

Importancia clínica de las diferentes especies de quenopodiáceas en Aragón

Dra. Teresa Abós.

Hospital Comarcal de Jaca (Huesca).

Dr Carlos Colás.

Hospital Clínico Universitario. Zaragoza.

La desertización es cada día más importante en nuestro país y en concreto en nuestra comunidad, Aragón, donde la cuarta parte del suelo se encuentra afectado. El 28,66% de la superficie de la comunidad, es decir, 13.676 kilómetros cuadrados, el equivalente del territorio que ocupa la provincia de Teruel, se encuentra en esta situación y la provincia de Zaragoza es una de las más afectadas.

Figura 1. Imagen de Los Monegros



Este hecho hace, que especies como las Quenopodiáceas, con una gran capacidad de adaptación a los cambios climáticos, y a terrenos cuya vegetación natural ha sido dañada por fenómenos ambientales, como la sequía o la salinización del suelo, hayan aumentado su expansión y crecimiento. En la figura 1 se puede apreciar alguno de los rasgos paisajísticos de este bello entorno.

La sensibilización a polen de Quenopodiáceas, es actualmente la tercera causa de rinitis/asma alérgica en Zaragoza y la polinización de las diferentes especies,

se produce durante más de 6 meses, comprendiendo desde marzo hasta octubre, lo que deriva en sintomatología en los pacientes, durante un amplio período de tiempo.

Por todo ello, la sensibilización y clínica debida a polen de Quenopodiáceas, es cada vez más relevante y tiene en este momento una importante repercusión social, económica y sanitaria, en nuestra área.

En los últimos años, en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, se han desarrollado, diferentes estudios en la población de Zaragoza, para valorar la sintomatología de los pacientes alérgicos a este polen, y el desarrollo de un tratamiento a través de inmunoterapia específica. En el estudio realizado por Colás y cols, se observó, que pacientes monosensibles a polen de quenopodiáceas, referían síntomas desde mayo hasta octubre, encontrando las máximas concentraciones de polen en los meses de julio y agosto. Posteriormente en el estudio EPOSAL realizado por la Dra. Ferrer y cols, con pacientes monosensibilizados a polen de quenopodiáceas durante los años 2007-8, concluyeron que la polinización de *C. álbum* no se correlacionaba con la sintomatología de los pacientes y *S. kali*, parecía no ser la única responsable de la sintomatología, siendo necesario tener en cuenta otras especies como *C. vulvaria* y *A. pátula*.

El estudio que presentamos, es una continuación del estudio EPOSAL. Su **objetivo** es mejorar el conocimiento de las especies de quenopodiáceas de nuestro entorno, su relevancia clínica y la reactividad cruzada entre ellas, con la finalidad de mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento.

A lo largo de la exposición del mismo, vamos a intentar ir respondiendo a diferentes cuestiones:

- **¿Podemos identificar perfiles clínicos en pacientes monosensibilizados a polen de Quenopodiáceas?**
- **¿Qué especies de Quenopodiáceas son más relevantes en nuestra zona y qué repercusión tienen en la clínica?**
- **¿Qué relación encontramos entre los patrones clínicos y los alérgenos más relevantes?**
- **¿Debemos considerar nuevos alérgenos para inmunoterapia?**

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, en el que se incluye a pacientes atendidos en el Servicio de Alergia del Hospital Clínico de Zaragoza, en 2009, todos ellos monosensibilizados a polen de Quenopodiáceas.

El esquema de estudio (Figura 2) es el siguiente:

- **Estudio clínico:** en el que se recogen los datos clínicos de seguimiento de nuestros pacientes.
- **Estudio ambiental,** en el que se incluye el recuento de polen ambiental de Quenopodiáceas y la floración de las especies más abundantes en nuestra zona.

- **Estudio invitro**, que evalua Ig E específica e inmunoblot para las diferentes especies de quenopodiáceas, en sueros individuales de cada paciente e inmunoblot inhibición
- **Estudio estadístico**, con múltiples metodologías para correlacionar los datos anteriores.

