

Caracterización de los alérgenos de quenopodiáceas

Mayte Villalba Díaz.

Universidad Complutense de Madrid.

Las malezas también consideradas a veces malas hierbas, son especies difíciles de clasificar dentro de un grupo o familia botánica específica. Se trata generalmente de especies de bajo valor comercial, alimenticio o decorativo, y son conocidas por su capacidad invasora en entornos cultivados, interfiriendo así en el crecimiento de otras especies [1]. Las malezas son plantas con gran capacidad de adaptarse al medio, especialmente en regiones donde la vegetación autóctona ha sido dañada por la sequía, y son muy resistentes ante esta y otras condiciones climáticas adversas. Su alta estabilidad en situaciones desfavorables, las convierte en principales fuentes de pólenes que causan manifestaciones alérgicas en un número cada vez mayor de personas [2, 3].

Las clasificaciones modernas sobre la base de análisis morfológicos y filogenéticos, tales como la Clasificación Filogenética APG, incluyen dentro de la familia *Amaranthaceae*, como subfamilia, a la *Chenopodioideae*, a las antiguas quenopodiáceas (*Chenopodiaceae*) [4]. Pero realmente, son dos familias botánicas emparentadas que desde el punto de vista Aerobiológico comparten el mismo tipo polínico. La mayoría de los miembros son plantas herbáceas y arbustivas anuales y perennes cuyo crecimiento se adapta perfectamente a los suelos salados y a los ambientes áridos (plantas xerofitas), de los cuales extraen altas concentraciones de nitrógeno.

En sus orígenes y debido a su alto contenido en sodio, las cenizas de estas plantas se han utilizado para obtener sosa y vidrios sódicos. La familia *Amaranthaceae* incluye 2500 especies, 85 de las cuales se encuentran en la Península Ibérica. Aunque incluye especies de interés agrícola, como la *Spinacia oleracea* y la popular *Chenopodium quinoa*, y ornamentales como *Amaranthus caudatus*, un número muy elevado de especies, como la *Salsola*, se consideran invasivas [5]. La capacidad de estas especies para sobrevivir en hábitats hostiles se basa en su abundante producción de semillas (que a menudo alcanza 50 000 semillas por planta) y en un mecanismo de dispersión del fruto que involucra a la planta entera. Además, la tolerancia de algunas especies a las toxinas del suelo, como el arsénico, sin que se afecte su crecimiento, contribuye a su uso como fijadores en suelos altamente contaminados [6].

Los miembros de la familia *Amaranthaceae* comparten una serie de características morfológicas en sus granos de polen que los hacen casi indistinguibles mediante

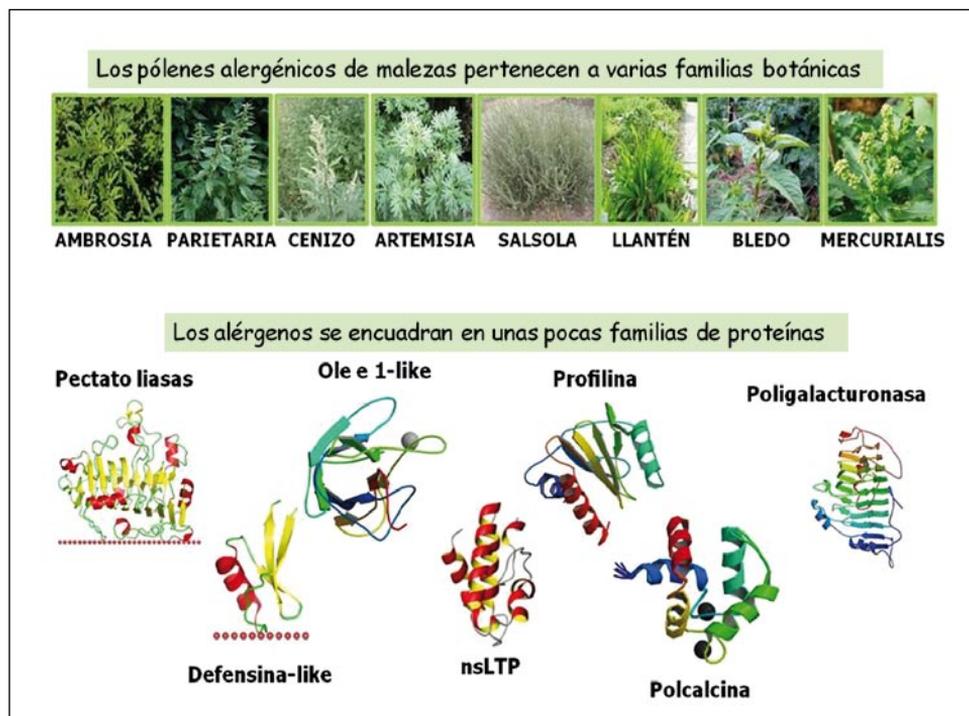
la microscopía estándar: los granos son esféricos con una disposición de abertura pantoporada que es similar a la superficie de una “pelota de golf” [7]. Es un polen anemófilo y la producción y liberación de polen tiende a ser aún menor que en otras especies anemófilas [8], lo que refleja la optimización de los recursos por las plantas xerófitas en entornos adversos. Tal vez en un intento de contrarrestar esta baja producción de polen, las especies *Amaranthaceae* florecen de junio a octubre [9], una vez que el principal período de polinización de la mayoría de las especies de latitudes templadas ha terminado.

De todas las especies de la familia *Amaranthaceae*, los pólenes de los géneros *Chenopodium*, *Salsola* y *Amaranthus* son los principales causantes de las polinosis durante el verano de los países con clima templado y seco, como en el oeste de Estados Unidos y Australia y las áreas semidesérticas de Arabia Saudita, Kuwait, India e Irán [10, 11]. La desertificación del suelo en extensas zonas de la cuenca mediterránea ha aumentado la incidencia de estas malas hierbas en los países vecinos, causando síntomas en personas sensibilizadas, incluso a bajas concentraciones [12-14]. La capacidad de las malezas de la familia *Amaranthaceae* para resistir la sequía, el uso ornamental de varias especies en setos y en cultivos de regadío, así como su presencia como malezas contaminantes en cultivos a expensas de especies productivas como el olivo, han incrementado su relevancia clínica. Dado que los países mediterráneos constituyen una de las mayores superficies del mundo de olivares y su polen es una de las principales causas de alergia [15], se está produciendo un aumento del número de pacientes polisensibilizados a ambos tipos de polen.

