
62. Castillo R, Delgado J, Quiralte J, Blanco C, Carrillo T. Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergologia et immunopathologia* 1996; 24(3): 93-7.
63. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2000; 106(1 Pt 1): 27-36.
64. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 103(5 Pt 1): 717-28.
65. Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2000; 55(2): 235-46.
66. Wal JM. Bovine milk allergenicity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2004; 93(5 Suppl 3): S2-11.
67. Urisu A, Yamada K, Tokuda R, et al. Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *International archives of allergy and immunology* 1999; 120(3): 192-8.
68. Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, et al. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 101(1 Pt 1): 67-74.
69. Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1992; 89(3): 730-7.
70. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *Journal of immunology* 1993; 151(10): 5354-63.
71. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *International archives of allergy and immunology* 1999; 119(4): 247-58.
72. Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society transactions* 2002; 30(Pt 6): 906-10.
73. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Antigliadin IgE--indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55(4): 386-91.
74. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Life-threatening, recurrent anaphylaxis caused by allergy to gliadin and exercise. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1997; 27(2): 162-6.

75. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, et al. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 103(5 Pt 1): 912-7.
76. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, et al. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001; 108(4): 634-8.
77. Menendez-Arias L, Moneo I, Dominguez J, Rodriguez R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *European journal of biochemistry / FEBS* 1988; 177(1): 159-66.
78. Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodriguez R. Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *The Biochemical journal* 1993; 293 (Pt 3): 625-32.
79. Kelly JD, Hefle SL. 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE-binding protein. *Allergy* 2000; 55(6): 556-60.
80. Beyer K, Bardina L, Grishina G, Sampson HA. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002; 110(1): 154-9.
81. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm RM. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1992; 90(6 Pt 1): 962-9.
82. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 102(6 Pt 1): 1021-7.
83. Teuber SS, Dandekar AM, Peterson WR, Sellers CL. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 101(6 Pt 1): 807-14.
84. Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lopez-Otin C, et al. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1997; 27(7): 833-41.
85. Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends in biochemical sciences* 2001; 26(12): 740-6.
86. Leitner A, Jensen-Jarolim E, Grimm R, et al. Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-birch-mugwort-spice syndrome. *Allergy* 1998; 53(1): 36-41.

87. Palomares O, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodriguez R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2005; 94(5): 586-92.
88. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002; 110(3): 517-23.
89. Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, et al. A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. *International archives of allergy and immunology* 2000; 123(3): 205-12.
90. Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, et al. A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. *International archives of allergy and immunology* 2000; 123(3): 213-9.
91. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *The Journal of clinical investigation* 1999; 103(4): 535-42.
92. Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1991; 88(2): 172-9.
93. Burks AW, Jr., Brooks JR, Sampson HA. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1988; 81(6): 1135-42.
94. Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejón G, Pascual CY, Varela J, Martín-Esteban M, Salcedo G. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004; 34(11): 1747-53.
95. Lopez-Torrejón G, Salcedo G, Martín-Esteban M, Díaz-Perales A, Pascual CY, Sanchez-Monge R. Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 112(6): 1208-15.
96. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015.
97. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 964: 47-68.
98. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Díaz-Perales A, García-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004; 34(9): 1336-41.

99. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International archives of allergy and immunology* 2000; 122(1): 20-32.
100. Asero R, Tedeschi A. Usefulness of a short course of oral prednisone in antihistamine-resistant chronic urticaria: a retrospective analysis. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2010; 20(5): 386-90.
101. Garcia-Casado G, Crespo JF, Rodriguez J, Salcedo G. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001; 108(4): 647-9.
102. Blanco C, Diaz-Perales A, Collada C, et al. Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 103(3 Pt 1): 507-13.
103. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 111(2): 350-9.
104. Simonato B, De Lazzari F, Pasini G, et al. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2001; 31(11): 1771-8.
105. Wagner S, Breiteneder H. Hevea brasiliensis latex allergens: current panel and clinical relevance. *International archives of allergy and immunology* 2005; 136(1): 90-7.
106. Huecas S, Villalba M, Rodriguez R. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(30): 27959-66.
107. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, et al. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 112(2): 427-32.
108. Mari A, Ballmer-Weber BK, Vieths S. The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2005; 5(3): 267-73.
109. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 118(2): 481-8.
110. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, et al. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002; 109(3): 563-70.
111. Muraro A, Roberts G, Worm M, et al. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 2014; 69(8): 1026-45.

112. Cardona Dahl V, Grupo de trabajo de la Guía Gdaea. [Guideline for the management of anaphylaxis]. *Medicina clinica* 2011; 136(8): 349-55.
113. Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, et al. How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? *International archives of allergy and immunology* 2003; 132(2): 132-40.
114. Dreborg S. Food allergy in pollen-sensitive patients. *Annals of allergy* 1988; 61(6 Pt 2): 41-6.
115. Sanchez-Lopez G, Cizur M, Sanz B, Sanz ML. Prick-prick with fresh foods in patients with latex allergy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2000; 10(5): 280-2.
116. Bolhaar ST, van de Weg WE, van Ree R, et al. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005; 116(5): 1080-6.
117. Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Molecular nutrition & food research* 2007; 51(1): 135-47.
118. Macchia D, Melioli G, Pravettoni V, et al. Guidelines for the use and interpretation of diagnostic methods in adult food allergy. *Clinical and molecular allergy : CMA* 2015; 13: 27.
119. Antonicelli L, Massaccesi C, Braschi MC, Cinti B, Bilo MB, Bonifazi F. Component resolved diagnosis in real life: the risk assessment of food allergy using microarray-based immunoassay. *European annals of allergy and clinical immunology* 2014; 46(1): 30-4.
120. Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 2008; 63(7): 793-6.
121. Cochrane SA, Salt LJ, Wantling E, et al. Development of a standardized low-dose double-blind placebo-controlled challenge vehicle for the EuroPrevall project. *Allergy* 2012; 67(1): 107-13.
122. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59(7): 690-7.
123. de Silva D, Geromi M, Panesar SS, et al. Acute and long-term management of food allergy: systematic review. *Allergy* 2014; 69(2): 159-67.
124. Bolhaar ST, Tiemessen MM, Zuidmeer L, et al. Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004; 34(5): 761-9.
125. Mauro M, Russello M, Incorvaia C, et al. Birch-apple syndrome treated with birch pollen immunotherapy. *International archives of allergy and immunology* 2011; 156(4): 416-22.

126. van Hoffen E, Peeters KA, van Neerven RJ, et al. Effect of birch pollen-specific immunotherapy on birch pollen-related hazelnut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 127(1): 100-1, 1 e1-3.
127. Kinaciyan T, Jahn-Schmid B, Radakovics A, et al. Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119(4): 937-43.
128. Niederberger V, Reisinger J, Valent P, et al. Vaccination with genetically modified birch pollen allergens: immune and clinical effects on oral allergy syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119(4): 1013-6.
129. Nadeau KC, Schneider LC, Hoyte L, Borrás I, Umetsu DT. Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 127(6): 1622-4.
130. Rance F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 1999; 10(1): 33-8.
131. Rance F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy* 2000; 55(5): 496-500.
132. Caballero T, San-Martin MS, Padial MA, et al. Clinical characteristics of patients with mustard hypersensitivity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2002; 89(2): 166-71.
133. Panconesi E, Sertoli A, Fabbri P, Giorgini S, Spallanzani P. Anaphylactic shock from mustard after ingestion of pizza. *Contact dermatitis* 1980; 6(4): 294-5.
134. Widstrom L, Johansson SG. IgE-mediated anaphylaxis to mustard. *Acta dermato-venereologica* 1986; 66(1): 70-1.
135. Vidal C, Diaz C, Saez A, Rodriguez M, Iglesias A. Anaphylaxis to mustard. *Postgraduate medical journal* 1991; 67(786): 404.
136. Monreal P, Botey J, Pena M, Marin A, Eserverri JL. Mustard allergy. Two anaphylactic reactions to ingestion of mustard sauce. *Annals of allergy* 1992; 69(4): 317-20.
137. Jorro G, Morales C, Braso JV, Pelaez A. Mustard allergy: three cases of systemic reaction to ingestion of mustard sauce. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 1995; 5(1): 54-6.
138. Kanny G, Fremont S, Talhouarne G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in "chicken dips". *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 1995; 75(4): 340-2.

139. Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Maadi F, et al. Prospective study of mustard allergy: first study with double-blind placebo-controlled food challenge trials (24 cases). *Allergy* 2003; 58(4): 295-9.
140. Li J, Jin HZ. Allergic contact dermatitis caused by Chinese herbal medicine, white mustard seed. *The Journal of dermatology* 2013; 40(1): 69-70.
141. Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011. Disponible en: <https://http://www.boe.es/doue/2011/304/L00018-00063.pdf> (Fecha de consulta 07/09/2015).
142. Menendez-Arias L, Dominguez J, Moneo I, Rodriguez R. Epitope mapping of the major allergen from yellow mustard seeds, Sin a I. *Molecular immunology* 1990; 27(2): 143-50.
143. Dominguez J, Cuevas M, Urena V, Munoz T, Moneo I. Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Annals of allergy* 1990; 64(4): 352-7.
144. Gonzalez De La Pena MA, Monsalve RI, Batanero E, Villalba M, Rodriguez R. Expression in Escherichia coli of Sin a 1, the major allergen from mustard. *European journal of biochemistry / FEBS* 1996; 237(3): 827-32.
145. Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodriguez R, Cuesta-Herranz J, Palomares O. Improvement of mustard (*Sinapis alba*) allergy diagnosis and management by linking clinical features and component-resolved approaches. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 127(5): 1304-7.
146. Palomares O, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R, Villalba M. A recombinant precursor of the mustard allergen Sin a 1 retains the biochemical and immunological features of the heterodimeric native protein. *International archives of allergy and immunology* 2005; 137(1): 18-26.
147. Sirvent S, Palomares O, Vereda A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R. nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009; 39(12): 1929-36.
148. Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Monsalve RI, Rodriguez R. Isolation and characterization of a major allergen from oriental mustard seeds, BrajI. *International archives of allergy and applied immunology* 1991; 96(3): 263-70.
149. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2008; 8(1): 82-6.
150. Arlian LG, Rapp CM, Fernandez-Caldas E. Allergenicity of Euroglyphus maynei and its cross-reactivity with Dermatophagoides species. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1993; 91(5): 1051-8.

151. Arlian LG, Bernstein IL, Vyszynski-Moher DL, Gallagher JS. Investigations of culture medium-free house dust mites. IV. Cross antigenicity and allergenicity between the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1987; 79(3): 467-76.
152. Platts-Mills TA, Heymann PW, Chapman MD, Hayden ML, Wilkins SR. Cross-reacting and species-specific determinants on a major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*: development of a radioimmunoassay for antigen P1 equivalent in house dust and dust mite extracts. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1986; 78(3 Pt 1): 398-407.
153. Davies JM. Grass pollen allergens globally: the contribution of subtropical grasses to burden of allergic respiratory diseases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2014; 44(6): 790-801.
154. Gangl K, Niederberger V, Valenta R. Multiple grass mixes as opposed to single grasses for allergen immunotherapy in allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2013; 43(11): 1202-16.
155. Weber RW. Patterns of pollen cross-allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 112(2): 229-39; quiz 40.
156. Bublin M, Breiteneder H. Cross-reactivity of peanut allergens. *Current allergy and asthma reports* 2014; 14(4): 426.
157. Verma AK, Kumar S, Das M, Dwivedi PD. A comprehensive review of legume allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2013; 45(1): 30-46.
158. Restani P, Beretta B, Fiocchi A, Ballabio C, Galli CL. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2002; 89(6 Suppl 1): 11-5.
159. Carroccio A, Cavataio F, Iacono G. Cross-reactivity between milk proteins of different animals. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1999; 29(8): 1014-6.
160. Vallier P, DeChamp C, Valenta R, Vial O, Deviller P. Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1992; 22(8): 774-82.
161. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 113(5): 821-30; quiz 31.
162. Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, et al. Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. *Allergy* 2008; 63(7): 891-6.
163. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; 121(5): 1210-8 e4.

164. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; 121(6): 1331-6.
165. Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002; 110(5): 797-804.
166. Berneder M, Bublin M, Hoffmann-Sommergruber K, Hawranek T, Lang R. Allergen chip diagnosis for soy-allergic patients: Gly m 4 as a marker for severe food-allergic reactions to soy. *International archives of allergy and immunology* 2013; 161(3): 229-33.
167. Reekers R, Busche M, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Birch pollen-related foods trigger atopic dermatitis in patients with specific cutaneous T-cell responses to birch pollen antigens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 104(2 Pt 1): 466-72.
168. Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, Scibilia J, et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119(6): 1489-96.
169. Ballmer-Weber BK, Vieths S, Luttkopf D, Heuschmann P, Wuthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2000; 106(2): 373-8.
170. Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Wangorsch A, Fotisch K, Altmann F, Vieths S. Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001; 108(2): 301-7.
171. Bolhaar ST, van Ree R, Ma Y, et al. Severe allergy to sharon fruit caused by birch pollen. *International archives of allergy and immunology* 2005; 136(1): 45-52.
172. Bolhaar ST, Ree R, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Zuidmeer L. Allergy to jackfruit: a novel example of Bet v 1-related food allergy. *Allergy* 2004; 59(11): 1187-92.
173. Ballmer-Weber BK, Hoffmann A, Wuthrich B, et al. Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy* 2002; 57(3): 228-35.
174. Wuthrich B, Hofer T. [Food allergy: the celery-mugwort-spice syndrome. Association with mango allergy?]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1984; 109(25): 981-6.
175. Wuthrich B, Dietschi R. [The celery-carrot-mugwort-condiment syndrome: skin test and RAST results]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1985; 115(11): 258-64.
176. Pauli G, Bessot JC, Braun PA, Dietemann-Molard A, Kopferschmitt-Kubler MC, Thierry R. Celery allergy: clinical and biological study of 20 cases. *Annals of allergy* 1988; 60(3): 243-6.

177. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* 2006; 61(4): 461-76.
178. Wuthrich B, Stager J, Johansson SG. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990; 45(8): 566-71.
179. Jankiewicz A, Aulepp H, Baltes W, et al. Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *International archives of allergy and immunology* 1996; 111(3): 268-78.
180. Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1996; 26(10): 1161-70.
181. Gao ZS, Yang ZW, Wu SD, et al. Peach allergy in China: a dominant role for mugwort pollen lipid transfer protein as a primary sensitizer. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131(1): 224-6 e1-3.
182. Hernandez J, Garcia Selles FJ, Pagan JA, Negro JM. [Immediate hypersensitivity to fruits and vegetables and pollenosis]. *Allergologia et immunopathologia* 1985; 13(3): 197-211.
183. Caballero T, Martin-Esteban M, Garcia-Ara C, Pascual C, Ojeda A. Relationship between pollinosis and fruit or vegetable sensitization. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 1994; 5(4): 218-22.
184. Garcia Ortiz JC, Cosmes PM, Lopez-Asunsolo A. Allergy to foods in patients monosensitized to Artemisia pollen. *Allergy* 1996; 51(12): 927-31.
185. Fernandez C, Martin-Esteban M, Fiandor A, et al. Analysis of cross-reactivity between sunflower pollen and other pollens of the Compositae family. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1993; 92(5): 660-7.
186. Subiza J, Subiza JL, Hinojosa M, et al. Anaphylactic reaction after the ingestion of chamomile tea: a study of cross-reactivity with other composite pollens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1989; 84(3): 353-8.
187. de la Torre Morin F, Sanchez Machin I, Garcia Robaina JC, Fernandez-Caldas E, Sanchez Trivino M. Clinical cross-reactivity between Artemisia vulgaris and Matricaria chamomilla (chamomile). *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2001; 11(2): 118-22.
188. Vila L, Sanchez G, Sanz ML, et al. Study of a case of hypersensitivity to lettuce (*Lactuca sativa*). *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1998; 28(8): 1031-5.
189. Florido-Lopez JF, Gonzalez-Delgado P, Saenz de San Pedro B, Perez-Miranda C, Arias de Saavedra JM, Marin-Pozo JF. Allergy to natural honeys and chamomile tea. *International archives of allergy and immunology* 1995; 108(2): 170-4.

190. Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 112(4): 789-95.
191. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2000; 30(10): 1403-10.
192. Palacin A, Cumplido J, Figueroa J, et al. Cabbage lipid transfer protein Bra o 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 117(6): 1423-9.
193. Enrique E, Cistero-Bahima A, Bartolome B, et al. Platanus acerifolia pollinosis and food allergy. *Allergy* 2002; 57(4): 351-6.
194. Quiralte J, Palacios L, Rodriguez R, et al. Modelling diseases: the allergens of Olea europaea pollen. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2007; 17 Suppl 1: 24-30.
195. Martinez A, Asturias JA, Monteseirin J, et al. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from Olea europaea pollen. *Allergy* 2002; 57 Suppl 71: 17-23.
196. Florido Lopez JF, Quiralte Enriquez J, Arias de Saavedra Alias JM, Saenz de San Pedro B, Martin Casanez E. An allergen from Olea europaea pollen (Ole e 7) is associated with plant-derived food anaphylaxis. *Allergy* 2002; 57 Suppl 71: 53-9.
197. Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Rodriguez R. Allergenic contribution of the IgE-reactive domains of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9: diagnostic value in olive pollen allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2006; 97(1): 61-5.
198. Anderson LB, Jr., Dreyfuss EM, Logan J, Johnstone DE, Glaser J. Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *The Journal of allergy* 1970; 45(5): 310-9.
199. Villalta D, Asero R. Sensitization to the pollen pan-allergen profilin. Is the detection of immunoglobulin E to multiple homologous proteins from different sources clinically useful? *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2010; 20(7): 591-5.
200. Guilloux L, Morisset M, Codreanu F, Parisot L, Moneret-Vautrin DA. Peanut allergy diagnosis in the context of grass pollen sensitization for 125 patients: roles of peanut and cross-reactive carbohydrate determinants specific IgE. *International archives of allergy and immunology* 2009; 149(2): 91-7.
201. M'Raihi L, Charpin D, Pons A, Bongrand P, Vervloet D. Cross-reactivity between latex and banana. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1991; 87(1 Pt 1): 129-30.

202. Blanco C, Carrillo T, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Annals of allergy* 1994; 73(4): 309-14.
203. Beezhold DH, Sussman GL, Liss GM, Chang NS. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1996; 26(4): 416-22.
204. Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, et al. Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 104(3 Pt 1): 681-7.
205. Drouet M, Boutet S, Lauret MG, et al. [The pork-cat syndrome or crossed allergy between pork meat and cat epithelia (1)]. *Allergie et immunologie* 1994; 26(5): 166-8, 71-2.
206. Savi E, Rossi A, Incorvaia C. Cat-pork syndrome: a case report with a three years follow-up. *European annals of allergy and clinical immunology* 2006; 38(10): 366-8.
207. Posthumus J, James HR, Lane CJ, Matos LA, Platts-Mills TA, Commins SP. Initial description of pork-cat syndrome in the United States. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131(3): 923-5.
208. Szepfalusi Z, Ebner C, Pandjaitan R, et al. Egg yolk alpha-livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1994; 93(5): 932-42.
209. Quirce S, Maranon F, Umpierrez A, de las Heras M, Fernandez-Caldas E, Sastre J. Chicken serum albumin (Gal d 5*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy* 2001; 56(8): 754-62.
210. Villas F, Compes E, Fernandez-Nieto M, Munoz MP, Bartolome B, de las Heras M. Bird-egg syndrome caused by *Agapornis* species (lovebird). *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 2009; 19(1): 71-2.
211. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama* 2000; 284(23): 3043-5.
212. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 1995; 75(6 Pt 2): 543-625.
213. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy* 1993; 48(7): 473-5.
214. Adinoff AD, Rosloniec DM, McCall LL, Nelson HS. Immediate skin test reactivity to Food and Drug Administration-approved standardized extracts. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1990; 86(5): 766-74.

215. Dreborg S e. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 Suppl 10: 1-59.
216. Brown HM, Su S, Thantrey N. Prick testing for allergens standardized by using a precision needle. *Clinical allergy* 1981; 11(1): 95-8.
217. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48(14 Suppl): 48-82.
218. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012; 67(1): 18-24.
219. Osterballe O, Weeke B. A new lancet for skin prick testing. *Allergy* 1979; 34(4): 209-12.
220. Nelson HS, Knoetzer J, Bucher B. Effect of distance between sites and region of the body on results of skin prick tests. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1996; 97(2): 596-601.
221. Frolund L, Bonini S, Cocco G, et al. Allergen extracts. Standardization of preparations for bronchial provocation tests. A position paper. (EAACI Subcommittee on Bronchial Provocation Tests). *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1993; 23(8): 702-8.
222. Almind M, Dirksen A, Nielsen NH, Svendsen UG. Duration of the inhibitory activity on histamine-induced skin wheals of sedative and non-sedative antihistamines. *Allergy* 1988; 43(8): 593-6.
223. Long WF, Taylor RJ, Wagner CJ, Leavengood DC, Nelson HS. Skin test suppression by antihistamines and the development of subsensitivity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1985; 76(1): 113-7.
224. Esau S, del Carpio J, Martin JG. A comparison of the effects of ketotifen and clemastine on cutaneous and airway reactivity to histamine and allergen in atopic asthmatic subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1984; 74(3 Pt 1): 270-4.
225. Lamkin N, Jr., Lieberman P, Shereff R, Rosenberg EW, Robinson H. Effect of beta adrenergic stimulation and blockade on cutaneous reactivity to histamine. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1976; 57(5): 449-53.
226. Karaz SS, Moeckli JK, Davis W, Craig TJ. Effect of topical doxepin cream on skin testing. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1995; 96(6 Pt 1): 997-8.
227. Sullivan TJ. Pharmacologic modulation of the whealing response to histamine in human skin: identification of doxepin as a potent in vivo inhibitor. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1982; 69(3): 260-7.
228. Wolfe HI, Fontana VJ. The Effect of Tranquilizers on the Immediate Skin Wheal Reaction. a Preliminary Report. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1964; 35: 271-3.

229. Pipkorn U, Hammarlund A, Enerback L. Prolonged treatment with topical glucocorticoids results in an inhibition of the allergen-induced weal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1989; 19(1): 19-25.
230. Slott RI, Zweiman B. A controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1974; 54(4): 229-34.
231. Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1988; 82(6): 986-97.
232. Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012; 130(6): 1260-74.
233. Costongs GM, Bas BM. The first fully automated allergy analyser UniCAP: comparison with IMMULITE for allergy panel testing. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 1997; 35(11): 885-8.
234. Nolte H, DuBuske LM. Performance characteristics of a new automated enzyme immunoassay for the measurement of allergen-specific IgE. Summary of the probability outcomes comparing results of allergen skin testing to results obtained with the HYTEC system and CAP system. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 1997; 79(1): 27-34.
235. Martins TB, Bandhauer ME, Bunker AM, Roberts WL, Hill HR. New childhood and adult reference intervals for total IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014; 133(2): 589-91.
236. Dati FR, K. Reference values for serum IgE in healthy non-atopic children and adults. *Clinical chemistry* 1982; 28: 1556.
237. Kontis KJ, Chen A, Wang J, Nayak N, Li TM. Performance of a fully automated in vitro allergy testing system. *Allergologia et immunopathologia* 1997; 25(2): 63-6.
238. Eriksson NE, Wihl JA, Arrendal H. Birch pollen-related food hypersensitivity: influence of total and specific IgE levels. A multicenter study. *Allergy* 1983; 38(5): 353-7.
239. Ghunaim N, Gronlund H, Kronqvist M, et al. Antibody profiles and self-reported symptoms to pollen-related food allergens in grass pollen-allergic patients from northern Europe. *Allergy* 2005; 60(2): 185-91.
240. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of allergy and clinical immunology* 1995; 95(5 Pt 1): 962-9.

241. Caballero T, Martin-Esteban M. Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: a review. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 1998; 8(1): 6-16.
242. Sirvent S, Akotenou M, Cuesta-Herranz J, et al. The 11S globulin Sin a 2 from yellow mustard seeds shows IgE cross-reactivity with homologous counterparts from tree nuts and peanut. *Clinical and translational allergy* 2012; 2(1): 23.
243. Castells MC, Horan RF, Sheffer AL. Exercise-induced anaphylaxis (EIA). *Clinical reviews in allergy & immunology* 1999; 17(4): 413-24.
244. Rodriguez J, Crespo JF, Burks W, et al. Randomized, double-blind, crossover challenge study in 53 subjects reporting adverse reactions to melon (*Cucumis melo*). *The Journal of allergy and clinical immunology* 2000; 106(5): 968-72.
245. Blaiss MS, McCants ML, Lehrer SB. Anaphylaxis to cabbage: detection of allergens. *Annals of allergy* 1987; 58(4): 248-50.
246. Rance F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy* 2003; 58(4): 287-8.