Figura 2. Esquema del estudio EPOSAL 2009



1. Estudio clínico

1.1. Población a estudio

Se incluyeron 36 pacientes monosensibilizados a polen de quenopodiáceas.

Todos ellos presentaron rinitis y 12 de ellos asociaron asma.

La edad osciló entre 8 y 75 años, con una media de $37,9 \pm 11,2$ años. Y en cuanto al sexo, 30 fueron mujeres (83%) y 6 hombres (17%)

1.2. Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas, para 11 especies de Quenopodiáceas, seleccionadas como más relevantes, por el especialista en botánica que colaboró en el estudio. Estas fueron las siguientes:

- **Chenopodiaceae** (*S. kali*, *S. vermiculata*, *S. oppositifolia*, *A. halimus*, *A. patula*, *B. scoparia*, *C. album*, *C. murale*, *C. opulifolium*)
- **Amaranthaceae** (*A. muricatus* y *A. deflexus*)

Todas ellas, fueron positivas, en todos los pacientes a excepción de *C. opulifolium* que sólo fue positiva en 11 de ellos.

En cuanto al análisis de las pápulas, aunque la de mayor tamaño fue para *S. Kali* ($7,8 \pm 2,3$ mm) y la de menor tamaño fue para *C. murale* ($5,7 \pm 2,2$ mm), las medias de las diferentes especies presentaron valores similares para la mayoría de ellas.

1.3. Seguimiento clínico de los pacientes

Se realizó a través de 5 visitas en la consulta (Figura 3), coincidiendo con períodos de floración de las especies de quenopodiáceas, más representativas en Zaragoza.

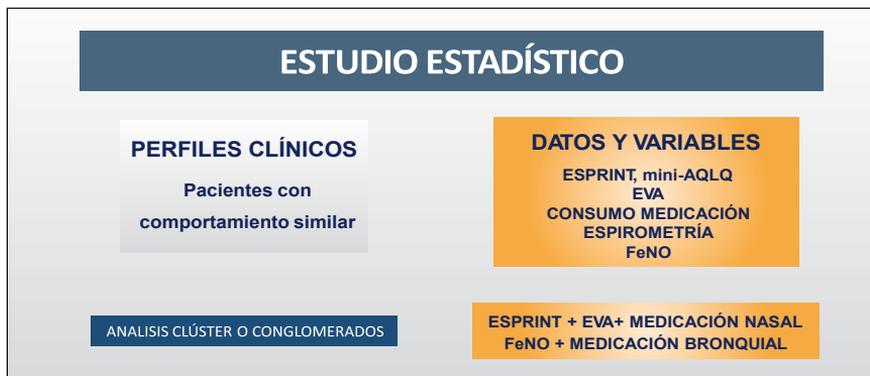
Figura 3. Cronograma del estudio



En cada una de las 5 visitas, se realizó a cada paciente (Figura 5)

- Cuestionarios de calidad de vida:
 - Cuestionario ESRPINT para evaluar calidad de vida en rinitis.
 - Cuestionario mini-AQLQ, para evaluar calidad de vida en asma.
- Escala analógica visual
- Registro del consumo de medicación
- Pruebas complementarias
 - Espirometría forzada
 - Determinación de óxido nítrico exhalado (FeNO)