Diferentes especies taxonómicamente relacionadas de *Amaranthaceae* pueden ser responsables de la sensibilización alérgica y podrían utilizarse en el diagnóstico y tratamiento. Desde el punto de vista alergológico, el polen de *Salsola kali* (también conocido como cardo ruso) y el de *Chenopodium album* (conocido como cenizo) se consideran los pólenes más representativos de la familia en términos de incidencia alérgica en España [16]. Sin embargo, otras especies de la familia *Amaranthaceae*, como *Salsola pestifer*, *Amaranthus retroflexus*, *Salsola oppositifolia*, *salsola vermiculata* o *Atriplex canescens* o *A. halimus* también han sido identificados como especies alérgicas [17]. *S. kali* es muy abundante en el sureste de España, *S. vermiculata* crece en pantanos y *Salsola oppositifolia* se puede encontrar en los bordes de las carreteras cerca del mar en áreas secas y calientes. Hasta la fecha, se han descritos y analizado los principales alérgenos de *S. kali*, *C. album* y *A. retroflexus*, existiendo entre ellos, en general, un alto grado de reactividad cruzada [18].

El número de moléculas alérgicas identificadas en estos y otros pólenes de malezas (por ejemplo, ambrosía, artemisa, parietaria, llantén y mercuriales) está limitado a unas pocas familias de proteínas presentes en vegetales (Figura 1): enzimas, especialmente aquellas involucradas en el metabolismo de pectina y por tanto en el remodelado de la pared vegetal y en el crecimiento del tubo polínico (pectato liasas, pectín

Figura 1.



metilesterasas y poligalacturonasas), péptidos antimicrobianos como las defensinas, proteínas implicadas en la activación de los procesos germinativos como las de la familia de homólogos a Ole e 1, proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP) y los panalérgenos, profilina (proteínas unión a actina) y polcalcina (proteína de unión de calcio) [2]. Estas familias incluyen los alérgenos identificados en *C. album* (Che a 1, Che a 2 y Che a 3), *S. kali* (Sal k 1, Sal k 2, Sal k 3, Sal k 4, Sal k 5 y Sal k 6), y *A. retroflexus* (Ama r 2) [11, 19, 20].

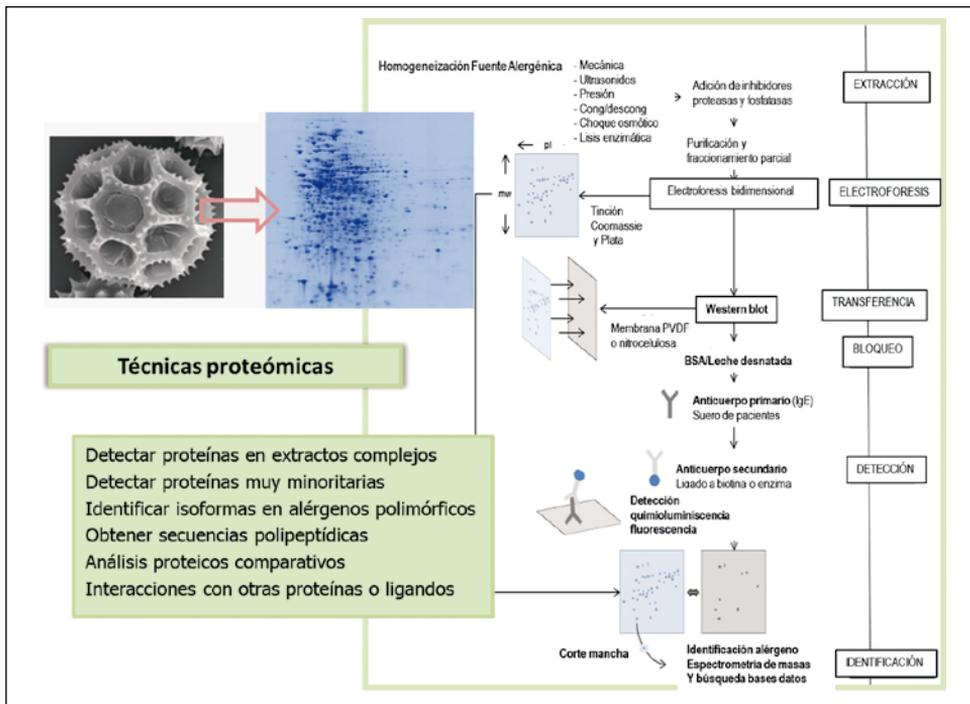
Desde el punto de vista clínico, resulta cada vez más importante ahondar en el conocimiento de las características alergénicas de estas especies vegetales debido a que se ha producido un drástico aumento de la polinosis provocada por especies de Amaranthaceae en los países templados, porque cada vez son más visibles las diferencias intra-especie detectadas, tanto cualitativas como cuantitativas, en el contenido alergénico de los extractos y porque el diagnóstico de los pacientes es todavía impreciso debido a la superposición de la polinización de estas malezas [17]. Lo que es evidente es que las especies de Amaranthaceae se están convirtiendo en una de las principales causas de la sensibilización al polen en el área mediterránea, como ha ocurrido en algunas zonas de la Península Ibérica [21].

En España, estas malezas son especialmente abundantes en varias regiones del sureste y el Valle del Ebro. En las zonas secas del sureste (provincias de Alicante y Murcia), los niveles de polen oscilan entre 100 y 250 granos/m³ de abril a octubre, con un pico en agosto (www.polenes.com). Aunque estas especies vegetales liberan un número reducido de granos de polen durante la temporada de polinización, alrededor del 40% de los individuos alérgicos, con síntomas al final del verano, en estas regiones de España son alérgicos a estos pólenes agresivos. En España, el polen de Salsola, junto con el olivo y las gramíneas, es una de las principales causas de polinosis [16], tanto en regiones donde es una de las principales especies presentes en sus campos (por ejemplo, Zaragoza y Murcia) como en aquellas donde crece como especie contaminante de los campos de olivo [22].

Alérgenos de la familia *Amaranthaceae*

El conocimiento de los perfiles alergénicos de una fuente biológica es un requisito previo para mejorar los protocolos de diagnóstico y la inmunoterapia precisa que hay que aplicar. Este conocimiento es particularmente importante en el caso de los pólenes, ya que la distribución geográfica de las especies vegetales está fuertemente influida por las condiciones geofísicas y climáticas. Así las polinosis de los pacientes difieren

Figura 2.



dependiendo de la zona en la que habitan o de sus desplazamientos geográficos. El uso de alérgenos purificados en lugar de los extractos proteicos ha facilitado la identificación del alérgeno sensibilizante. Los enormes esfuerzos realizados en las últimas décadas para obtener los alérgenos más significativos de las diferentes especies de polen han sido esenciales para nuestra comprensión del historial alérgico de un paciente dado. El número de alérgenos identificados ha aumentado de forma notable en los últimos años gracias a la aplicación de las técnicas proteómicas, electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (Figura 2). Con ellas se ha podido solventar las bajas concentraciones en la fuente biológica, las propiedades moleculares (masa y carga) solapantes y la inestabilidad de los alérgenos. Hasta la fecha se han descrito diez alérgenos de polen de *Amaranthaceae* cuyas propiedades moleculares se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Alérgenos de *Chenopodiaceae* y *Amaranthaceae* caracterizados hasta la fecha