9. ANEXO I

9. ANEXO I: PLANTILLA DE RECOGIDA DE DATOS**RECOGIDA DATOS ESTUDIO ARTEMISA-MOSTAZA (PÁGINA 1)****NÚMERO DE PACIENTE:** _____**HC:**_____ **NOMBRE:**_____**Fecha de consulta:** _____ **TLF:**_____ **F. NAC:**_____**EDAD ACTUAL:**_____ **SEXO:** M F **RAZA:**_____ **PROFESIÓN:**_____**MC:**_____ **LOCALIDAD**_____**A. MÉDICOS:** _____**A. QUIRÚRGICOS:** _____**A. FAMILIARES ATÓPICOS**_____**OTROS A. FAMILIARES:** _____**CL^aATÓPICA:** SI NO **EDAD DX:**___ **CL^a:** RITINIS / ASMA **ESTACIONAL:** SI NO**GRAVEDAD CL^a RESPIRATORIA:** _____**TTO ACTUAL CL^a RESPIRATORIA:** _____**TTOS PREVIOS:** _____**INMUNOTERAPIA:** NO / SI: _____**CL^aALIMENTOS** :SI NO **EDAD DX:**___ **CL^a:** SAO / AB / U / AE / A / AIE / DIG**PRIMERA CL^a:** RESPIRATORIA / ALIMENTARIA / AL MISMO TIEMPO / NO SABE**OTRAS CL^a:** DA / DC _____ / LATEX / RAM: AINES / PENICILINA /OTROS_____**IgE TOTAL:**_____ **Nº DE SUERO:**_____**PROV. CONJ.:** SI / NO – NEG / POS.:_____**OTROS AEROALERGENOS:** SI NO **HISTAMINA:**_____ **SUERO F.:**_____**ACAROS:** NO / SI: DPT – DF - TYRO – LEPIDO –SIRO – EURO – BLOMIA**HONGOS:** NO / SI: aspergillus – cladosporium – alternaria - penicilium**LATEX:** NO / SI: PRICK_____ IgE_____**ANIMALES:** SI NO plumas perro gato conejo cucaracha caballo

ESTUDIO ARTEMISA-MOSTAZA (PÁGINA 2)---Nº PACIENTE____

ALIMENTOS	PRICK	IgE	CLÍNICA	LATENCIA/ DURACIÓN	TTO	FECHA 1ª	TOLERA
MOSTAZA							
MOSTAZA 1							
MOSTAZA 2							
MELOCOTÓN							
MANZANA							
ALMENDRA							
AVELLANA							
GIRASOL							
CASTAÑA							
NUEZ							
CACAHUETE							
LENTEJA							
SOJA							
GARBANZO							
GUISANTE							
H. MAIZ							
COL							
COLIFLOR							
PIMIENTA							
APIO							
ZANAHORIA							
KIWI							

ESTUDIO ARTEMISA-MOSTAZA (PÁGINA 4)---Nº PACIENTE____

ARTEMISA	SI	NO	GRAMINEAS	SI	NO
OTRAS MALEZAS			LOLIUM		
CHRYSANTHEMUM			DACTYLIS		
TARAXACUM			ANTHOXANTHUM		
PLANTAGO			CYNODON		
CHENOPODIUM			POA		
SALSOLA			SECALE		
SOLIDAGO			AVENA		
ATRIPLEX			TRITICUM		
HELIANTHUS			HORDEUM		
PARIETARIA			ZEA		
URTICA			ARBOLES	SI	NO
			OLEA		
			BETULA		
			CORYLUS		
			FAGUS		
			QUERCUS		
			ULMUS		
			PLATANUS		
			FRAXINUS		
			POPULUS		
			CUPRESSUS		

10. ANEXO II

10. ANEXO II: PROTOCOLO DE LABORATORIO PARA ENSAYOS DE CAP-INHIBICIÓN.

PROTOCOLO DE CAP-INHIBICION RECIPROCA

- µl necesarios por cada determinación de IgE: **40 µl**
- Número máximo de determinaciones por cada CAP: **de 36 a 48** (dependiendo de si precisa calibración o no).
- Seleccionar sueros de pacientes con títulos elevados de IgE específica (clase 3- >3.5kU/l) frente a los antígenos A y B.

INHIBICION RECIPROCA ANTIGENO A-ANTIGENO B CON POOL DE SUEROS:

1. Inhibición de antígeno A en fase sólida con extractos comerciales de antígeno A, antígeno B y un control negativo (antígeno no relacionado con los antígenos problemas), a punto final y 4 diluciones seriadas al 1:10, más control con solución PBS, todo por duplicado (excepto el control negativo).
2. Inhibición de antígeno B en fase sólida con extractos comerciales de antígeno A, antígeno B y un control negativo (antígeno no relacionado con los antígenos problemas), a punto final y 4 diluciones seriadas al 1:10, más control con solución PBS, todo por duplicado (excepto el control negativo).

NECESIDADES POR CADA DIA/ENSAYO:

1. Pool de sueros: \approx 1.8 ml
2. Solución PBS-albúmina (ver preparación de diluciones): \approx 15 ml

PREPARACION DE DILUCIONES

1. Preparación de solución PBS-albúmina humana al 0.03%: preparar solución de PBS y tomar 33 ml a lo que añadimos 50 µl (10 mg) de albúmina humana al 20 %. Esta solución nos servirá para los dos ensayos.
2. Preparar diluciones de antígeno A: tomar 100 µl de extracto de antígeno A y añadir 900 µl de solución PBS-albúmina con lo que tendremos la dilución al 1:10 de la que tomamos 100 µl y le añadimos otros 900 µl de solución PBS-albúmina obteniendo así la dilución al 1:100. Repetir sucesivamente hasta obtener dilución al 1:10.000.
3. Preparar diluciones de antígeno B: idem que 2.
4. Preparar diluciones de antígeno control: idem que 2.

Las diluciones se prepararán el mismo día del ensayo.

El pool de sueros se podrá congelar el primer día para reutilizarlo el segundo día.

UNA VEZ PREPARADOS LOS TUBOS (POOL MAS DILUCIONES) HABRA QUE ESPERAR UN PERIODO DE INCUBACIÓN DE 1 HORA A TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE REALIZAR EL ENSAYO.

PRIMER DIA: INHIBICION CON ANTIGENO A EN FASE SOLIDA

TUBO A: 100 µl de pool (determinar IgE específica frente a antígeno A y frente a antígeno B)

TUBO B1: 50 µl de pool +50 µl de solución PBS-albúmina.

TUBO B2: 50 µl de pool +50 µl de solución PBS-albúmina.

Curva del antígeno A:

TUBO C1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A sin diluir.

TUBO C2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A sin diluir.

TUBO D1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.

TUBO D2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.

TUBO E1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:100.

TUBO E2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:100.

TUBO F1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:1000.

TUBO F2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:1000.

TUBO G1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.000.

TUBO G2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.000.

Curva del antígeno B:

TUBO H1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B sin diluir.

TUBO H2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B sin diluir.

TUBO I1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.

TUBO I2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.

TUBO J1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:100.

TUBO J2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:100.

TUBO K1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:1000.

TUBO K2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:1000.

TUBO L1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.000.

TUBO L2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.000.

Curva del control negativo:

TUBO M: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control sin diluir.

TUBO N: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:10.

TUBO O: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:100.

TUBO P: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:1000.

TUBO Q: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:10.000.

Hacer determinaciones de IgE específica frente a antígeno A en cada tubo excepto en el TUBO A donde haremos IgE específica frente al antígeno A y frente al antígeno B para determinar los títulos del pool de sueros.

2º DIA: INHIBICION CON ANTIGENO B EN FASE SOLIDA

TUBO B1: 50 µl de pool +50 µl de solución PBS-albúmina.

TUBO B2: 50 µl de pool +50 µl de solución PBS-albúmina.

Curva del antígeno A:

TUBO C1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A sin diluir.

TUBO C2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A sin diluir.

TUBO D1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.

TUBO D2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.

TUBO E1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:100.

TUBO E2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:100.

TUBO F1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:1000.

TUBO F2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:1000.

TUBO G1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.000.

TUBO G2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno A al 1:10.000.

Curva del antígeno B:

TUBO H1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B sin diluir.

TUBO H2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B sin diluir.

TUBO I1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.

TUBO I2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.

TUBO J1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:100.

TUBO J2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:100.

TUBO K1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:1000.

TUBO K2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:1000.

TUBO L1: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.000.

TUBO L2: 50 µl de pool +50 µl de antígeno B al 1:10.000.

Curva del control negativo:

TUBO M: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control sin diluir.

TUBO N: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:10.

TUBO O: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:100.

TUBO P: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:1000.

TUBO Q: 50 µl de pool +50 µl de antígeno control al 1:10.000.

Hacer determinaciones de IgE específica frente a antígeno B en cada tubo.

11. ANEXO III

Original article

Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods

Background: Mustard IgE-mediated allergy is supposed to be a rare cause of food allergy, and its clinical features and cross-reactivities have not been fully elucidated.

Methods: A prospective study was carried out, recruiting mustard allergic patients, and paired control subjects. A clinical questionnaire was administered, and skin-prick tests (SPT) with panels of aeroallergens and foods, serum extraction for *in vitro* tests and double-blind placebo-controlled food challenges (DBPCFC) were performed.

Results: Thirty-eight mainly adult patients, with 10.5% reporting systemic anaphylaxis, were included in the study [age (mean \pm SD): 21.9 \pm 8.6 years]. DBPCFC were performed in 24 patients, being positive in 14 cases (58.3%). Patients with positive outcome showed significantly greater mustard SPT than those with negative outcome (8.2 \pm 3.7 vs 5.3 \pm 2.4 mm, $P < 0.05$), and the receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis yielded a cut-off value for mustard commercial SPT of 8 mm, with a specificity of 90% (95% CI, 55.5–98.3), and a sensitivity of 50% (95% CI, 23.1–76.9). A significant association between mustard hypersensitivity and mugwort pollen sensitization was found (97.4% of patients), with partial cross-reactivity demonstrated by UniCAP System inhibition assays. All patients showed sensitization to other members of Brassicaceae family, and cross-reactivity among them was also confirmed. Moreover, significant associations with nut (97.4%), leguminous (94.7%), corn (78.9%), and Rosaceae fruit (89.5%) sensitizations were also shown. Around 40% of these food sensitizations were symptomatic, including food-dependent exercise-induced anaphylaxis in six patients.

Conclusions: Mustard allergy is a not-uncommon disorder that can induce severe reactions. Significant associations with mugwort pollinosis and several plant-derived food allergies are demonstrated, suggesting a new mustard–mugwort allergy syndrome. A relationship between this syndrome and food-dependent exercise-induced anaphylaxis is also reported.

**J. Figueroa, C. Blanco,
A. G. Dumpiérrez, L. Almeida,
N. Ortega, R. Castillo, L. Navarro,
E. Pérez, M. D. Gallego, T. Carrillo**

Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

Key words: anaphylaxis; Brassicaceae; cross-reactivity; mugwort pollen; mustard allergy.

Dr Carlos Blanco
Servicio de Alergia
Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín
C/Bco. de la Ballena s/n
35020 Las Palmas de G.C.
Spain

Accepted for publication 6 May 2004

Mustard plants belong to the Brassicaceae family, together with broccoli, brussel sprouts, turnip, cabbage, cauliflower, kohlrabi, rutabaga, watercress, radish and rapeseed. Down the centuries, mustard has been used for culinary purposes, mainly in sauces, as a seasoning in main dishes, or as an ingredient in salad dressings. There are two major types of mustard seeds: white (*Sinapis alba*

or yellow mustard) and brown (*Brassica juncea* or oriental mustard). White mustard seeds are much larger than the brown variety but a lot less pungent, being the main ingredient in American-style mustards. White and brown seeds are blended to make English mustard. Brown mustard seeds are the main ingredient in European and Chinese mustards. Mustard seeds are sold whole, ground into powder or processed further into prepared mustard. In Spain, mustard consumption is mainly related to sauces used in fast-food restaurants.

Despite its widespread use, mustard is supposed to be a rare cause of food allergy, both in adults and children, although it has been included in a list of 12 potential

Abbreviations: CI, confidence interval; DBPCFC, double-blind placebo-controlled food challenge; MW, molecular weight; OAS, oral allergy syndrome; ROC, receiver-operating characteristic; SBPCFC, single-blind placebo-controlled food challenge; SD, standard deviation; SPT, skin-prick test.

allergenic ingredients to be labelled in a recent European Union directive on food labelling. In fact, only a few case reports of anaphylaxis to mustard in adult patients are available in the literature (1–6). Sometimes, it presents as a hidden allergen, which makes diagnosis more difficult (1, 6). Surprisingly, in one study performed in France among children, mustard allergy was ranked as the fourth aetiological agent in prevalence of food allergens – after eggs, peanuts and cow's milk (7). The same investigators have subsequently studied 36 children with positive mustard skin-prick test (SPT), 15 of them being allergic – showing positive single-blind placebo-controlled food challenges (SBPCFC) – to conclude that mustard allergy frequently starts early in life, and that clinical symptoms of mustard allergy in children seem to be not as severe as in adults (8). Moreover, clinical characteristics of 29 mustard-allergic adult patients have been reported, including systemic anaphylactic reactions in almost 50% of them (9). Recently, 24 double-blind and six single-blind placebo-controlled food challenges have been carried out in 28 children and two adults sensitized to mustard, showing that 23.3% of them were truly allergic, as defined by a positive challenge (10).

Characteristics of antigens responsible for mustard immediate hypersensitivity have been investigated by various authors. A major allergen of white mustard, Sin a 1, has been characterized as a seed storage protein, belonging to the 2S albumin family, with a molecular weight (MW) of 14 kDa (11). Its structure consists of two polypeptide chains linked by a disulphide bridge, which resists both heating and digestion by trypsin (12, 13). A major allergen of the oriental mustard, Bra j 1, has been also identified as a seed-storage protein from the 2S albumin family, with a MW of approximately 16 kDa, being closely related in structure to Sin a 1 (14, 15).

The objective of this paper is to study a group of 38 subjects with mustard IgE-mediated hypersensitivity, including double-blind placebo-controlled food challenges (DBPCFC) in 24 of them.

Methods

Subjects

A prospective study was designed in our Allergy Section, which was attended by both children and adults, and was approved by our hospital Institutional Review Board. It comprised a detailed clinical history, *in vivo* skin tests, and serum extraction for *in vitro* assays. During a 2-year period, every patient reporting immediate adverse reactions related to mustard ingestion, suggestive of being IgE-mediated, and showing positive SPT to a mustard extract, was recruited. Food immediate hypersensitivity was diagnosed on the basis of a suggestive clinical history, complemented with a positive SPT to the corresponding food. When dealing with a mustard not-severe adverse reaction, food allergy was further confirmed by DBPCFC tests. A control group of dust-mite allergic subjects, paired for age and sex with our patients, was also recruited. Written

informed consent was obtained from both patients and controls before admission in the study.

Skin-prick tests

Skin-prick tests were performed in all patients and controls according to standard procedures with a panel of commercial aeroallergen extracts including dust mites – *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Tyrophagus putrescentiae* and *Lepidoglyphus destructor*; fungi – *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*; pollens – *Olea europea*, *Lolium perenne* and *Artemisia vulgaris*; animal epithelia – cat, dog, rabbit and horse; and latex (ALK-Abello, Madrid, Spain). A panel of other commercial pollen extracts were also tested, including nine grass, nine weed and nine tree pollens (ALK-Abello, Bial-Aristegui, Bilbao, Spain and CBF-Leti, Madrid, Spain).