Figura 5. Variables Clínicas



1.4. Estudio estadístico

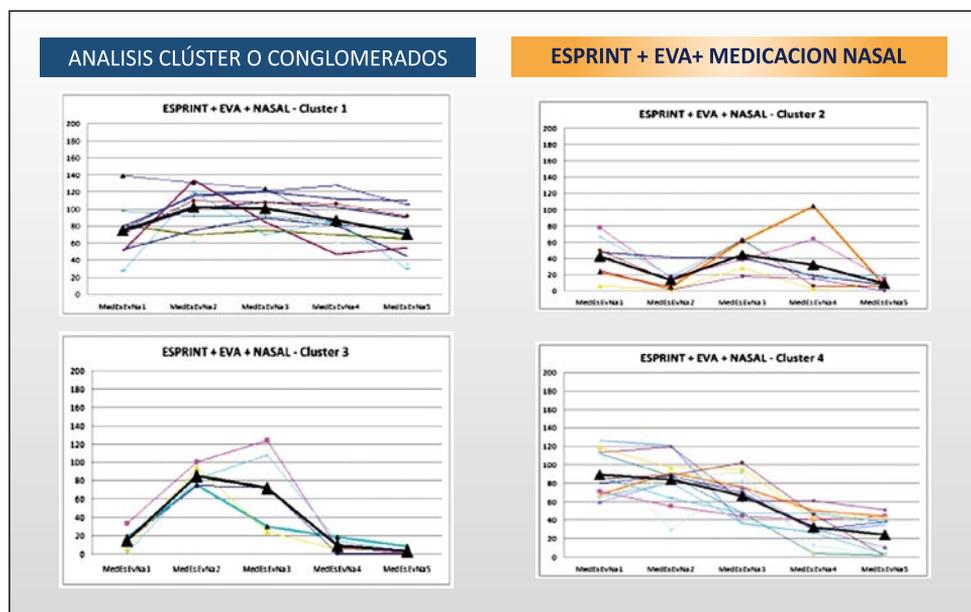
Para poder identificar perfiles clínicos, es decir, pacientes con comportamiento similar, se utilizaron análisis clúster o de conglomerados.

Los datos y variables que se utilizaron para el análisis, fueron inicialmente las diferentes variables clínicas por separado y a partir de estas, se construyeron otras, combinándolas entre sí y siguiendo la siguiente estructura:

- incluyendo a todos los pacientes
- pacientes con asma: con medicación /sin medicación
- pacientes sin asma: con medicación/sin medicación.

Debido a la amplia extensión del estudio, exponemos únicamente como ejemplo uno de ellos. Esta variable, incluye a los 36 pacientes que completaron el estudio y se define como la suma de las escalas EPRINT y EVA, así como la utilización de medicación nasal. Se obtiene una escala que toma valores de 0 a 200 y podemos ver que los pacientes se agrupan en 4 clúster (Figura 6).

Figura 6. Los cuatro tipos de clúster encontrados. El número de conglomerados o clúster osciló para cada variable a estudio, y fue desde 2 a cuatro grupos.



Podríamos responder a la primera pregunta que nos hacíamos, afirmando que en nuestro estudio, hemos encontrado perfiles clínicos diferentes. Los pacientes han podido agruparse en clúster o grupos de comportamiento similar.