Alérgeno	Nº acceso UniProt	Familia	pI	Masa Molecular (kDa)	Polimorfismo	Glicosilación	Aislada del polen	Sistema de expresión
Sal k 1	Q17ST4, P83181	Ole e 1-like	4-9.5	37	Si	Si	Si	<i>E. coli</i>
Sal k 2	Q8L5K9	Proteína quinasa	ND	36	ND	No	No	<i>E. coli</i>
Sal k 3	C1KEU0	Metionina sintasa	ND	45	ND	No	No	<i>E. coli</i>
Sal k 4	C6JWH0	Profilina	4.6	14.3	Moderado	No	Si	<i>E. coli</i>
Sal k 5	E2D0Z0	Ole e 1-like	4-4.5	16.3/18.5	Si	Si	Si	<i>P. pastoris</i>
Sal k 6	W8P8Q3	Poligalacturonasa	5.8-6.7	45/28	Si	Si	No	<i>E. coli</i>
Che a 1	Q8LGR0	Ole e 1-like	4.98	16.3/18.5	Moderado	Si	Si	<i>P. pastoris</i>
Che a 2	Q84V37	Profilina	4.8-5.4	15	Moderado	No	Si	<i>E. coli</i>
Che a 3	Q84V36	Polcalcina	4.4	9.5	No	No	Si	<i>E. coli</i>
Ama r 2	C3W2Q7	Profilina	5	15	Moderado	No	No	<i>E. coli</i>

Chenopodium Album

El polen de cenizo, –así es como se llama en España a esta especie–, es uno de los pólenes alérgicos mejor caracterizados de la familia *Amaranthaceae*. Es una planta perenne que, aunque se puede encontrar en todo tipo de suelos, se produce principalmente en los áridos y ricos en sal [17, 23]. La polinización de *C. album* ocurre de junio a octubre.

Se han descrito como áreas de alta incidencia clínica, el sur de España, los Estados Unidos de América, Irán, Kuwait y Arabia Saudita [16, 17, 23-25]. En países con grandes áreas desérticas, como Kuwait o Irán, este polen es el principal agente sensibilizante en pacientes con rinitis alérgica o asma, y sus índices de prevalencia son mayores que los de ácaros o mohos debido al uso de esta planta en programas basados sobre principios ecológicos y/o etnoagrícolas [26].

Los pacientes afectados por polinosis a *C. album* son frecuentemente polisensibilizados y varios trabajos han demostrado la existencia de una alto grado de reactividad cruzada con otros pólenes relacionados o no relacionados filogenéticamente [18, 27]. Los 3 principales alérgenos que se han descrito hasta la fecha en el polen de *C. album* son Che a 1 (Ole e 1-like), Che a 2 (profilina) y Che a 3 (polcalcina) [24, 28-30]. Los tres se han expresado en forma recombinante en la levadura *Pichia pastoris* o en la bacteria *Escherichia coli* [31-34] y se han utilizaron como herramientas diagnósticas en CRD ("Component-resolved diagnosis") [24].

Che a 1

Che a 1 fue el primer alérgeno descrito de este polen y es un alérgeno principal atendiendo al criterio de que más del 50% de los pacientes sensibles a *C. album* poseen IgE en sus sueros que unen esta proteína. Fue identificado, caracterizado, y clonado en 2002 por Barderas y col. [29]. Fue detectado como una banda de aproximadamente 20 kDa mediante inmunodetección tras el PAGE-SDS de las proteínas del utilizando sueros de pacientes alérgicos a este polen y con anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de Ole e 1. Che a 1 se aisló del polen y tras su purificación a homogeneidad, se comprobó que era una glicoproteína de 17.088 Da y 143 aminoácidos de longitud, dos menos que Ole e 1. Se trataba de una proteína de carácter ácido con un pI de 4,98. Tras el proceso de clonación por PCR ("Polymerase Chain Reaction"), su secuencia de aminoácidos alineada con la de los otros miembros de la misma familia proteica ya descritos, presentaba una identidad del 27 al 45% con las secuencias de estas proteínas y sólo un 30% de identidad con la de Ole e 1, explicando así la limitada reactividad cruzada entre ambas moléculas [30]. Sorprendentemente, aunque cuantitativamente no se trataba de un alérgeno relevante puesto que el número de IgE dirigidas en los pacientes alérgicos a Che a 1 no era muy alto, sin embargo más del 70% de ellos tenían IgEs contra esta molécula.

Los mismos autores llevaron a cabo la producción de la forma recombinante de Che a 1 en la levadura *P. pastoris* [30]. Aunque el patrón de glicosilación de la forma recombinante difiere del de la proteína natural, ambas formas del alérgeno presentan un comportamiento alergénico equivalente lo que parece indicar que, a diferencia de lo que sucede con Ole e 1, el componente glicosídico de Che a 1 no tiene una gran relevancia en su actividad alergénica y por tanto ambas se pueden usar indistintamente con fines diagnósticos. Recientemente, un grupo iraní ha publicado la expresión de Che a 1 fusionado a una secuencia de histidinas en *E. coli* [31]. Aunque la proteína se aisló en forma insoluble a partir de agregados en forma de cuerpos de inclusión, su replegado en la propia columna cromatográfica permitió obtener una proteína soluble capaz de unir las IgE de pacientes sensibilizados.

Che a 2

En 2003 fueron identificados y posteriormente caracterizados los panalérgenos Che a 2 (profilina) y Che a 3 (polcalcina) del polen de *C. album* [28]. Estos dos alérgenos son minoritarios desde el punto de vista clínico en la mayoría de pólenes, especialmente en aquellos en los que existen alérgenos principales con una alta prevalencia y que retienen la mayor parte de las IgE de los sueros de los pacientes. Sin embargo, los alérgenos tienen una especial relevancia en este polen, en el que no existe ningún marcador primario específico de sensibilización ni ningún alérgeno frente al que se dirijan la mayor parte de las IgE de los pacientes. La relevancia de la profilina y la polcalcina estaba asociada con la polisensibilización en los pacientes sensibilizados a este polen [28, 32] y fue estudiada en 2004, con 104 sueros de individuos alérgicos a *C. album*. Che a 2, purificada a homogeneidad a partir del extracto de polen, era reconocida por el 55% de los sueros en ELISA [33] mientras que en otras poblaciones alérgicas a otros pólenes, la frecuencia de reconocimiento de este alérgeno es de apenas un 20%. Un hallazgo similar fue observado en 2011 por Nouri y col [24], quienes identificaron a Che a 2 como un alérgeno principal en poblaciones de Irán.