In the same way, they were also skin tested with a panel of commercial food extracts, including milk, egg, hazelnut, peanut, banana, peach, avocado, walnut, apple, wheat, corn, and barley (ALK-Abello); chestnut, sunflower seed, kiwi, chickpea, lentil, mustard (*S. alba*) and squid (Bial-Aristegui); almond, green pea, fish and lobster (Allergy Therapeutics, Barcelona, Spain); and soy meal (CBF-Leti). Meanwhile, SPT with celery, carrot, pepper, cabbage and cauliflower were made by the prick-prick method (16), which was also used for testing patients who underwent DBPCFC with the mustard sauce, used for that purpose. Results of SPT are expressed as the mean wheal diameter (in mm) after 15 min of puncture. Histamine dihydrochloride (10 mg/ml) and physiologic saline solutions served as positive and negative controls, respectively. A mean wheal diameter > 3 mm, compared with the saline control, was considered a positive response.

Food challenges

Patients were challenged in a double-blind, placebo-controlled fashion, as described elsewhere (17). Food challenge was not performed when a patient had a history of severe anaphylaxis to mustard (adverse reaction involving at least three target organs or with demonstrated vascular collapse). A commercial yellow mustard sauce was masked in a natural yoghurt-based vehicle, containing a mix of vanilla and lemon juices, sugar and yellow colouring. Mustard sauce was composed of water, *S. alba* seeds (14% w/v), vinegar, salt, turmeric, paprika and cloves, and it was free of sulphites. Apart from mustard, all ingredients of both mustard sauce and vehicle were known to be tolerated by all patients. A previous study in mustard-non-allergic volunteers was carried out in order to demonstrate that 10 g of mustard sauce could be masked by this method, and no tingling sensation that could be mistaken as an oral allergy syndrome (OAS) was observed. Preparation of challenges was performed in the allergy laboratory in the same morning, and subjects were then randomly assigned to either food or placebo (vehicle), with a 2-h interval between the first and second part of the challenge. Increasing doses (80, 240, 800, 2400 and 6480 mg) were administered with a 15-min interval until symptoms appeared or a cumulative dose of 10 g of mustard sauce was reached. Mustard allergy was accepted if the subject had symptoms after challenge with active substance and not with placebo. An open feeding of up to 25 g of mustard sauce followed negative blinded challenges when patients wished to eat mustard.

In vitro tests

Total IgE and specific IgE to mugwort pollen, mustard, cabbage, cauliflower, broccoli, and other foods if involved in adverse

reactions, were determined in patients and controls by the UniCAP System (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden), following the manufacturer's instructions. A specific IgE >0.35 kU/l was considered positive.

A pool of sera from five mustard-allergic patients, each showing specific IgE values to both mustard and mugwort pollen higher than 3.5 kU/l (CAP class III and more), was used for CAP inhibition assays. Duplicated samples of 50 µl of the undiluted pool of sera were premixed with 50 µl of five increasing 1 : 10 dilutions of the inhibitor solution in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 0.03% (w/v) of serum albumin. After 1-h of incubation at room temperature, specific IgE levels to mustard and mugwort pollen were determined, following the UniCAP System manual. Commercial extracts of mustard (Bial-Aristegui), *Artemisia vulgaris* (ALK-Abello), and *C. herbarum* (ALK-Abello) – as a negative control – were used as inhibitors. Similarly, inhibition assays with each of the five sera and the same inhibitor extracts, but this time undiluted, were performed.

In the same way, sera from 11 of the 38 patients, who not only showed specific IgE values to cabbage, cauliflower and broccoli, higher than 3.50 kU/l, but also referred symptoms after ingestion of these vegetables, were used for individual CAP inhibition assays. For that purpose, duplicated 50-µl serum samples were premixed with 50 µl of the same inhibitor extracts mentioned above, and the specific IgE values to cabbage, cauliflower and broccoli were then determined.

Statistical evaluation

Statistical significance was tested with the Student's *t*-test or the chi-square test, as appropriate. A *P*-value of <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference between groups. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve, sensitivity, and specificity were also calculated, when needed.

Results

General characteristics

Thirty-eight mustard-hypersensitive patients were included in the study, whose general characteristics are summarized in Table 1. Mean age (\pm SD) was 21.9 ± 8.6 years (range 3–39), with only five patients under 14 years of age, and a slight predominance of females (20 : 18). Thirty-five patients (92.1%) were atopic, as defined by a personal history of respiratory allergy, together with positive SPT to several common aeroallergens. Of the atopic group, 17 patients (48.6%) suffered from rhinitis and bronchial asthma, 12 (34.3%) showed only rhinitis, two had only bronchial asthma (5.7%), and in four cases (11.4%) both atopic dermatitis and respiratory symptoms were present. In 29 of them (82.9%), respiratory symptoms preceded food allergy onset, suggesting a primary sensitization via inhalant route. Total IgE ranged from 12 to >2000 kU/l, with a geometric mean of 250.4 kU/l, and it was within normal limits (< 100 kU/l) in nine patients (23.7%).

Clinical manifestations of mustard allergy reported by patients consisted of OAS in 18 cases (47.4%), urticaria/angioedema in 16 (42.1%), and systemic anaphylaxis in

four (10.5%) – one of them with mustard-dependent exercise-induced anaphylaxis. Mustard SPT was positive in all patients, with a wheal (mean \pm SD) of 6.7 ± 3.6 mm, being negative in all control subjects. Specific IgE to mustard showed a positive result in 35 patients (92.1%), with a geometric mean of 1.7 kU/l, ranging from <0.35 to 24.0 kU/l, and being negative in controls (Table 1).

Double-blind food challenges

Fourteen patients did not undergo DBPCFC because of either severe symptoms ($n = 4$) or because of denial of consent. The remaining 24 patients underwent DBPCFC, with all of them positive for prick-prick test to the mustard sauce used for oral challenge, with a mean wheal diameter (\pm SD) of 6.5 ± 2.6 mm (range 3–14 mm), and no significant differences with commercial mustard SPT results. In 14 cases (58.3%), mustard challenge was positive, with OAS being the most frequent symptom observed [in 10 patients (71.4%)]. They showed pruritus and mild angioedema of the lips, tongue, palate and throat, followed by a rapid resolution of symptoms. Nevertheless, one patient showed angioedema and bronchial asthma after mustard ingestion, meanwhile patient no. 15 reacted with systemic anaphylaxis, with a significant rise in tryptase levels from 11.4 µg/l at baseline to 23.6 µg/l. Although showing highly positive mustard SPT and specific IgE results, this patient referred only OAS in his clinical history. All patients completely improved after symptomatic treatment in <90 min.

Mean cumulative reactive dose of mustard sauce (\pm SD) was 891.4 ± 855.2 mg, equivalent to 124.8 ± 119.7 mg of mustard, and no significant relation with mustard SPT or specific IgE could be demonstrated. When comparing commercial mustard extract SPT results between truly allergic patients (positive DBPCFC) and sensitized patients (negative DBPCFC), a statistically significant difference ($P < 0.05$) was found (8.2 ± 3.7 vs 5.3 ± 2.4 mm). The area under the ROC curve was 0.736, with a 95% confidence interval (CI) of 0.518–0.892. The best cut-off value for mustard commercial SPT was 8 mm, with a specificity of 90% (95% CI, 55.5–98.3), and a sensitivity of 50% (95% CI, 23.1–76.9) for predicting a positive challenge outcome. No significant differences were found between both subgroups of patients, regarding either prick-prick or specific IgE tests to mustard. Four of the 10 patients with negative DBPCFC wished to eat mustard, and they were subsequently open-challenged with up to 25 g of mustard sauce in a hamburger, with good tolerance in all cases.

Aeroallergen sensitizations

Diverse mustard-associated aeroallergen sensitizations were found in mustard-hypersensitive patients (Table 2).

Table 1. Clinical characteristics of 38 patients with mustard IgE-mediated hypersensitivity

No.	Age/sex	Atopic symptoms	Total IgE (kU/l)	Symptoms reported	Mustard		
					SPT/prick-prick*	Specific IgE (kU/l)	DBPCFC (symptoms–dose†)
1	24/F	r, BA	1234	U/AE	3/4	1.17	Negative
2	18/F	r, BA	12	OAS	14/6	1.68	(OAS-44.8)
3	23/F	r	361	OAS	5/6	0.85	(OAS-44.8)
4	39/F	r	294	OAS	3/5	0.95	Negative
5	14/F	r	350	U/AE	5/4	7.69	Negative
6	26/F	r	57	OAS	5/6	1.74	(OAS-44.8)
7	25/M	–	49	OAS	4/6	1.22	Negative
8	31/M	r, BA	158	U/AE	10/9	0.75	(OAS-156.8)
9	29/F	r, BA, ad	221	OAS	3/6	<0.35	(OAS-44.8)
10	15/F	r, ad	95	U/AE	8/6	0.46	Negative
11	24/M	r, BA	115	U/AE	3/6	<0.35	Negative
12	15/M	r, BA, ad	1516	OAS	10/9	1.73	(OAS-492.8)
13	28/F	r, BA	322	U/AE	7/5	1.74	Negative
14	17/M	r	78	U/AE	10/5	0.45	Negative
15	27/F	r, BA	241	OAS	15/13	24.00	(A-156.8)
16	15/M	r, BA	212	U/AE	7/4	0.91	(U-44.8)
17	11/M	r	82	OAS	3/3	1.10	(OAS-156.8)
18	26/F	r	596	U/AE	7/nd	0.50	nd
19	8/M	r	309	U/AE	6/nd	3.34	nd
20	9/M	r, BA	>2000	A	8/nd	9.75	nd
21	27/F	r, BA	681	OAS	4/nd	2.06	nd
22	6/M	r, BA, ad	>2000	U/AE	3/nd	4.69	nd
23	15/M	BA	130	OAS	12/nd	2.35	nd
24	3/M	r, BA	308	U/AE	4/nd	0.98	nd
25	29/M	r	314	U/AE	3/nd	6.22	nd
26	16/M	r	739	OAS	9/5	7.49	(OAS/C-156.8)
27	24/F	BA	895	OAS	6/6	1.30	Negative
28	23/F	r	256	OAS	4/8	2.01	Negative
29	20/F	–	45	OAS	16/nd	0.70	nd
30	33/F	r, BA	113	A	4/nd	2.06	nd
31	35/F	r, BA	36	OAS	10/6	2.42	(OAS-156.8)
32	28/M	r	294	OAS	7/14	17.00	(OAS-44.8)
33	37/F	r, BA	>2000	U/AE	11/8	1.99	(AE/AS-156.8)
34	29/M	r, BA	448	OAS	6/5	1.85	(OAS-44.8)
35	28/F	–	39	EIA	5/nd	<0.35	nd
36	16/M	r, BA	329	U/AE	5/nd	0.52	nd
37	23/F	r, BA	650	A	3/nd	7.71	nd
38	16/M	r, BA	329	U/AE	5/nd	0.52	nd

No., patient number; F, female; M, male; r, rhinitis; BA, bronchial asthma; ad, atopic dermatitis; U, urticaria; AE, angioedema; OAS, oral allergy syndrome; A, anaphylaxis; EIA, exercise induced anaphylaxis; nd, not done; DBPCFC, double-blind placebo-controlled food challenge; C, conjunctivitis.

* Expressed in millimetre of mean wheal diameter 15 min after puncture, performed with a mustard commercial extract (SPT) or with a commercial mustard sauce (prick-prick).

† Dose–response expressed in milligrams of mustard.

Surprisingly, 37 of the 38 patients (97.4%) were sensitized to *A. vulgaris* pollen, which is rather a rare cause of respiratory allergy in our area, and 34 of them also showed a positive mugwort-specific IgE determination, with a geometric mean value of 2.9 kU/l (ranging from 0.35 to 83.5). This association was highly significant, when compared with the paired control group ($P < 0.001$). Thirty-five patients (92.1%) were also sensitized to other pollens besides mugwort although at lower rates, including weeds such as *Chenopodium* and *Chrysanthemum* (26 cases each); grasses in 20 subjects, such as *Poa* ($n = 14$), *Lolium* ($n = 13$) and *Anthoxanthum*

($n = 13$); and trees in 28 cases, such as *Ulmus* ($n = 25$) and *Platanus* ($n = 15$).