2. Estudio ambiental

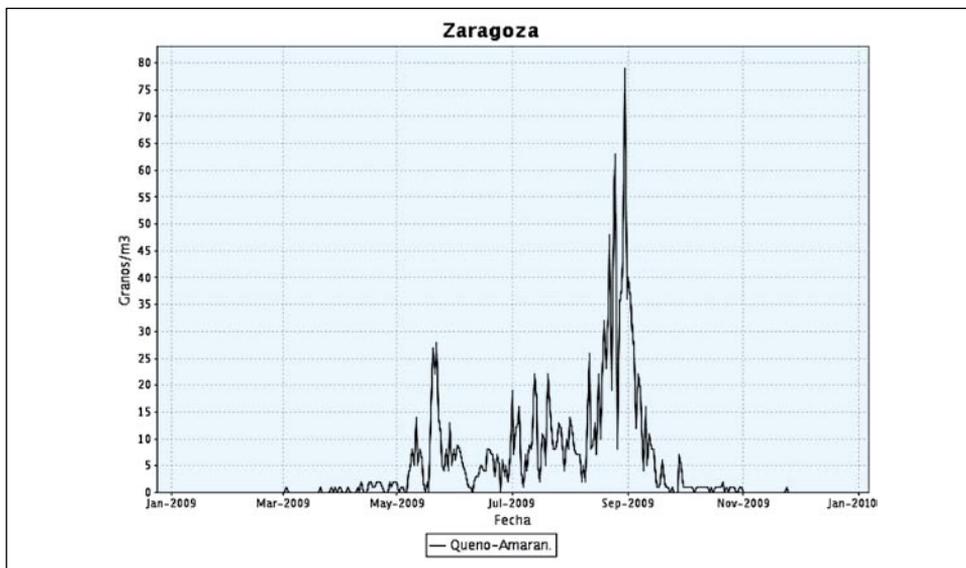
2.1. Recuento de polen ambiental

Los datos de los recuentos de pólenes de Quenopodiáceas, fueron cedidos por los Drs. Pola y Zapata, responsables de la estación de recuento de pólenes de la SEAIC en Zaragoza, que consta de un captador de pólenes de tipo Burkard, a 15 m de altura y con un flujo de aspiración de 10 L/min.

La polinización de Chenopodiaceae/Amaranthaceae para Zaragoza en 2009, se registró entre abril y octubre, alcanzando el máximo absoluto de la temporada, de casi 80 granos/m³ a finales de agosto, con el nivel máximo de polinización.

En la siguiente ilustración, representamos los niveles de polen ambiental recogidos en Zaragoza en el año 2009 (Figura 7).

Figura 7. Concentración de polen de quenopodiáceas en 2009



2.2. Fenología de la floración de las especies de Quenopodiáceas

Se realizó el seguimiento y evaluación, del estado de floración y polinización de un listado de especies de la familia Chenopodiaceae y Amaranthaceae en el entorno urbano de Zaragoza y cercanías, en un radio aproximado de 8 a 10km desde mayo hasta principio de octubre de 2009.

En el mapa podemos ver los puntos de observación (Figura 8), que se encuentran en los cuadrantes noroeste, suroeste y sureste del entorno de Zaragoza capital. Se cubrieron así las principales direcciones de los vientos dominantes de componente

Figura 8. Situación de los puntos de observación de la floración de las distintas especies de quenopodiáceas con su entorno característico



oeste-noroeste y sureste que son, en principio, los responsables de arrastrar el polen hacia la ciudad.

Se siguieron dos métodos de observación: un método general aplicado a las 11 especies indicadas anteriormente más abajo para determinar el estado global de floración y otro, más específico y detallado, aplicado a las especies más abundantes y que más podían contribuir a la aportación de polen al aire, que fueron: *S. kali*, *S. vermiculata*, *C.album*, *C.opolifolium*, *B.scoparia*, *B.vulgaris*, *A. halimus*.

Método general

Por el método general se estimaron tres categorías o niveles de floración:

- Nivel I: Floración escasa, cuando alguno ejemplares aislados o dispersos se encontraban en floración
- Nivel II. Floración media. Grupos continuos de ejemplares en floración
- Nivel III: Floración alta. La mayor parte de ejemplares, presentaban flores en abundancia