La comparación de la similitud de la secuencia de aminoácidos de esta proteína con las de otros miembros de la familia de profilinas vegetales depositadas en bases de datos fue estudiada por Barderas y col [30]. La secuenciación de 3 clones de cDNA que codificaban para Che a 2 dio lugar a cadenas polipeptídicas con longitudes entre 131 a 133 aminoácidos de longitud con una masa molecular de aproximadamente 14 kDa y un pI ácido de aproximadamente 5 [33]. Cabe destacar que Che a 2 mostró mayor identidad de secuencia con Hev b 8 (la profilina del látex) y con las profilinas alimentarias derivadas de plantas (Mal d 4 de manzana o Ara h 5 de cacahuete) que con profilinas de polen (Ole e 2 de olivo, Bet v 2 de abedul y Phi p 12 de gramíneas). La expresión heteróloga de Che a 2 se llevó a cabo en *E. coli* [33]. Che a 2 recombinante es una proteína soluble, homogénea y se caracterizó en detalle usando un antisuero policlonal obtenido frente a la profilina natural y sueros de pacientes alérgicos a este polen. Tanto mediante inmunodetección por *Western blot* como por ELISA inhibición, la forma recombinante y la natural mostraron propiedades inmunológicas similares.

Che a 2 presentó reactividad cruzada con un gran número de pólenes, alimentos derivados de plantas y látex [33]. Los niveles de inhibición fueron superiores al 80% con alérgenos de polen y látex y se obtuvieron valores entre el 10 y el 95% con extractos de alimentos vegetales [28, 30, 33].

Che a 3

El otro panalérgeno del polen de cenizo es la polcalcina Che a 3 [28, 32]. Este alérgeno, específico de polen y que une calcio en dos sitios *EF-hand*, fue purificado y exhibe mediante ensayos de ELISA una reactividad positiva con el 46% de los 104

pacientes sensibilizados a *C. album* [28]. Este reconocimiento es de una magnitud similar al obtenido por Nouri y col (41%) para una población iraní de 32 pacientes [24].

Tras su clonaje, la secuencia de Che a 3 posee una longitud de 86 aminoácidos con una masa molecular de 9,5 kDa y un pI de 4,43 [28]. Cabe destacar que Che a 3 tiene una identidad de secuencia del 90% con Bet v 4 (polcalcina de abedul) y 89% con Ole e 3 y Aln g 4, polcalcinas de olivo y polen de aliso, respectivamente [28,32].

La reactividad cruzada asociada a Che a 3 se estudió utilizando su forma recombinante producida en *E. coli* [32,34]. Che a 3 fue capaz de inhibir hasta el 50% la unión de IgE a la polcalcina de polen de gramíneas, Phl p 7, mientras que este alérgeno inhibía el 76% de la unión de IgE a Che a 3 inmovilizado [34]. La estructura tridimensional de Che a 3 se resolvió mediante cristalografía y difracción de rayos X [35]. La comparación de la estructura de Che a 3 con la de Phl p 7 y Bet v 4 demostró que los 3 alérgenos poseían la misma estructura terciaria pero distinto comportamiento oligomérico, ya que mientras que Che a 3 y Phl p 7 se expresan como dímeros, Bet v 4 se encuentra como un monómero [35].

Salsola Kali

Salsola es el género de la familia Amaranthaceae, cuyas propiedades alergénicas han sido mejor caracterizadas. Salsola reúne varias especies alergénicas, incluyendo *S. kali*, *S. pestifer*, *S. vermiculata* y *S. oppositifolia* [10, 36-39].

La especie de Salsola cuyos alérgenos han sido mejor identificados es *S. kali* [20, 36, 40-44]. El resto de los alérgenos de otras especies se han caracterizado apenas por medio de ensayos inmunoquímicos, y su reactividad a las IgE de los pacientes se ha determinado de acuerdo con la masa molecular de las bandas proteicas que se habían separado por electroforesis. Al igual que con la mayoría de las malezas de Amaranthaceae, *S. kali* es una planta típica de suelos salados y se encuentra principalmente en hábitats donde la lluvia es escasa. De hecho cuando madura en verano forma unos típicos arbustos esféricos que no están fijos al suelo ("tumbleweeds").

Los primeros casos de sensibilización al polen de *S. kali* fueron detectados en Arizona, EE.UU en 1933 [45]. Desde entonces, se han descrito múltiples sensibilizaciones a nivel mundial, ya que la planta es muy abundante en suelos secos. En los Estados Unidos, se puede encontrar en una franja muy amplia desde el noreste al oeste, y en Europa, desde el mar Báltico hasta la costa mediterránea. También se produce en el norte de África y en algunos países árabes constituyendo la principal causa de polinosis en Irán [10, 26, 37]. En España, *S. kali* es muy común en Andalucía, Murcia, Levante y Aragón, siendo Zaragoza el área con la segunda tasa de sensibilización más alta [46]. De hecho, en algunas zonas del sureste y centro de España, la sensibilización a *S. kali* es casi tan frecuente como la sensibilización al olivo y a gramíneas [16, 22].

Se ha detectado un alto grado de reactividad cruzada entre el polen de *S. kali* y los de otras especies de *Amaranthaceae* e incluso de familias no relacionadas [18, 27]. Curiosamente, en contraste con los pacientes alérgicos a *C. album*, los cuales son en su mayoría polisensibilizados, la monosensibilización a *S. kali* es bastante común [46].

Los alérgenos presentes en el polen de *S. kali* han sido exhaustivamente estudiados en los últimos años. A pesar del complejo alergograma del extracto proteico de este polen (Figura 3), sólo se han identificado y caracterizado seis de sus alérgenos y cuatro de ellos se han producido como proteínas recombinantes [20, 40-42, 44].

Figura 3.



Sal k 1

Sal k 1 fue el primer alérgeno identificado en el polen de *S. kali* [36, 42]. Es una proteína muy polimórfica, con una masa molecular de alrededor de 37 kDa de la que se han identificado más de 20 isoformas que difieren en su composición de aminoácidos y en su componente glicosídico, con pl que van desde 4 a 9,5. Sal k 1 pertenece a la familia de enzimas glicosil hidrolasas, las pectín metilesterasas, y es considerado un alérgeno principal, ya que más del 50% de los pacientes sensibilizados son alérgicos a esta enzima [41, 42]. Sal k 1 es responsable de aproximadamente el 80% de los casos de sensibilización a *S. kali*. De hecho, Sal k 1 se ha propuesto como marcador de sensibilización a *S. kali*, ya que es la principal diferencia entre las sensibilizaciones a *S. kali* y *C. album* ya que este último polen carece de esta proteína [42].

La expresión de Sal k 1 en *E. coli* fue llevada a cabo en 2010 por Assarehzadegan y col [41]. La proteína recombinante se produjo fusionada a la proteína tiorredoxina para aumentar su solubilidad y con una secuencia de histidinas en su extremo carboxilo terminal para facilitar su purificación. Estos autores describieron también una

variante que unía niveles menores de IgE que la variante natural. De hecho, el rSal k 1 mutante presentaba dicha unión significativamente reducida a las IgE de los pacientes en comparación con el tipo salvaje tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, los autores propusieron el uso de esta molécula como forma hipoalérgica para la inmunoterapia. Barderas y col [42] llevaron a cabo la producción de este alérgeno tanto en *E. coli* como en la levadura *P. pastoris* demostrando la escasa contribución del carbohidrato en la alergenidad a Sal k 1 ya que la proteína obtenida en bacteria y por tanto que carecía de la porción glicosídica, poseía un comportamiento prácticamente idéntico a la forma natural. Para seleccionar la isoforma más adecuada se realizó un exhaustivo estudio del polimorfismo de este alérgeno con un grupo de anticuerpos monoclonales obtenidos en una colaboración mantenida con la empresa ALK-Abelló. Esta forma recombinante es de especial relevancia para su uso diagnóstico, ya que una única forma molecular es capaz de aglutinar la capacidad inmunológica de las isoformas más representativas de la proteína natural aislada del polen [47].