With respect to other aeroallergens, 26 patients (68.4%) were sensitized to mites, both to *Dermatophagoides* and to storage mites, and 22 (57.9%) to animal – cat and dog epithelia – which are in fact the most frequent aetiological agents of respiratory allergy in our area. Six subjects (15.8%) showed fungus sensitization, five of them to *A. alternata*. Another four patients (10.5%) showed latex sensitization, which was symptomatic in two cases. There were no significant differences in sensitizations to fungi, animals or latex between study and control

Table 2. Aeroallergen and plant-derived food sensitizations in a group of 38 patients with mustard IgE-mediated hypersensitivity

No.	Mugwort SPT (mm)	Mugwort IgE (kU/l)	Other pollens	Other aeroallergens	Plant-derived foods
1	10	64.70	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
2	4	0.76	w, t	–	b, n, l, r, c
3	7	3.29	w, t	–	b, n, l, r
4	3	<0.35	w, t	Mites, fungi, animals	b, n, l, r
5	5	42.90	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
6	6	5.26	w, g, t	–	b, n, l, r, c
7	3	1.44	w, t	–	b, n, l, r, c
8	1	<0.35	–	Mites, animals	b, n, l, r, c
9	4	1.15	w, t	–	b, n, l, r
10	6	7.75	w, t	Mites	b, n, l, r, c
11	4	<0.35	w, t	Mites, animals	b, n
12	6	3.79	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
13	5	0.64	w, t	Mites, animals, latex	b, n, l, r
14	5	4.01	w	Fungi	b, n, l, r, c
15	10	3.51	w, g	Animals, latex	b, n, l, r
16	6	0.77	w, t	–	b, n, l, r
17	3	<0.35	–	Mites	b, n, l, c
18	20	4.63	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
19	8	21.10	w, g	Mites, fungi, animals	b, n, l, r
20	5	24.60	w, g, t	Mites, fungi, animals, latex	b, n, l, r
21	7	23.70	w, t	Mites, animals	b, n, l, r
22	9	83.50	w, t	Mites, animals	b, n, l, c
23	3	0.55	w, g, t	Fungi, animals	b, n, l, r
24	4	2.67	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
25	7	1.40	w, g, t	Mites	b, n, l, r
26	9	0.46	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r, c
27	5	15.00	w, g, t	Mites, fungi, animals	b, n, l, r
28	3	0.65	w, g	Mites	b, n, l, r
29	8	2.62	w, g, t	–	b, n, l, r
30	4	2.16	w, t	Mites, animals	b, n, l, r
31	4	82.80	w, g, t	Mites	b, n, l, r
32	4	0.69	w, g, t	–	b, n, l, r
33	4	0.57	w, g	Mites, animals, latex	b, n, l, r
34	5	1.00	w	Mites	b, n, l, r
35	3	3.16	–	–	b, n, l, r
36	3	2.08	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r
37	5	28.10	w, g, t	Mites, animals	b, c
38	3	2.08	w, g, t	Mites, animals	b, n, l, r

No., patient number; w, weeds excluding mugwort; g, grasses; t, trees; b, Brassicaceae family excluding mustard; n, nuts excluding almond and peanut; l, leguminous including peanut; r, Rosaceae family including almond; c, corn.

groups. No pollen sensitization was found among control subjects.

Food sensitizations

Mustard-hypersensitive patients also showed a wide range of food-associated sensitizations, reaching as much as 578 in the whole patient group, with clinical manifestations in up to 242 cases (41.9%). These manifestations comprised of mild symptoms such as OAS (48.8%) to more severe symptoms like urticaria/angioedema (40.1%), anaphylaxis (3.7%), food-dependent exercise-induced anaphylaxis in six patients (2.5%), or bronchial

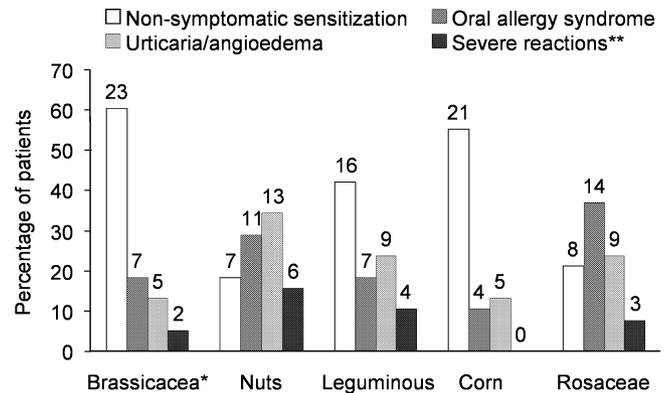


Figure 1. Food-associated sensitizations in a group of 38 patients with mustard IgE-mediated hypersensitivity. Results are expressed in percentage of patients (relative frequency). Number of patients in each group is shown at the top of the columns. For calculation purposes, neither peanut nor almond were included in the nuts group, because they were in leguminous family and Rosaceae fruits, respectively. *Excluding mustard, **including bronchial asthma, systemic anaphylaxis and exercise-induced anaphylaxis.

asthma (5%). Plant-derived foods most commonly involved are summarized in Table 2, and the clinical symptoms described in Fig. 1.

All our patients (100%) showed associated sensitization to vegetables belonging to Brassicaceae family excluding mustard, 15 of them with clinical symptoms. Nine of these 15 patients were allergic to both cabbage and cauliflower, five of them only to cabbage, and only one patient showed clinical manifestations not only to cabbage and cauliflower, but also to broccoli. One case of systemic anaphylaxis and another of exercise-induced anaphylaxis were reported, both involving uncooked cabbage consumption. These sensitizations were further confirmed by determining specific IgE to cabbage, cauliflower and broccoli, which was positive in 37 of the 38 patients, with geometric mean values (ranges) of 4.3 (0.35–76.6), 5.8 (0.35–89.8) and 4.6 kU/l (0.35–69.3), respectively. Specific IgE to cabbage, cauliflower and broccoli results were negative in control subjects.

Other food-associated sensitizations comprised of nuts – excluding peanut and almond – in 37 patients (97.4%), 30 of them with clinical allergy; to leguminous – including peanut in this group – in 36 patients (94.7%), 20 of them symptomatic; corn – with no other cereals – in 30 patients (78.9%), nine of them allergic; Rosaceae fruits – including almond – in 34 patients (89.5%), 26 of them reporting symptoms on ingestion; and to several other foods at lower sensitization rates. All these food-associated sensitizations detailed were highly significant ($P < 0.001$) when compared with the control group.

Exercise-induced anaphylaxis was diagnosed in six patients, but food challenges with or without exercise

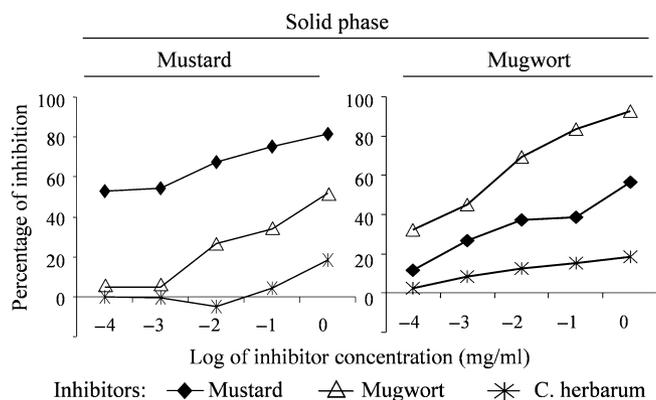


Figure 2. Reciprocal CAP inhibition assays between mustard and mugwort pollen, using a pool of sera from five mustard allergic patients, and a *C. herbarum* commercial extract as negative control. Inhibitions higher than 50% were reached at maximum concentrations of either mustard or mugwort, when used as inhibitors of the respective counterpart in solid phase, meanwhile inhibitions with control extract were lower than 20%.

were not performed because of the severity of reactions. Foods involved were peach, peanut, walnut, banana, sunflower seed, and one patient reacted to both mustard and cabbage in different events. The time lapse between food consumption and exercise-induced reaction ranged from 30 to 90 min, and the type of exercise involved was a game of football in three patients, jogging in two, and gymnasium exercise in another.

CAP inhibition assays

Results of CAP inhibition assays with a pool of sera from five mustard allergic patients are shown in Fig. 2. When used as inhibitors, both mustard and mugwort extracts manage to inhibit >50% – at maximum concentrations – the IgE binding to their correspondent counterpart in solid phase. We have further investigated reciprocal mustard–mugwort maximum inhibitions with each of those five sera. When mustard was used in solid phase, mugwort pollen maximum inhibition levels ranged from 28 to 100%, meanwhile with mugwort pollen in solid phase, mustard maximum inhibition rates varied from 19 to 83%, thus demonstrating a high individual cross-reaction variability, which could explain the partial reciprocal cross-inhibition when using this pool of sera.

In the same way, results of CAP inhibition experiments with individual sera from 11 patients allergic to cabbage, cauliflower and broccoli are shown in Fig. 3. Mustard commercial extract manage to inhibit from 28 to 88% the IgE-binding to the respective Brassicaceae in solid phase, meanwhile mugwort pollen did from 32 to 90%.

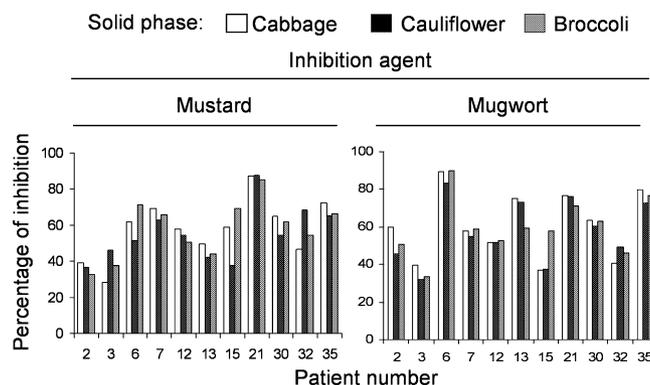


Figure 3. CAP inhibition assays performed with individual sera from a subgroup of 11 patients who were allergic not only to mustard, but also to cabbage, cauliflower and broccoli. When using each one of these Brassicaceae in solid phase, mustard commercial extract manage to inhibit from 28 to 88%, meanwhile mugwort pollen commercial extract did from 32 to 90%. A *C. herbarum* commercial extract, used as negative control, showed inhibitions lower than 10%.

Discussion

Although IgE-mediated hypersensitivity to mustard is considered to be a very uncommon problem, a group of 38 patients is here described, and we have demonstrated a significant association of this condition with sensitizations to mugwort pollen, to other members of the Brassicaceae family, and to several unrelated plant-derived foods. In contrast with previous reports (7), mustard allergy is more frequent among adult patients in our area. Moreover, meanwhile atopic dermatitis has been described as the most common clinical manifestations of mustard allergy in children, and with no anaphylaxis observed at this age group (8), we have found that OAS is very frequent among adults, with systemic anaphylaxis in as much as 10% of them. This fact suggests that, as previously reported with other foods (18), children may sensitize to mustard via the oral route, meanwhile adult patients could sensitize to a cross-reacting aeroallergen by the respiratory route. Prospective epidemiological studies are needed to fully confirm these data.

Nowadays, DBPCFC is the gold standard for food allergy diagnosis (8, 10). However, in the particular case of mustard, it is not easy to appropriately mask its strong taste. We have managed to do it by using a yoghurt-based vehicle with vanilla–lemon flavouring, reaching a total final dose of 10 g of mustard sauce. Meanwhile Rance et al. (8) have found a 42% rate of mustard allergy in children sensitized to mustard, by using SBPCFC, Morisset et al. (10) have observed a rather lower rate (23.3%), by performing single- and double-blind placebo-controlled food challenges. In our study, almost 60% of the mustard DBPCFC showed positive results, a rate considerable higher than previously reported, which could be related to both patient inclusion criteria and DBPCFC method.

Discrepancies between clinical history and DBPCFC results, regarding both outcome and severity of food-induced adverse reaction, agree with previous data reported on DBPCFC performed with other plant-derived foods (19, 20). It is remarkable that we have demonstrated a significant relationship between SPT mean wheal diameter, performed with a mustard commercial extract, and challenge outcome, obtaining a threshold value of 8 mm, with a specificity of 90% and a sensitivity of 50%.

It is well known that patients with respiratory allergy to pollens frequently show significantly associated IgE-mediated hypersensitivities to certain foods, mainly fruits and vegetables (21, 22). These associated allergies can be very important from the clinical point of view, and are sometimes referred to as 'syndromes'. An example is the so-called celery–mugwort–birch–spice syndrome, described in Center Europe, and defined by the association between mugwort pollinosis, birch pollinosis and certain food allergies – mainly to celery and spices (23–26). The immunopathological basis for these clinical associations is the cross-reactivity among antigens from different sources, because of molecular similarities among their epitopes (21, 22). The ubiquitous profilin family, as well as food homologues of Art v 1 – a major mugwort allergen in the MW range of 60 kDa – are potentially responsible for this celery–mugwort–birch–spice syndrome (24).

Caballero et al. (9, 22) mentioned a possible association between mugwort pollinosis and mustard – among several other foods – allergy. However, Rance et al. (8) did not find such associations with pollens or foods in a group of 36 children sensitized to mustard. A recent study on mustard allergy confirmed by food challenges has not focused on possible associations to pollen or other food allergies (10). Our series of patients showed not only a highly significant association between mustard and mugwort allergies, but also among mustard allergy and several other unrelated plant-derived food immediate hypersensitivities. In fact, nuts, legumes, Rosaceae fruits, and corn allergies are also involved. Moreover, partial cross-reactivity between mustard and mugwort pollen was confirmed by CAP-inhibition assays. Therefore, although a primary sensitization to other cross-reacting pollen has not been ruled out, our data suggests the existence of a so far not described mugwort–mustard allergy syndrome, which probably involves various taxonomically unrelated plant-derived food families. Both profilins and homologues of Art v 1 could be responsible for this syndrome, as well as lipid transfer proteins, which have been recently described as allergens of Rosaceae fruits and mugwort pollen (27), and studies – including immunoblot analysis – should be performed to further characterize the antigens involved.

Possible cross-reactivity of mustard with other members of the Brassicaceae family has been suggested, but some authors could not confirm this hypothesis (4, 5), and therefore it is considered to be a rare condition (8, 28). However, a patient with anaphylaxis to cabbage and positive skin tests not only to this food, but also to mustard,

cauliflower and broccoli has been described (29). What we have found is that all our mustard allergic patients were sensitized to other members of the Brassicaceae family, and approximately 40% of them were truly allergic to at least one of them, suggesting that cross-reactions between mustard and taxonomically related foods are very common and clinically relevant. Furthermore, we have confirmed cross-reactivity among mustard, mugwort pollen and other Brassicaceae vegetables by CAP-inhibition assays.