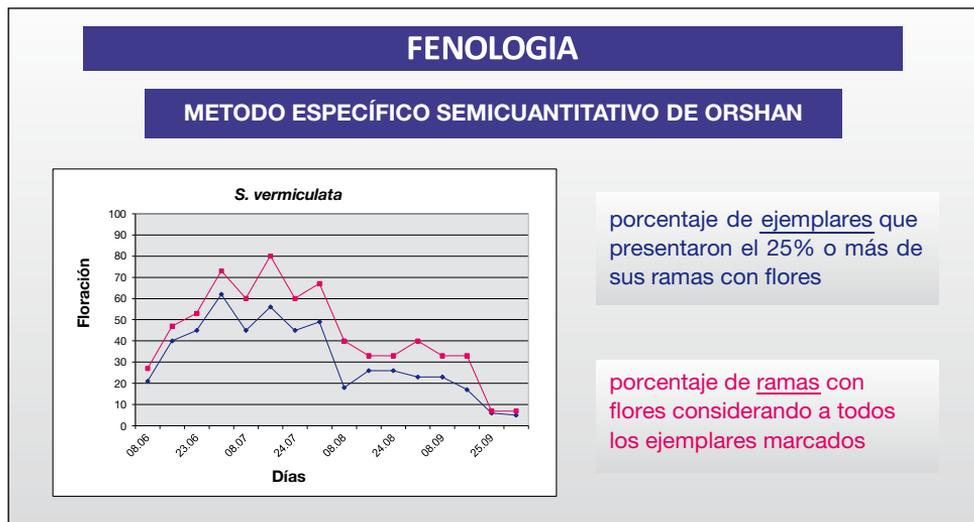
Método específico

Dicho método consistió en el seguimiento individualizado de un número suficiente de plantas representativas que han sido previamente marcadas, para registrar el porcentaje de ramas que presentan flores masculinas en antesis.

Se determinó tanto el porcentaje de ejemplares que presentaron flores en un 25% o más, de sus ramas, así como el porcentaje total de ramas con flores de todos los

ejemplares marcados. Con este método específico de carácter semicuantitativo se pretendió detectar con mayor precisión el momento de máxima polinización de la especie objeto de seguimiento (Figura 9).

Figura 9. Metodología específica de evaluación de la floración



2.3. Resultados floración método general

Como observación general se puede decir que se encontraron plantas en floración de las familias Chenopodiaceae y Amaranthaceae durante todo el periodo de estudio, desde mediados de abril hasta primeros de octubre.

Podemos destacar la floración muy corta en el tiempo, aproximadamente 1 mes, para *B. vulgaris* y *C. murale* al principio de la temporada en abril-mayo y *A. prostrata* y *A. patula* únicamente en septiembre. El resto de especies, presentan varios meses de floración entre junio y septiembre, con un gran solapamiento entre ellas, por lo que es habitual normal encontrar varias especies polinizando a la vez, aunque con diferente grado de intensidad.

2.4. Resultados de la floración. Método específico

Si comparamos las floraciones de estas especies, podemos apreciar que algunas de ellas, presentan una floración muy larga en el tiempo pero con unos niveles muy bajos de floración como ocurre con *C. Album* y *C. opulifolium* (Figura 10).

En cambio las otras 4 especies, con periodos de floración máximo entre junio y septiembre, presentan niveles de floración mucho más elevados, con picos máximos muy altos (Figura 11).

Ambos datos deben considerarse al valorar la relación de su floración con la clínica presentada por los pacientes.