Sal k 2

La secuencia de nucleótidos de Sal k 2 depositada en las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ (número de acceso: Q8L5K9) en 2002 e identificada como una posible proteína quinasa debido a su centro catalítico conservado, es el único dato que se dispone sobre este alérgeno. La proteína está compuesta de 320 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 36 kDa. Sin embargo, aparte de la secuencia de la proteína, no se dispone de datos adicionales sobre su relevancia alérgica.

Sal k 3

Este alérgeno fue identificado por primera vez en 2011 por Assarehzadegan y col [48] mediante su detección tras la separación electroforética del extracto de *S. kali* y posterior inmunodetección con una mezcla de sueros pertenecientes a pacientes alérgicos y la determinación de su secuencia parcial mediante espectrometría de masas. La banda de 45 kDa se identificó como un fragmento de una metionina sintasa independiente de la coenzima cobalamina de aproximadamente 85 kDa. Los dos fragmentos, uno de 45 (identificado previamente) y otro de 40 kDa se han producido como proteínas de fusión recombinantes. Sal k 3 recombinante ha sido caracterizada mediante IgE-inmunodetección, ELISA inhibición, y pruebas cutáneas (SPT). Ambos fragmentos recombinantes de Sal k 3 eran capaces de unir IgE y de inhibir la unión de éstas a la proteína natural.

Sal k 4

Se trata de la profilina del polen de *S. kali* que se caracterizó por primera vez en 2010 por Assarehzadegan y col [40]. Se expresaron en forma recombinante dos isoformas como proteínas de fusión. Este alérgeno presenta reactividad cruzada con

las profilinas de cenizo y de olivo. Se trata de una proteína polimórfica y en 2011, Mas y col [44] produjeron y caracterizaron dos nuevas isoformas recombinantes en *E. coli*, una de ellas hipoalérgica, que fueron identificadas mediante electroforesis bidimensional y posterior inmunodetección. Mediante el modelado de la estructura tridimensional de ambas isoformas, su diferente capacidad de unión a IgE y los hallazgos sobre la topología de sus epítomos IgE, se pudo proponer aquellos residuos de aminoácidos implicados en dicha pérdida de capacidad de unión a IgE que correspondían al denominado Epítomo 1. Dicha profilina hipoalérgica podría ser un buen candidato en protocolos de desensibilización utilizando cócteles de alérgenos.

Sal k 5

En 2009, Castro y col identificaron en el polen de *S. kali* una proteína de la familia que recibe su nombre del principal alérgeno del polen de olivo, Ole e 1. Este alérgeno recibió el nombre de Sal k 5 según las reglas que rigen la nomenclatura oficial de alérgenos. Presentaba reactividad cruzada cuando se utilizaban sueros de pacientes alérgicos a *S. kali* o *C. album* con su homólogo en el polen de *C. album*, Che a 1. Sin embargo, la reactividad cruzada con Ole e 1 fue prácticamente nula, lo que vuelve a apoyar el hecho de que la reactividad cruzada de esta y otras familias de alérgenos está restringida a los miembros pertenecientes a la familia botánica. La identificación y caracterización de Sal k 5 del polen de *S. kali* fueron publicadas por Castro y col [43] a finales de 2013, junto con la producción recombinante en la levadura *P. pastoris*. La proteína que se obtuvo exhibía propiedades físicas, químicas e inmunológicas equivalentes a las de la proteína natural. Este alérgeno es una glicoproteína con 151 residuos aminoacídicos de longitud y una masa molecular de aproximadamente 17 kDa. Presenta un cierto polimorfismo con varias isoformas detectadas. Su secuencia de aminoácidos exhibe una identidad del 68% y 32% con Che a 1 y Ole e 1, respectivamente. La frecuencia de sensibilización a Sal k 5 se situó entre el 30% y el 40%, teniendo en cuenta las dos poblaciones de pacientes sensibilizados a *S. kali*, en el centro (Zaragoza) y en la costa este de España (Murcia) [43].

Sal k 6

En 2014 se identificó una banda de 28 kDa que era reconocida por un número considerable (aproximadamente el 35%) de los sueros de pacientes alérgicos a *S. kali*. Dicha banda se desdoblaba en múltiples manchas proteicas cuando se visualizaba mediante técnicas proteómicas en una electroforesis bidimensional teñida con azul de Coomassie o con nitrato de plata. Dichas proteínas poseían distintos pls (5.8-6.7) y distintas masas moleculares (25-28 kDa) de las que las de mayor masa unían con canavalina A, indicando que estaban glicosiladas. Sobre algunas de esas manchas se realizó la huella peptídica de los péptidos obtenidos tras su digestión con proteasas los cuáles presentaron homología con las enzimas poligalacturonasas [49]. Estas en-

zimas son importantes en su función de remodelar la pared vegetal durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico. La secuencia de cDNA que codificaba esta proteína y la deducida de aminoácidos dieron como resultado una proteína con masa molecular de 40.064 Da y un pI de 6.7. Se denominó Sal k 6. Un anticuerpo policlonal obtenido frente a esta enzima reconocía proteínas homólogas en Poáceas, Platanáceas, donde se habían descrito estas enzimas alergénicas, pero también en otras no descritas como en otras Amarantáceas, Oleáceas y Betuláceas.

La proteína se produjo en forma recombinante utilizando el vector pET41b y la estirpe celular de *E. coli* BL21(DE3) que originó una proteína bien plegada como se determinó mediante estudios espectroscópicos utilizando dicroísmo circular. La inmunodetección del extracto de *S. kali* mediante el anticuerpo policlonal obtenido originó dos bandas de 47 y 28 kDa confirmando la masa molecular de esta enzima como perteneciente a las poligalacturonasas y confirmando la coexistencia de la proteína íntegra y un producto de degradación que se produce espontáneamente en el extracto. El porqué se había identificado en la inmunodetección con sueros individuales la banda de 28 kDa se podía explicar por el hecho de que la masa molecular del alérgeno intacto solapa con la del alérgeno principal Sal k 1. La unión de las IgE de una mezcla de varios sueros de pacientes alérgicos a *S. kali* a ambas bandas fue inhibida por la proteína recombinante (rSal k 6) de forma análoga.