Food-dependent exercise-induced anaphylaxis is a well-defined disorder that is increasingly being recognized, which is usually triggered by specific foods (30). So far, wheat allergy has been the most frequently implicated, although at times no specific food is identified. To our knowledge, neither mustard nor mugwort allergies have been previously related to food-dependent exercise-induced anaphylaxis. In this context, it is noteworthy that six of our mugwort-food allergic patients suffered seven episodes of specific food-dependent exercise-induced anaphylaxis, in one case directly induced by mustard ingestion, although we did not confirm this diagnose by specific challenge due to severity of reactions. This suggests that the allergens responsible for the mugwort–mustard allergy syndrome are at the same time implicated in most cases of food-dependent exercise-induced anaphylaxis, at least in our area.

In our opinion, the mugwort–mustard allergy syndrome here proposed could have clear clinical implications. Thus, every patient allergic to mugwort should be asked about adverse reactions to mustard and other foods, and skin tested with a battery of plant-derived foods. At the same time, every patient allergic to mustard must avoid other members of the Brassicaceae family, until tolerance is demonstrated by the corresponding study. In these patients, respiratory symptoms during pollen season and adverse reactions to other plant-derived foods should be ruled out. Finally, mugwort–mustard and related food allergies must be considered in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis.

In conclusion, mustard IgE-mediated allergy is a not uncommon disorder that can induce severe adverse reactions, and frequently involves other members of the Brassicaceae family. A significant association with both mugwort pollinosis and several unrelated plant-derived food allergies is demonstrated, constituting a novel mugwort–mustard allergy syndrome. At the same time, an intriguing association of this syndrome with food-dependent exercise-induced anaphylaxis is here described.

Acknowledgments

We thank Rosabel Afonso and Juan Blanco for technical assistance, as well as all the personnel from Allergy Section of Hospital Dr. Negrin for their invaluable collaboration. Supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCiii-RTIC-G03/094 and RedRespira-ISCiii-RTIC-C03/11).

References

- Panconesi E, Sertoli A, Fabbri P, Giorgini S, Spallanzani P. Anaphylactic shock from mustard after ingestion of pizza. *Contact Dermat* 1980;**6**: 294–295.
- Widström L, Johansson SGO. IgE-mediated anaphylaxis to mustard. *Acta Derm Venereol* 1986;**66**:70–71.
- Vidal C, Diaz C, Saez A, Rodriguez M, Iglesias A. Anaphylaxis to mustard [letter]. *Postgrad Med J* 1991;**67**:404.
- Monreal P, Botey J, Pena M, Marin A, Eserverri JL. Mustard allergy. Two anaphylactic reactions to ingestion of mustard sauce. *Ann Allergy* 1992;**69**:317–320.
- Jorro G, Morales C, Braso JV, Pelaez A. Mustard allergy: three cases of systemic reaction to ingestion of mustard sauce. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995;**5**:54–56.
- Kanny G, Fremont S, Talhouarne G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in 'chicken dips'. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;**75**:340–342.
- Rance F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;**10**:33–38.
- Rance F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy* 2000;**55**: 496–500.
- Caballero T, San-Martin MS, Padial MA, Contreras J, Cabañas R, Barranco P et al. Clinical characteristics of patients with mustard hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;**89**:166–171.
- Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Maadi F, Frémont S, Guénara L, Croizier A et al. Prospective study of mustard allergy: first study with double-blind placebo-controlled food challenge trial (24 cases). *Allergy* 2003;**58**:295–299.
- Menendez-Arias L, Moneo I, Dominguez J, Rodriguez R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *Eur J Biochem* 1988;**177**:159–166.
- Dominguez J, Cuevas M, Urena V, Munoz T, Moneo I. Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Ann Allergy* 1990;**64**:352–357.
- Gonzalez De La Pena MA, Monsalve RI, Batanero E, Villalba M, Rodriguez R. Expression in *Escherichia coli* of Sin a 1, the major allergen from mustard. *Eur J Biochem* 1996;**237**:827–832.
- Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Monsalve RI, Rodriguez R. Isolation and characterization of a major allergen from oriental mustard seeds, Bra j I. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;**96**:263–270.
- Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodriguez R. Characterization of a new oriental mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of a fan allergenic epitope. *Biochem J* 1993;**293**:625–632.
- Sanchez-Lopez G, Cizur M, Sanz B, Sanz ML. Prick-prick with fresh foods in patients with latex allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2000;**10**:280–282.
- Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;**82**:986–997.
- Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**964**:47–68.
- Rodriguez J, Crespo JF, Burks W, Rivas-Plata C, Fernandez-Anaya S, Vives R et al. Randomized, double-blind, crossover challenge study in 53 subjects reporting adverse reactions to melon (*Cucumis melo*). *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**:968–972.
- Ballmer-Weber BK, Vieths S, Luttkopf D, Heuschmann P, Wuthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**: 373–378.
- Fritsch R, Ebner C, Kraft D. Allergenic crossreactivities. Pollens and vegetable foods. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997;**15**:397–404.
- Caballero T, Martin-Esteban M. Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: a review. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1998;**8**:6–16.
- Stager J, Wuthrich B, Johansson SG. Spice allergy in celery-sensitive patients. *Allergy* 1991;**46**:475–478.
- Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wuthrich B, Pichler C, Fritsch R et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 1996;**26**:1161–1170.
- Leitner A, Jensen-Jarolim E, Grimm R, Wüthrich B, Ebner C. Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-birch-mugwort-spice syndrome. *Allergy* 1998;**53**:36–41.
- Wüthrich B, Stager J, Johansson SGO. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990;**45**: 568–571.
- Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, Salcedo G, Fernandez-Rivas M. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;**128**:115–122.
- Rance F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy* 2003;**58**:287–288.
- Blaiss MS, McCants ML, Lehrer SB. Anaphylaxis to cabbage: detection of allergens. *Ann Allergy* 1987;**58**:248–250.
- Castells MC, Horan RF, Sheffer AL. Exercise-induced anaphylaxis (EIA). *Clin Rev Allergy Immunol* 1999;**17**: 413–424.

Cabbage lipid transfer protein Bra o 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens

Aránzazu Palacín, PhD,^{a,b} Jose Cumplido, MD,^b Javier Figueroa, MD,^b Oussama Ahrazem, PhD,^a Rosa Sánchez-Monge, PhD,^a Teresa Carrillo, MD, PhD,^b Gabriel Salcedo, PhD,^a and Carlos Blanco, MD, PhD^b Madrid and Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Background: Food IgE-mediated allergy to members of the Brassicaceae family has been increasingly reported.

Objective: To characterize cabbage—*Brassica oleracea* var *capitata*—allergy and its major allergens.

Methods: A prospective study was performed, recruiting 17 patients allergic to cabbage, and control subjects. Skin prick tests and double-blind placebo-controlled food challenges were performed. A major allergen was isolated from cabbage by RP-HPLC and characterized by N-terminal amino acid sequencing and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis. Specific IgE determinations, IgE immunoblots, and CAP-inhibition assays were also performed. **Results:** Skin prick test and specific IgE were positive to cabbage in all patients. Five of them referred anaphylactic reactions when eating cabbage, and in another 5 patients, cabbage allergy was further confirmed by double-blind placebo-controlled food challenge. Most of them showed associated sensitizations to mugwort pollen, mustard, and peach. A 9-kd cabbage IgE-binding protein, Bra o 3, was identified as a lipid transfer protein (LTP) with 50% of identity to peach LTP Pru p 3. Skin prick test with Bra o 3 showed positive results in 12 of 14 cases (86%). On CAP inhibition assays, Bra o 3 managed to inhibit significantly the IgE binding to cabbage, mugwort pollen, and peach. Both Bra o 3 and Pru p 3 were recognized by IgE from the patients' sera.

Conclusion: Bra o 3, a cabbage LTP, is a major allergen in this food, cross-reacting with mugwort pollen and with other plant foods, such as peach.

Clinical implications: Cabbage IgE-mediated allergy is a potentially severe condition that can present with other plant food and pollen allergies. (J Allergy Clin Immunol 2006;117:1423-9.)

Key words: Allergen, anaphylaxis, *Brassica oleracea*, cabbage, cross-reactivity, food allergy, lipid transfer protein, mugwort pollen, mustard, peach

IgE-mediated allergy to foods belonging to the Brassicaceae family has been increasingly reported in recent years, especially to mustard.¹⁻³ Cabbage—*Brassica oleracea* var *capitata*—is another member of the same plant food family that is consumed worldwide both cooked and raw. Despite its wide use, only anecdotal cases of cabbage immediate hypersensitivity have been described so far.^{4,5}

Regarding mustard allergy, possible cross-reactivity with other members of the Brassicaceae family has been suggested, but some authors could not confirm this hypothesis.⁶⁻⁸ However, in a previous study describing 38 patients allergic to mustard, we have found that near 40% of them were also allergic to cabbage.⁹ Moreover, most of these patients showed also associated sensitization to mugwort—*Artemisia vulgaris*—pollen, as well as to other plant foods, such as Rosaceae fruits, nuts, legumes, and corn, suggesting a new mugwort pollen plant food cross-reacting syndrome.⁹ The panallergens responsible for this syndrome remain to be identified.

Major allergens of white and oriental mustard seeds, Sin a 1 and Bra j 1, respectively, have been previously characterized as seed storage proteins, belonging to the 2S albumin family, with an approximate molecular weight of 14 to 16 kd.^{10,11} More recently, an 11S globulin storage protein of 51 kd has been isolated and identified as a novel major allergen of mustard seeds.¹² The low levels, or even absence, of both groups (2S and 11S) of seed storage proteins in pollens and other plant organs, such as leaves and fruits, lead to the suspicion that these allergen families are probably not responsible for the cross-reactivity among cabbage, mustard, and other plant foods and pollens.

We have studied a group of patients allergic to cabbage, and have searched for major allergens that could cross-react among cabbage, mugwort pollen, and other plant foods.

From ^athe Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, and ^bthe Sección de Alergia, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Las Palmas de Gran Canaria.

Supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-RTIC-G03/094 and RedRespira-ISCIII-RTIC-C03/011), and by Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología (project BMC 2002-00196).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared they have no conflict of interest.

Received for publication October 6, 2005; revised December 21, 2005; accepted for publication January 18, 2006.

Available online March 31, 2006.

Reprint requests: Carlos Blanco, MD, PhD, Servicio de Alergia, Hospital de Gran Canaria Dr Negrín, C/Bco de la Ballena s/n, 35012 Las Palmas de GC, Spain. E-mail: cblague@gobiernodecanarias.org.

0091-6749/\$32.00

© 2006 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2006.01.026

Abbreviations used

DBPCFC:	Double-blind, placebo-controlled food challenge
LTP:	Lipid transfer protein
MALDI:	Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
OAS:	Oral allergy syndrome
rPru p 3:	Recombinant Pru p 3
SPT:	Skin prick test

METHODS**Selection of patients and control subjects**

A prospective study was designed in our Allergy Section, composed of a detailed clinical history, *in vivo* tests, and blood drawing for *in vitro* assays. During a 2-year running period, every patient reporting immediate adverse reactions related to cabbage ingestion, suggestive of being IgE-mediated, and showing positive skin prick test (SPT) to fresh cabbage, was included. A control group of 17 subjects allergic to dust mite, nonsensitized to either foods or pollens, matched for age and sex with our patients, was also recruited. The same *in vivo* tests were performed in both patients and controls. An additional group of 8 patients allergic to mugwort pollen with no associated food sensitization was also used as control for SPT. Meanwhile, a pool of sera from those control subjects allergic to dust mites who showed specific IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus* higher than 3.5 kU/L ($n = 5$) was used as control for *in vitro* tests. Written informed consent was obtained from all participants, and the protocol of this study was approved by the Research and Ethics Committees of the Hospital.

Crude food extract preparations

Cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) leaves, mustard (*Sinapis alba*) seeds, and peach (*Prunus persica*) peels were defatted with cold acetone ($2 \times 1:5$ [wt/vol] for 1 hour at 4°C) and ethanol: ether ($1:3$ [vol/vol], $3 \times 1:5$ [wt/vol] for 1 hour at 4°C). After drying, mustard and cabbage were extracted with 0.5 mol/L NaCl ($2 \times 1:10$ [wt/vol] for 1 hour at 4°C). Peach peels were extracted with 0.1 mol/L TRIS-HCl buffer, pH 7.5, 10 mmol/L EDTA ($1:5$ [wt/vol] for 1 hour at 4°C), then washed with H₂O and finally re-extracted with 1.5 mol/L LiCl ($1:5$ [wt/vol] for 1 hour at 4°C). These extracts were dialyzed (cutoff point, 3.5 kd) against H₂O and freeze-dried. Protein concentration was quantified according to the method of Bradford.¹³

Allergen purification and characterization

The cabbage extract was separated by RP-HPLC on a Nucleosil 300 C4 column (8×250 mm; particle size 5 μ m; Scharlau Science, Barcelona, Spain). Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (0% to 10% for 15 minutes and 10% to 100% for 150 minutes, at a flow rate of 1 mL/min). Lipid transfer protein (LTP) containing fractions were immunodetected with both anti-Pru p 3 antibodies¹⁴ and a serum pool from patients allergic to cabbage, and then pooled, freeze-dried, and dissolved in H₂O. The isolated protein was quantified by a commercial bicinchoninic acid test (BCA; Pierce, Cheshire, United Kingdom).

SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli¹⁵ on XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, Calif). N-terminal amino acid sequencing was performed with an Applied Biosystems 477A gas-phase sequencer (Foster City, Calif) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry analysis with a Biflex III Spectrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany), according to standard methods.¹⁶

SPTs

Skin prick tests were performed in all patients and controls according to standard procedure by trained personnel who were unaware of the subjects' clinical histories, with panels of aeroallergen (including dust mites, fungi, pollens, animal epithelia, and natural rubber latex) and food (milk, egg, fish, nuts, fruits, mustard, kiwi, cereals, seafood, and legumes) commercial extracts, as detailed elsewhere.⁹ In the same way, SPTs were also performed with the crude extract from cabbage (2 mg/mL protein in a 1:1 PBS buffer/glycerol solution), with purified LTP from cabbage (named as Bra o 3 by the International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee), as well as with previously described purified LTP from peach (Pru p 3) and mugwort pollen (Art v 3, isolated as previously reported),¹⁷ using these purified allergens at a protein concentration of 20 μ g/mL in a 1:1 PBS buffer/glycerol solution.

Meanwhile, skin tests with fresh cabbage was made by the prick-prick method, which was also applied for testing patients who underwent double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) with the cabbage preparation used for that purpose. Results of SPT are expressed as the mean wheal diameter (in mm) after 15 minutes of puncture. Histamine dihydrochloride (10 mg/mL) and physiologic saline solutions served as positive and negative controls, respectively. A mean wheal diameter greater than 3 mm compared with the saline control was considered a positive response.

Food challenges

Patients were challenged in a double-blind, placebo-controlled fashion, following a standardized protocol.¹⁸ Food challenge was not performed when a patient had a convincing history of cabbage severe anaphylaxis. A fresh cabbage was liquified with an electric mixer and then freeze-dried (7% wt recovery rate). The lyophilized cabbage was masked in a natural-yoghurt based vehicle, containing a mix of vanilla and anisette juices, sugar, and crushed wheat biscuits. This mix was free of sulfites, and all ingredients of the vehicle were known to be tolerated by all patients. Normal intake in a serving of cabbage salad was estimated to be around 10 g for an adult, equivalent to 700 mg of our lyophilized cabbage. A previous study in volunteers without cabbage allergy was performed to demonstrate that such a dose could be masked by this method.

Preparation of challenges was performed in the same morning, and subjects were then randomly assigned to either food or placebo (vehicle), with a 2-hour interval between first and second part of the challenge. Increasing doses (60, 180, 460 mg) were administered with a 30-minute interval until symptoms appeared or a cumulative dose of 700 mg of lyophilized cabbage was reached. Cabbage allergy was accepted if the subject had symptoms after challenge with active substance and not with placebo.

Total and specific IgE determinations

Total IgE was determined by the UniCAP System (CAP; Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden), following the manufacturer's instructions. Specific IgE to cabbage (code f216), to common aeroallergens, and to other foods implicated in adverse reactions for each patient were also determined with the CAP assay, and values greater than 0.35 kU/L were considered positive.

Specific IgE binding to Bra o 3 was performed as previously described for recombinant LTP from peach (rPru p 3)¹⁴ by using 1:9 dilutions in PBS buffer (0.1 mol/L sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 mol/L NaCl) of individual sera from patients allergic to cabbage, or of a pool of sera from control subjects allergic to dust mites. Microtiter plates were coated with 50 μ L purified proteins—Bra o 3 or rPru p 3—at 3 μ g/mL, or cabbage extract at 15 μ g/mL, in PBS buffer for 1 hour at 37°C. PBS buffer with 1% BSA (wt/vol) was used as negative control for solid phase. These tests were performed in triplicate.

TABLE I. Clinical characteristics of 17 patients with cabbage IgE-mediated hypersensitivity

Patient no.	Age (y)/sex	Atopy	Total IgE (kU/L)	Symptoms reported	Cabbage			Other clinically relevant food allergies
					Prick-prick (mm)	Specific IgE (kU/L)	DBPCFC symptoms	
1	31/F	EIA	39	EIA	5	4.7	ND	Mustard, kiwi
2	32/F	R, BA	12	U/AE	14	3.0	OAS/AE	Mustard, peach, nuts, legumes
3	27/F	R	361	OAS	10	10.3	Negative	Mustard, peach, nuts, banana
4	29/F	R	50	A	9	12.1	ND	Mustard, peach
5	28/M	R	49	A	7	5.8	ND	Peach, nuts
6	32/F	R, BA	221	U/AE	4	0.9	OAS/U	Mustard, peach, nuts
7	22/M	R, BA	1516	OAS	10	26.4	OAS	Mustard, tomato
8	39/F	R	322	U/AE	6	3.4	Negative	Peach, avocado, nuts
9	31/M	R	710	OAS	20	5.9	ND	Peach, nuts, corn
10	43/F	R, BA	345	OAS	13	4.9	OAS	Mustard, peach
11	30/F	R, BA	681	OAS	9	17.9	OAS	Mustard, nuts
12	17/M	R, BA	130	OAS	9	1.9	ND	Peach
13	37/F	R, BA	113	OAS	10	4.0	Negative	Mustard, nuts
14	31/F	R	36	A	7	0.9	ND	Mustard, peach, corn
15	30/M	R	294	OAS	6	8.8	ND	Mustard, kiwi
16	31/M	R	314	A	4	15.0	ND	Peach
17	32/F	R	596	OAS	7	11.4	Negative	Mustard, nuts

M, Male; F, female; A, anaphylaxis; AE, angioedema; BA, bronchial asthma; EIA, exercise-induced anaphylaxis; ND, not done; R, rhinitis; U, urticaria.

CAP inhibition assays

A pool of sera from 12 patients allergic to cabbage, each showing specific IgE values to cabbage higher than 3.5 kU/L (CAP class III and up), was used for CAP inhibition assays. Duplicated samples of the undiluted pool of sera were premixed 1:1 (vol/vol) with 5 progressive 1:10 dilutions of the inhibitor solution in PBS buffer, pH 7.4, containing 0.03% (wt/vol) of serum albumin. After 2-hour incubation at room temperature, specific IgE levels to cabbage, mustard, peach, broccoli, Brussels sprouts, and cauliflower, as well as to mugwort pollen, were determined, following the CAP manual. Mustard, peach, and milk (as negative control) commercial extracts (ALK-Abelló, Spain); crude cabbage extract starting at 2 mg/mL protein; and purified proteins Bra o 3, Art v 3, and rPru p 3, starting at 20 µg/mL, were used as inhibitors.

Immunodetection assays

Samples (15 µg of protein of crude extracts from cabbage, mustard, and peach, and 3 µg of purified allergens) were fractionated by SDS-PAGE using Novex tricine gradient 10% to 20% acrylamide gels (Invitrogen), and electrotransferred onto nitrocellulose membranes as described by Towbin et al.¹⁹ After blocking with 5% BSA (wt/vol) in PBS buffer, membranes were incubated overnight with the pool of sera from patients allergic to cabbage (1:5 dilution in 0.5% BSA, 0.05% Tween-20 [vol/vol] in PBS buffer), washed with 0.05% Tween-20 in PBS buffer, and then treated with mouse anti-human IgE mAb HE-2 ascitic fluid (1:3000 dilution for 1 hour).²⁰ After washing, a 1:5000 dilution of rabbit antimouse IgE peroxidase-conjugated antibody (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) was added, and the membranes were incubated for 1 hour. Detection of IgE-binding components was performed by enhanced chemiluminescence, following the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Little Chalfont, United Kingdom). A pool of sera from subjects allergic to dust mite was tested as negative control.

RESULTS

General characteristics

Seventeen cabbage-hypersensitive patients were included in the study, whose general characteristics are summarized in Table I. Mean age (±SD) was 30.7 ± 5.9 years, ranging from 17 to 43, and with a predominance of female subjects (11:6). Sixteen patients (94.1%) were atopic, as defined by a personal history of respiratory allergy, together with positive SPT to several common aeroallergens, including mugwort pollen in all but 1 case. Out of the atopic group, 7 patients (41.2%) had rhinitis and bronchial asthma, and 9 (52.9%) showed only rhinitis.

Clinical manifestations of cabbage allergy reported by patients consisted of oral allergy syndrome (OAS) in 9 cases (52.9%), OAS with urticaria/angioedema in 3 (17.6%), and systemic anaphylaxis in 5 (29.4%), 1 of them with cabbage-dependent exercise-induced anaphylaxis. SPT with fresh cabbage were positive in all of them, with mean wheals (±SD) of 8.8 ± 4.0 mm. Total IgE ranged from 12 to 1516 kU/L, with a geometric mean of 180.4 kU/L. Specific IgE to cabbage showed also a positive result in all patients, with a geometric mean of 12.7 kU/L, ranging from 0.88 to 26.4 kU/L, and negative in control subjects. Most of our patients showed several associated clinically relevant food allergies, including mustard in 12 (70.6%) and peach in 10 cases (58.8%; Table I). Regarding other vegetables belonging to the Brassicaceae family, 10 patients were also allergic to cauliflower, manifested as OAS in 7 and urticaria/angioedema in 3 cases,

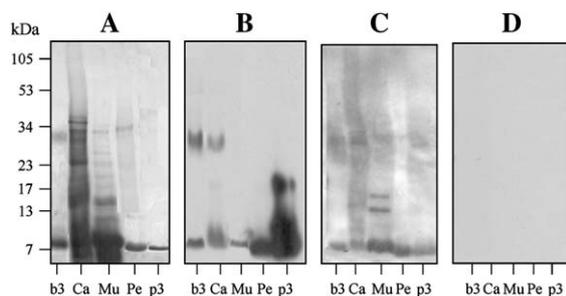


FIG 1. Protein staining with Coomassie blue (**A**) and immunodetection with anti-Pru p 3 rabbit polyclonal antibodies (**B**) or IgE of a pool of sera from patients with cabbage allergy (**C**) or from control subjects with dust mite allergy (**D**) of the following SDS-PAGE separated samples: cabbage leaves (Ca), mustard seeds (Mu), peach peels (Pe), purified nBra o 3 (b3), and rPru p 3 (p3).

with all of them showing positive SPT (9.5 ± 3.0 mm) and specific IgE (mean, 6.6; range, 1.8–34.3 kU/L) to this food.

Double-blind food challenges

Eight patients did not undergo DBPCFC because of severe symptoms ($n = 5$), pregnancy (1), or denial of consent (2). The remaining 9 patients underwent DBPCFC, with all of them showing positive SPT to the cabbage preparation used for oral challenge. In 5 cases (55.5%), cabbage challenge was positive, with isolated OAS the most frequently symptom observed (in 3 patients). Nevertheless, 1 patient showed angioedema and another patient urticaria, in both cases accompanied by OAS. All patients improved after symptomatic treatment in less than 90 minutes. Mean cumulative reactive dose of lyophilized cabbage (\pm SD) was 145 ± 70 mg, ranging from 58 mg to 233 mg, equivalent to 2.1 ± 1.0 g of fresh cabbage.

Immunodetection assays

Extracts from cabbage leaves, mustard seeds, and peach peels were separated by SDS-PAGE, showing components from 5 kd to 40 kd, those corresponding to cabbage and mustard (Fig 1, A). Protein bands of approximately 9 kd were recognized by anti-Pru p 3 rabbit polyclonal antibodies in the 3 protein extracts (Fig 1, B). These 9-kd bands were also among the main IgE-binding proteins in all 3 extracts (Fig 1, C). Interestingly, the serum pool from patients allergic to cabbage clearly reacted also with purified Pru p 3.

Altogether, these results suggested that the 9-kd IgE-binding protein from cabbage could be a LTP.²¹ To support this notion, the protein was purified from the salt extract by RP-HPLC (not shown). The isolated allergen, Bra o 3, behaved as a single band of the expected molecular size in SDS-PAGE, which was recognized by anti-Pru p 3 antibodies and IgE of sera from patients allergic to cabbage (Fig 1).

Allergen characterization

Purity of Bra o 3 was confirmed by the single N-terminal amino acid sequence obtained that did not present

TABLE II. Results of SPT in a group of 17 patients with cabbage immediate hypersensitivity expressed in millimeters of mean wheal diameter 15 minutes after puncture

Patient no.	Cabbage		Mustard commercial extract	Peach		Mugwort pollen	
	Crude extract	Bra o 3		Commercial extract	Pru p 3	Commercial extract	Art v 3
1	6	–	–	5	3	–	–
2	11	5	8	13	7	8	5
3	7	6	5	7	7	8	7
4	9	6	6	6	7	8	5
5	9	7	5	6	3	6	5
6	ND	ND	6	4	ND	4	ND
7	11	10	15	6	5	4	3
8	8	6	5	14	8	5	5
9	ND	ND	10	–	ND	8	ND
10	12	7	9	8	7	5	11
11	11	5	8	10	8	8	5
12	ND	ND	12	10	ND	5	ND
13	7	6	4	7	4	7	5
14	7	5	6	11	9	7	6
15	11	3	7	6	5	4	3
16	10	6	9	7	6	7	15
17	5	–	6	–	5	5	–

–, Negative response; ND, not done.

heterogeneity at any determined residue, as well as by the single and sharp peak at 9026 d detected in MALDI analysis (not shown). The 20 N-terminal amino acids determined for Bra o 3 (AISCGTVTSNLAPCAVYLMK) displayed 50% identity with the corresponding region of Pru p 3 (identical residues are shown in *bold letters*), and were identical to those deduced from a cDNA clone encoding a putative rape—*Brassica napus*—LTP (accession no. Q9ZSL7), included in the European Molecular Biology Laboratory database.

Skin tests with food extracts and purified proteins

Skin prick tests with the crude cabbage extract were positive in all patients, with mean wheals (\pm SD) of 8.8 ± 2.2 mm (Table II). Most patients also showed positive SPT to mustard (16/17), peach (15/17), and mugwort pollen (16/17) commercial extracts. Fourteen patients were also skin tested with natural purified LTPs from cabbage, peach, and mugwort, showing positive results in 12 of 14 to Bra o 3 (85.7%), 14 of 14 to Pru p 3, and 12 of 14 to Art v 3, with mean wheals of 5.2 ± 2.5 , 5.4 ± 3.9 , and 6.0 ± 1.9 mm, respectively. Results of SPT were all negative in control subjects allergic to dust mite; meanwhile, 8 controls allergic to mugwort pollen showed positive SPT only to the mugwort pollen commercial extract (wheal, 7.5 ± 3.8 mm), whereas their SPT responses were negative to both plant food extracts and to the purified LTPs, including Art v 3.

ELISA and CAP assays

Specific IgE to Bra o 3 was found in 16 of 17 (94%) individual sera from patients allergic to cabbage, as

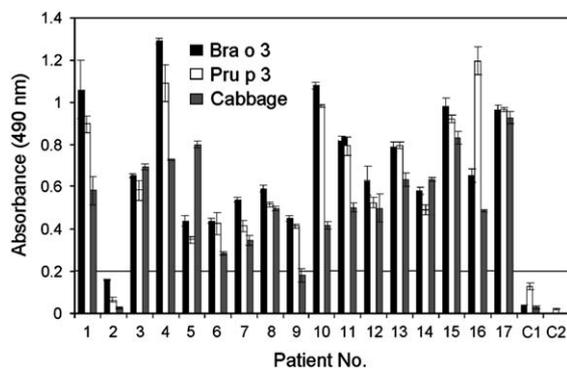


FIG 2. Specific IgE to nBra o 3, rPru p 3, and crude cabbage extract of 17 individual sera from patients with cabbage allergy. A serum pool of subjects with allergy to mites (C1) and BSA in solid phase (C2) were tested as negative controls. Means ($n = 3$) and SDs (bars) are represented. Specific IgE levels were considered positive when greater than 0.2 optical density units.

determined by ELISA (Fig 2). All positive sera showed also specific IgE to Pru p 3, and 15 of them to the crude cabbage extract in the same ELISA tests; meanwhile, specific IgE neither to cabbage nor to these purified allergens were detected in the pool of sera from control subjects allergic to dust mite.

CAP-inhibition assays with the pool of sera from patients allergic to cabbage and cabbage as solid phase (Fig 3) indicated that a high proportion of the IgE was directed toward LTP allergens. Thus, when used as inhibitor, Bra o 3 manages to inhibit as much as 70% of the total IgE binding, Pru p 3 maximum inhibition was in the same range (73%), Art v 3 reached 48%, and mustard and peach commercial extracts reached 82% and 84%, respectively. Estimated concentrations of the purified allergens necessary to inhibit 50% of the total IgE binding to cabbage were 1.8 $\mu\text{g/mL}$, 0.8 $\mu\text{g/mL}$, and 36 $\mu\text{g/mL}$ for Bra o 3, Pru p 3, and Art v 3, respectively. A milk extract was used as negative control for this assay, showing inhibitions lower than 15% at the maximum concentration. In addition, preincubation of the sera with Bra o 3 also significantly inhibits the IgE binding to other extracts used in solid phase, such as broccoli (73%), cauliflower (57%), mugwort pollen (61%), and peach (32%; not shown).

DISCUSSION

Regarding food IgE-mediated allergy, it is now well known that cross-reactions among allergens from different sources, as a result of similarities among their IgE epitopes, are responsible for very significant clinical disorders. A clear example is the pollen-food allergy syndrome, which is the most common food hypersensitivity in the adult population, and includes several distinct clinical associations, such as birch pollen with Rosaceae fruit, ragweed pollen with melon, and mugwort pollen with celery allergies.²²

These pollen-food cross-reactions seem to be the consequence of the structural homology among allergens

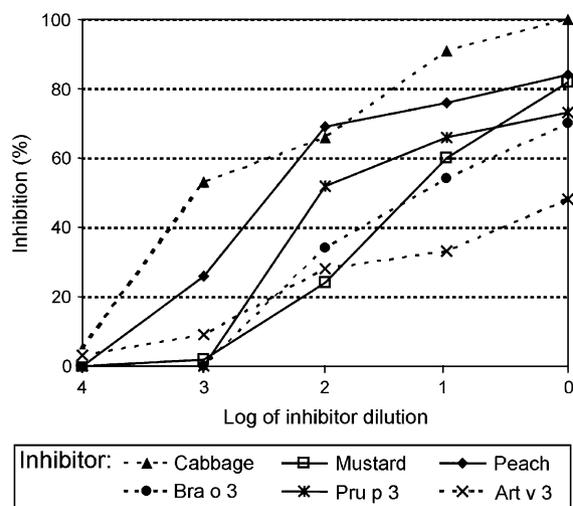


FIG 3. CAP-inhibition assay using cabbage in solid phase. Inhibitors included the crude cabbage extract, commercial mustard and peach extracts, and purified LTPs Bra o 3, Art v 3, and Pru p 3. Maximum inhibitor concentrations used were 2 mg/mL for the crude extract and 20 $\mu\text{g/mL}$ for the purified proteins.

belonging to a very limited number of protein families. Among them, both Bet v 1 homologous, a group of plant-defence or pathogenesis related proteins, and profilins, which are cytoskeletal proteins in the eukaryotics, seem to play a critical role.²³ More recently, another group of pathogenesis related proteins known as LTP has been identified as food-pollen cross-reacting allergens, especially in the Mediterranean area.²¹

Food allergy to members of the Brassicaceae family, especially to mustard, has been recently identified as a relatively common—at least in certain areas—and potentially severe condition. As a consequence, mustard has been included in the list of 12 potential allergenic ingredients to be labeled in the new European Union directive on food labeling.²⁴ Curiously, allergy to other members or this family, such as cabbage, had been rarely reported.^{4,5} However, we have recently studied a group of patients with mustard allergy, all of them showing sensitization to other members of the same family, and most of them with clinical allergy to cabbage leaves, peach fruit, and mugwort pollen.⁹ This cross-reactivity profile cannot be explained adequately by the previously identified 2S and 11S mustard allergens,¹⁰⁻¹² which accumulate specifically in seeds. Therefore, we decided to search for potential cross-reacting allergens widely distributed throughout the plant, and to select cabbage leaves as the target food. This approach has allowed us to detect a protein of around 9 kd as a putative candidate by preliminary IgE immunodetection assays, and to identify it as a LTP, named Bra o 3, the cabbage homologous with the major allergens from peach fruit (Pru p 3) and *Artemisia* pollen (Art v 3).

Furthermore, in the current study, we have managed to demonstrate fully the relevance of Bra o 3 in cabbage allergy, both *in vivo* and *in vitro*. More specifically, 94% of our patients showed specific IgE to Bra o 3, as detected by

ELISA, and in 86% of them, a positive SPT to Bra o 3 was found. In CAP-inhibition assays, although performed with pooled serum, which could lead to overestimation of the immunologic properties of those sera with higher specific IgE, as much as a 70% inhibition of the total IgE binding to cabbage, used in solid phase, was reached when the pool of our patients' sera was preincubated with Bra o 3. Therefore, Bra o 3 is clearly a major cabbage allergen, and this food is to be added to the growing list of plant foods and pollens in which LTPs have been identified as relevant allergens.²¹

Moreover, the very close botanical relationship among cabbage, cauliflower, broccoli, and Brussels sprouts (all of them classified as varieties of *Brassica oleracea*), together with the significant inhibition of the IgE-binding to broccoli and cauliflower extract (>50%) by Bra o 3, suggests that all of these plant foods could share similar allergens. The same seems to be true for mustard, which showed a reactive band of around 9 kd. Thus, our data point to LTPs—and not to storage proteins—as the major allergens responsible for cross-reactions among Brassicaceae foods, at least in our population.

It is noteworthy that in our series of patients with mustard allergy previously described, we had found very significant associations with mugwort pollen allergy, as well as with several plant food allergies, such as other Brassicaceae, Rosaceae fruit, nut, legumes, and corn.⁹ Consequently, we have proposed a new mugwort pollen–mustard allergy syndrome, completely different from the mugwort-celery-spice allergy syndrome formerly reported in Central Europe.²⁵ Interestingly, the pattern of plant food sensitizations that we have observed resembles those described for LTP-hypersensitive patients,^{26,27} thus suggesting that LTPs may be responsible for this new clinical syndrome.

In this line, LTPs have been reported as relevant allergens not only in mugwort pollen but also in most plant foods implicated in the syndrome, namely Rosaceae fruit, nuts, and corn,²¹ and now also in Brassicaceae foods. Moreover, the majority of our patients with cabbage allergy showed not only associated allergies to mugwort pollen and peach but also positive SPT to Pru p 3 in 100% and to Art v 3 in 86% of patients tested. Finally, Pru p 3 was able to inhibit more than 70% of the total IgE binding to cabbage in CAP-inhibition assays, demonstrating cross-reactivity among LTPs from Brassicaceae foods and Rosaceae fruits. In the same way, Bra o 3 managed to inhibit significantly the IgE binding to mugwort pollen and several plant foods used in solid phase.

Another finding also deserves consideration. It is known that Art v 3 is a major mugwort allergen, and in some patients with IgE to both Art v 3 and Pru p 3, the former behaves as the primary sensitizing agent.²⁸ The fact is that, although most of our patients with mugwort pollen–food allergy showed positive SPT to Art v 3, all 8 mugwort pollen–sensitized but not food-sensitized controls showed negative SPT to this purified protein. On the basis of these preliminary data, we can suggest that a simple SPT with the mugwort pollen LTP, Art v 3, could be enough to

distinguish between mugwort pollen–sensitized patients who are not at risk of having food allergy from patients who can develop severe food IgE-mediated allergic reactions to certain plant foods. This is a clear example of a possible application of component-resolved diagnosis to food allergy. However, more experimental data on the possible role of pollen LTP in pollen–food cross-reactivity would be expected.

In conclusion, we describe a group of patients with cabbage allergy and characterize Bra o 3, a LTP, as a major cabbage allergen that cross-reacts with mugwort pollen and some plant foods.

We thank Javier Varela and Alicia Prieto (Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) for protein sequencing and MALDI analysis, respectively; Rosabel Afonso and Juan Blanco for technical assistance; and all of the personnel from Allergy Section of Hospital Dr Negrín for their invaluable collaboration.

REFERENCES

- Rance F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy* 2000; 55:496-500.
- Caballero T, San-Martin MS, Padial MA, Contreras J, Cabanas R, Barranco P, et al. Clinical characteristics of patients with mustard hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:166-71.
- Rance F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:33-8.
- Calnan CD. Contact urticaria from cabbage (*Brassica*). *Contact Dermatitis* 1981;7:279.
- Blaiss MS, McCants ML, Lehrer SB. Anaphylaxis to cabbage: detection of allergens. *Ann Allergy* 1987;58:248-50.
- Jorro G, Morales C, Braso JV, Pelaez A. Mustard allergy: three cases of systemic reaction to ingestion of mustard sauce. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5:54-6.
- Kanny G, Fremont S, Talhouarne G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in "chicken dips." *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75:340-2.
- Rance F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy* 2003;58:287-8.
- Figuerola J, Blanco C, Dumpierrez AG, Almeida L, Ortega N, Castillo R, et al. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. *Allergy* 2005;60:48-55.
- Menendez-Arias L, Moneo I, Dominguez J, Rodriguez R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a 1. *Eur J Biochem* 1988;177:159-66.
- Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Monsalve RI, Rodriguez R. Isolation and characterization of a major allergen from oriental mustard seeds, Bra j 1. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;96: 263-70.
- Palomares O, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodriguez R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:586-92.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Diaz-Perales A, Sanz ML, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Lombardero M, et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:628-33.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003;337:11-21.

17. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pemas M, Fernandez-Rivas M, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1403-10.
18. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods-position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004;59:690-7.
19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
20. Sanchez-Madrid F, Morago G, Corbi AL, Carreira J. Monoclonal antibodies to three distinct epitopes on human IgE: their use for determination of allergen-specific IgE. *J Immunol Methods* 1984;73:367-78.
21. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Carcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1336-41.
22. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002;964:47-68.
23. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:962-9.
24. Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003, amending directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs. Brussels: European Parliament. Available at: http://europa.eu.int/comm/food/food/labelling-nutrition/foodlabelling/comm_legisl_en.htm. Accessed October 7, 2005.
25. Stager J, Wuthrich B, Johansson SG. Spice allergy in celery-sensitive patients. *Allergy* 1991;46:475-8.
26. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002;57:900-6.
27. Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, et al. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins on plant foods and *Artemisia* pollen: an *in vivo* study. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:115-22.
28. Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, Garcia-Casado G, et al. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kd: cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1415-21.

Availability of Journal back issues

As a service to our subscribers, copies of back issues of *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* for the preceding 5 years are maintained and are available for purchase until inventory is depleted. Please write to Elsevier Inc, Subscription Customer Service, 6277 Sea Harbor Dr, Orlando, FL 32887, or call (800) 654-2452 or (407) 345-4000 for information on availability of particular issues and prices.