La prevalencia de rSal k 6 en las tres poblaciones analizadas (Zaragoza, Murcia y Alicante) fue de 39% en las dos primeras y 18% en la última, valores que se correlacionan bien con los niveles relativos de granos de polen de Amarantáceas en las tres poblaciones. Sal k 6 comparte epítomos IgE con miembros de Oleáceas [fresno (*Fraxinus excelsior*), olivo (*Olea europaea*) y lila (*Syringa vulgaris*)], con grados de inhibición del 20%, 65% y 70%, respectivamente. No se ha detectado inhibición con extractos derivados de alimentos vegetales.

Amaranthus

El género *Amaranthus* se encuentra ampliamente extendido por todo el mundo como malezas perennes pero de vida corta. *Amaranthus* comprende cerca de 60 especies con inflorescencias y follaje que van desde el púrpura y rojo al verde u oro. *Amaranthus* está compuesto principalmente de arbustos, algunos de los cuales se utilizan como plantas ornamentales. Otros son altamente valorados como hortalizas de hoja o cereales. Varios grupos de investigación han presentado datos acerca del potencial alergénico de estos pólenes [18, 27, 46, 50], y concretamente la especie *Amaranthus paniculatus*, cuyas hojas y semillas se consumen en zonas de la India y producen alergia alimentaria [51]. Los pólenes de *A. retroflexus*, *A. viridis* y *A. spinosis* han sido descritos como alergénicos en regiones de Arabia saudí [50], aunque el único polen del que se han caracterizado proteínas alergénicas es *A. retroflexus* [52]. De he-

cho, esta maleza es uno de los principales desencadenantes de reacciones alérgicas en Irán, donde alrededor del 69% de los pacientes alérgicos están sensibilizados a este polen. Se ha determinado también reactividad cruzada con varias especies de la familia Amaranthaceae utilizando diferentes técnicas inmunológicas [27, 46].

Ama r 2

El perfil del extracto proteico de *A. retroflexus* muestra al menos 9 bandas reactivas a IgE que oscilan entre 10 y 70 kDa, con valores de masa molecular aparente de 10, 15, 18, 25, 39, 45, 50, 66 y 85 kDa [52].

La profilina Ama r 2 es el único alérgeno de polen de *A. retroflexus* identificado. Ha sido clonado y expresado en *E. coli* como proteína de fusión unido a una secuencia de His y su prevalencia es del 33% en una población de Irán.

Producción de derivados recombinantes para el diagnóstico y la terapia de la alergia a Amaranthaceae

Las enfermedades mediadas por IgE son actualmente uno de los problemas de salud más comunes en todo el mundo. Alrededor del 25% de la población mundial tiene algún tipo de alergia [53], y los niños son el segmento de la población más afectado [54]. En las últimas décadas, la prevalencia ha aumentado y es notablemente mayor en los países desarrollados [55].

El polen de Amaranthaceae se ha convertido en uno de los desencadenantes alérgicos más frecuentes porque los cambios climáticos y ambientales han producido extensas áreas desérticas que son rápidamente colonizadas por esta familia de malezas [12-14, 16, 22], aumentando así el riesgo de sensibilización a estos pólenes.

El diagnóstico rápido y efectivo mediante el cual se identifican las diferentes fuentes a las que se sensibiliza un paciente es esencial si se quiere reducir la exposición a moléculas alergénicas, los síntomas y las visitas de urgencias por reacciones graves e inesperadas, y sobre todo, optimizar el tratamiento del paciente. También se estará en mejor posición para evaluar el pronóstico. El desencadenamiento de los síntomas de la alergia se puede evitar con medicamentos como corticosteroides, antihistamínicos y epinefrina. Otros fármacos que se pueden administrar para aliviar los síntomas después del inicio incluyen anticolinérgicos y descongestionantes. Sin embargo, estos medicamentos son meros abordajes paliativos para tratar la alergia. El único tratamiento actualmente disponible que modula el curso de la enfermedad y tiene un efecto terapéutico duradero es la inmunoterapia con alérgenos específicos (SIT) [56], que consiste en la administración subcutánea o sublingual de dosis crecientes de los extractos proteicos de la fuente natural hasta que llegue un momento en el que el paciente sea capaz de tolerar el alérgeno. El tratamiento puede durar 2 o 3 años o incluso más tiempo [57] y en muchos casos revierte una vez se haya retirado la administración de la vacuna.

Los extractos biológicos contienen pocos alérgenos y muchas moléculas no alérgicas. Las cantidades de los alérgenos más relevantes varían dependiendo del material de origen, y se han observado grandes variaciones en la cantidad de estas moléculas entre distintos lotes de dichos extractos [58]. Los extractos naturales también acusan los bajos niveles de determinados alérgenos y con poca frecuencia, la contaminación con otras sustancias o componentes bacterianos. La utilización de los alérgenos purificados, sobre todo recombinantes, ha resuelto muchos de estos problemas [59, 60].

Durante las últimas 3 décadas, se han identificado y caracterizado en profundidad cientos de moléculas alérgicas, y muchas se han producido como proteínas recombinantes. La producción recombinante de alérgenos hace posible obtener grandes cantidades de proteína, facilitando así la caracterización de la molécula y su utilización en la práctica clínica. En la mayoría de los estudios se ha realizado una caracterización física, química e inmunológica a fondo de los alérgenos para evaluar la calidad de la proteína recombinante y determinar su alergenicidad, permitiendo así distinguir entre los alérgenos relevantes y aquellos que unen IgE pero que poseen menor importancia clínica [61, 62]. Por otra parte, la comparación del alérgeno recombinante con el natural ha facilitado la investigación no sólo de las propiedades que hacen que una molécula sea un alérgeno, sino también de su uso en el diagnóstico clínico de alergia, por componentes purificados en disolución mediante el *Advia Centauro* o fijados a *microarrays* mediante el ImmunoCap ISAC [63, 64]. En cualquier caso, el diagnóstico clínico mediante la identificación de los componentes de un alérgeno a los que se sensibiliza a un paciente utilizando alérgenos naturales o validados puede optimizar los protocolos de desensibilización basados en SIT [65]. En este sentido, el CRD se ha vuelto esencial en pacientes cuyo diagnóstico rutinario no está claro y que por lo tanto no pueden recibir un tratamiento que asegure un éxito completo. En cuanto a la alergia a la familia *Amaranthaceae*, Sal k 1 es el único alérgeno utilizado hasta la fecha en el diagnóstico ImmunoCap ISAC, ya que es el marcador de sensibilización del polen de *S. kali*. Sin embargo, la inclusión de otros alérgenos como Che a 1 o Sal k 5, ambos marcadores de la alergia a *Amaranthaceae*, permitirá diagnósticos más precisos.

El conocimiento del gran número de alérgenos recombinantes validados ha facilitado en los últimos 10 años, el diseño de moléculas con propiedades alérgicas alteradas. Derivados hipoalérgicos o péptidos utilizados en lugar de los alérgenos no modificados se han obtenido para mitigar los riesgos a reacciones adversas durante el proceso de desensibilización [61]. Estos derivados se han propuesto como un medio para mejorar la SIT al asegurar regímenes más cortos de actuación y perfiles de seguridad mejorados. En los últimos años, varios trabajos han demostrado la viabilidad de estas moléculas como sustitutos de alérgenos en SIT [62, 66]. Además, los estudios basados en ensayos clínicos han demostrado la viabilidad y la seguridad de los alérgenos recombinantes y variantes hipoalérgicas en la desensibilización por

SIT [62, 67-69]. Se han obtenido varios derivados hipoalergénicos recombinantes de Amaranthaceae [44, 70], y un cóctel de tres alérgenos recombinantes de *C. álbum* ha demostrado dar lugar a un diagnóstico clínico más seguro y preciso [24]. Además, en ensayos clínicos se está probando un derivado hipoalergénico basado en la una proteína de fusión compuesto por 3 alérgenos recombinantes (Che a 1, Che a 2 y Che a 3) para la desensibilización específica en pacientes alérgicos [53]. Esta proteína de fusión se expresó en bacterias como una proteína marcada con His soluble. Se demostró que la molécula alérgica trimérica recombinante tenía propiedades de unión a IgE mucho más reducidas (probablemente como consecuencia de alteraciones estructurales secundarias) en comparación con las de la mezcla de los 3 alérgenos recombinantes independientes, cuya baja tendencia a agregar condujo a conservar las propiedades de activación de las células T.

Cada vez más derivados hipoalergénicos están listos para estudios preclínicos y clínicos, lo que indica que en un futuro próximo tanto el diagnóstico clínico de los componentes como la inmunoterapia personalizada podría basarse en alérgenos recombinantes.

Referencias

1. Ansong M, Pickering C. Weed seeds on clothing: A global review. *J Environ Manage.* 2014;144C:203-11.
2. Gadermaier G, Hauser M, Ferreira F. Allergens of weed pollen: an overview on recombinant and natural molecules. *Methods.* 2014;66:55-66.
3. Mohapatra SS, Lockey RF, Polo F. Weed pollen allergens. *Clin Allergy Immunol.* 2008;21:127-39.
4. Bremer B, Bremer K, Chase MW, Fay MF, Reveal JL, Soltis DE, Soltis PS, Stevens PF, Anderberg AA, Moore MJ, Olmstead RG, Rudall PJ, Sytsma KJ, Tank DC, Wurdack K, Xiang JQY, Zmarzty S, Grp AP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc.* 2009;161:105-21.
5. Lambdon PW, Pysek P, Basnou C, Hejda M, Arianoutsou M, Essl F, Jarosik V, Pergl J, Winter M, Anastasiu P, Andriopoulos P, Bazos I, Brundu G, Celesti-Grapow L, Chassot P, Delipetrou P, Josefsson M, Kark S, Klotz S, Kokkoris Y, Kuhn I, Marchante H, Perglova I, Pino J, Vila M, Zikos A, Roy D, Hulme PE. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. *Preslia.* 2008;80:101-49.
6. Tapia Y, Díaz O, Pizarro C, Segura R, Vines M, Zuniga G, Moreno-Jimenez E. *Atriplex atacamensis* and *Atriplex halimus* resist as contamination in pre-Andean soils (northern Chile). *Sci Total Environ.* 2013;450:188-96.
7. Franssen AS, Skinner DZ, Al-Khatib K, Horak MJ. Pollen morphological differences in *Amaranthus* species and interspecific hybrids. *Weed Sci.* 2001;49:732-7.
8. Piotrowska C. Pollen production in selected species of anemophilous plants. *Acta Agrobot.* 2008;61:41-52.
9. Carinanos P, Alcazar P, Galan C, Dominguez E. Environmental behaviour of airborne Amaranthaceae pollen in the southern part of the Iberian Peninsula, and its role in future climate scenarios. *Sci Total Environ.* 2014;470-471:480-7.

10. Al-Dowaisan A, Fakim N, Khan MR, Arifhodzic N, Panicker R, Hanoon A, Khan I. Salsola pollen as a predominant cause of respiratory allergies in Kuwait. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92:262-7.
11. Fereidouni M, Hossini RF, Azad FJ, Assarezadegan MA, Varasteh A. Skin prick test reactivity to common aeroallergens among allergic rhinitis patients in Iran. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2009;37:73-9.
12. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* 2007;62:976-90.
13. Perez-Badia R, Rapp A, Morales C, Sardinero S, Galan C, Garcia-Mozo H. Pollen spectrum and risk of pollen allergy in central Spain. *Ann Agric Environ Med.* 2010;17:139-51.
14. Galan C, Infante F, Ruiz de Clavijo E, Guerra F, Miguel R, Dominguez E. Allergy to pollen grains from Amaranthaceae and Chenopodiaceae in Cordoba, Spain. Annual and daily variation of pollen concentration. *Ann Allergy.* 1989;63:435-8.
15. Dominguez Vilches E, Galan Soldevilla C, Guerra Pasadas F, Villamandos F, Infante Garcia-Pantaleon F, Mediavilla A. Spring pollen and related allergies in southern Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1993;3:271-5.
16. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodriguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy.* 2008;63:1550-8.
17. Ferrer L, Carnes J, Rojas-Hijazo B, Lopez-Matas MA, Sobrevia MT, Colas C. Assessing degree of flowering implicates multiple Chenopodiaceae/Amaranthaceae species in allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158:54-62.
18. Lombardero M, Duffort O, Selles JG, Hernandez J, Carreira J. Cross-reactivity among Chenopodiaceae and Amaranthaceae. *Ann Allergy.* 1985;54:430-6.
19. Villalba M, Barderas R, Mas S, Colás C, Batanero E, Rodríguez R. Amaranthaceae pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(6):371-81.
20. Arilla MC, Ibarrola I, Brena S, Martinez A, Colas C, Asturias JA. The Russian thistle (*Salsola kali*) pollen major allergen, Sal k 1, can be quantified in allergenic extracts and airborne pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152:319-26.
21. Vaquero C, Rodriguez-Torres A, Rojo J, Perez-Badia R. Airborne pollen of allergenic herb species in Toledo (Spain). *Environ Monit Assess.* 2013;185:335-46.
22. Colas C, Lezaun A. Russian thistle pollinosis: form allergen characterization to specific immunotherapy treatment. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:4652-7.
23. Colas C, Monzon S, Venturini M, Lezaun A. Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of *Salsola kali* (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:810-6.
24. Nouri HR, Sankian M, Vahedi F, Afsharzadeh D, Rouzbeh L, Moghadam M, Varasteh A. Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:3169-78.
25. Dowaisan A, Al-Ali S, Khan M, Hijazi Z, Thomson MS, Ezeamuzie CI. Sensitization to aeroallergens among patients with allergic rhinitis in a desert environment. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;84:433-8.
26. Fereidouni M, Bakhshaei M, Varasteh A. Aeroallergen sensitivity of Iranian patients with allergic rhinitis. *World Allergy Organ J.* 2007;18:262-3.

27. Wurtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H, Ipsen H. Characterization of Chenopodiales (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. *Allergy*. 1995;50:489-97.
28. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1192-8.
29. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127:47-54.
30. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Che a 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:284-92.
31. Vahedi F, Sankian M, Moghadam M, Mohaddesfar M, Ghobadi S, Varasteh AR. Cloning and expression of Che a 1, the major allergen of *Chenopodium album* in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163:895-905.
32. Barderas R, Villalba M, Batanero E, Pascual CY, Rodríguez R. Role of profilin and polcalcin in chenopod pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1132-3.
33. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem*. 2004;385:731-7.
34. Ledesma A, Barderas R, Westritschnig K, Quiralte J, Pascual CY, Valenta R, Villalba M, Rodríguez R. A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen. *Allergy*. 2006;61:477-84.
35. Verdino P, Barderas R, Villalba M, Westritschnig K, Valenta R, Rodríguez R, Keller W. Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *J Immunol*. 2008;180:2313-21.
36. Carnes J, Fernandez-Caldas E, Marina A, Alonso C, Lahoz C, Colas C, Lezaun A. Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k 1. *Allergy*. 2003;58:1152-6.
37. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Noorbakhsh R, Varasteh A. Allergy to *Salsola Kali* in a *Salsola incanescens*-rich area: role of extensive cross allergenicity. *Allergol Int*. 2009;58:261-6.
38. Shafiee A, Yunginger JW, Gleich GJ. Isolation and characterization of Russian thistle (*Salsola pestifer*) pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1981;67:472-81.
39. Ferrer A, Larramendi CH, Huertas AJ, Pagán JA, Andreu C, García Abujeta JL, López-Matas MA, Carnés J. Allergenic differences among pollens of three *Salsola* species *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151:199-206
40. Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Tehrani M, Jabbari F, Varasteh A. Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74:1441-6.
41. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Varasteh A. Expression of the recombinant major allergen of *Salsola kali* pollen (Sal k 1) and comparison with its low-immunoglobulin E-binding mutant. *Allergol Int*. 2010;59:213-22.
42. Barderas R, Garcia-Selles J, Salamanca G, Colas C, Barber D, Rodríguez R, Villalba M. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:1111-9.
43. Castro L, Mas S, Barderas R, Colas C, Garcia-Selles J, Barber D, Rodríguez R, Villalba M. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163:142-53.

44. Mas S, Barderas R, Colas C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. *FEBS J.* 2012;279:4338-49.
45. Lomson RW, Watry A. The importance of the Chenopodiaceae in pollinosis: with special reference to Winslow and Holbrook. *J Allergy.* 1933;4:225.
46. Colas C, Monzon S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, Fernandez-Caldas E. Correlation between Chenopodiaceae/Amaranthaceae pollen counts and allergic symptoms in *Salsola kali* monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2005;15:254-8.
47. Mas S, Boissy P, Monsalve RI, Cuesta-Herranz J, Díaz-Perales A, Fernández J, Colás C, Rodríguez R, Barderas R, Villalba M. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;167(2): 83-93.
48. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Mol Biol Rep.* 2011; 38:65-73.
49. Mas S, Oeo-Santos C, Cuesta-Herranz J, Díaz-Perales A, Colás C, Fernández J, Barber D, Rodríguez R, Barderas R, Villalba M A natural 28 kDa degradation product identified by proteomics of *Salsola kali* pollen extract is a relevant IgE reactive band of an integral 40 kDa polygalacturonase. Enviado al BBA proteins and proteomics
50. Hasnain SM, Fatima K, Al-Frayh A. Prevalence of airborne allergenic *Amaranthus viridis* pollen in seven different regions of Saudi Arabia. *Ann Saudi Med.* 2007;27:259-63.
51. Kasera R, Niphadkar PV, Saran A, Mathur C, Singh AB. First case report of anaphylaxis caused by Rajgira seed flour (*Amaranthus paniculatus*) from India: a clinico-immunologic evaluation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013;31:79-83.
52. Tehrani M, Sankian M, Assarehzadegan MA, Falak R, Noorbakhsh R, Moghadam M, Jabbari F, Varasteh A. Identification of a new allergen from *Amaranthus retroflexus* pollen, *Amar r 2*. *Allergol Int.* 2011;60:309-16.
53. Ebert CS, Jr., Pillsbury HC, 3rd. Epidemiology of allergy. *Otolaryngol Clin North Am.* 2011; 44:537-48.
54. Balatsouras DG, Koukoutsis G, Ganelis P, Fassolis A, Korres GS, Kaberos A. Study of allergic rhinitis in childhood. *Int J Otolaryngol.* 2011;2011:487532.
55. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H, Group IPTS. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 2006;368:733-43.
56. Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Scadding GK, Andersen JS, Riis B, Dahl R. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:131-8.
57. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, Nelson H, Akdis CA. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1288-96.
58. Duffort O, Palomares O, Lombardero M, Villalba M, Barber D, Rodríguez R, Polo F. Variability of Ole e 9 allergen in olive pollen extracts: relevance of minor allergens in immunotherapy treatments. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140(2):131-8.

59. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:211-41.
60. Himly M, Nony E, Chabre H, Van Overtvelt L, Neubauer A, van Ree R, Buchheit KH, Vieths S, Moingeon P, Ferreira F. Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. *Allergy.* 2009;64:1038-45.
61. Marth K, Focke-Tejkl M, Lupinek C, Valenta R, Niederberger V. Allergen Peptides, Recombinant Allergens and Hypoallergens for Allergen-Specific Immunotherapy. *Curr Treat Options Allergy.* 2014;1:91-106.
62. Pauli G, Malling HJ. Allergen-specific immunotherapy with recombinant allergens. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;352:43-54.
63. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy.* 2008;63(11):1550-8.
64. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Palazzo P, Pomponi D, Quarantino D, Rasi C, Zaffiro A, Zennaro D, Mari A. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy.* 2010;40:911-21.
65. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy.* 1999;29:896-904.
66. Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, Purohit A, Arvidsson M, Kavina A, Schroeder JW, Mothes N, Spitzauer S, Montagut A, Galvain S, Melac M, Andre C, Poulsen LK, Malling HJ. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:951-60.
67. Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy.* 2011;66:775-83.
68. Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth MT, Valent P, Reisinger J, Pelzmann M, Hayek B, Kronqvist M, Gafvelin G, Gronlund H, Purohit A, Suck R, Fiebig H, Cromwell O, Pauli G, van Hage-Hamsten M, Valenta R. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:14677-82.
69. Wallner M, Pichler U, Ferreira F. Recombinant allergens for pollen immunotherapy. *Immunotherapy.* 2013;5:1323-38.
70. Nouri HR, Varasteh A, Vahedi F, Chamani J, Afsharzadeh D, Sankian M. Constructing a hybrid molecule with low capacity of IgE binding from *Chenopodium album* pollen allergens. *Immunol Lett.* 2012;144:67-77.