Figura 10

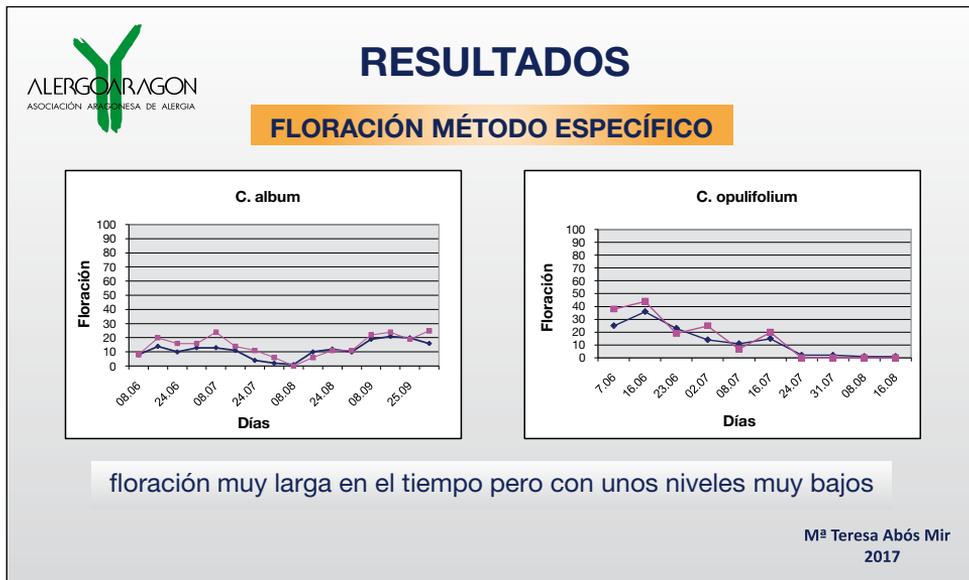


Figura 11



2.5. Comparación del recuento de polen ambiental y la floración de las especies

Cotejando los datos de recuentos de pólenes de Chenopodiaceae/Amaranthaceae para Zaragoza,, con los datos de campo, se ve que existe coincidencia de fechas del máximo absoluto de la temporada, que fue de casi 80 granos/m³ a finales de agosto de 2009, con el nivel máximo de polinización observada en el campo para *B. scoparia* a lo que hay que sumar unos elevados niveles de polinización de *A. halimus*, además de *S. kali* y *S. vermiculata*.

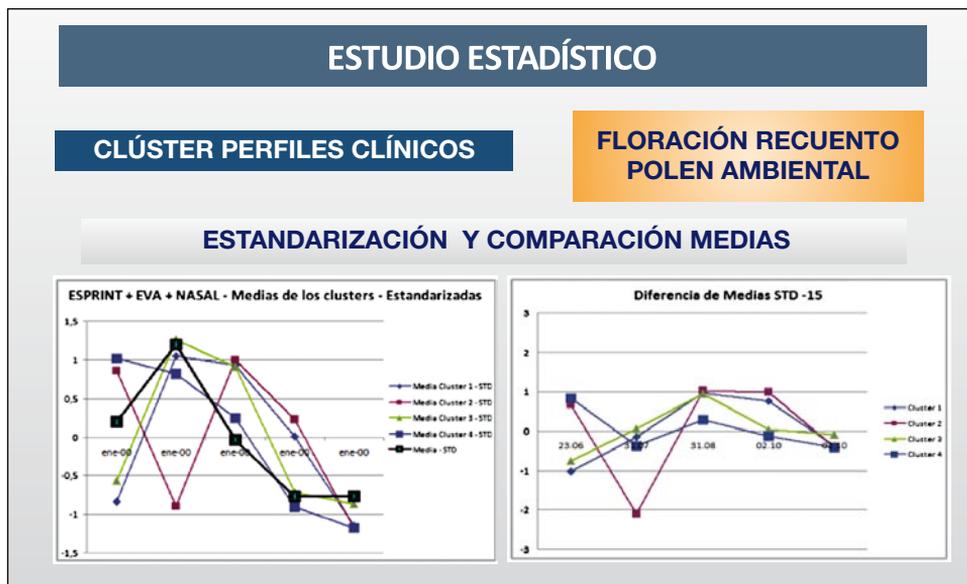
2.6. Comparación de los perfiles clínicos con el nivel de polen ambiental y la floración de las especies.

Los perfiles clínicos obtenidos, se correlacionaron con las 7 especies de quenopodiáceas cuya floración se siguió de forma más detallada: *S. kali*, *S. vermiculata*, *C.album*, *C.opolifolium*, *B.scoparia*, *B.vulgaris*, *A. halimus* y también con el recuento de polen de quenopodiáceas, ambiental.

La metodología estadística que se utilizó fue la estandarización y comparación de medias.

Se compararon estas medias estandarizadas con las medias estandarizadas de la floración de cada una de las especies y se calcularon las diferencias entre las medias para decidir si los grupos encontrados se ajustaban a la floración. Se pretende así inferir si los síntomas de cada grupo de pacientes pueden o no guardar relación con la floración de una cierta planta (Figura 12).

Figura 12



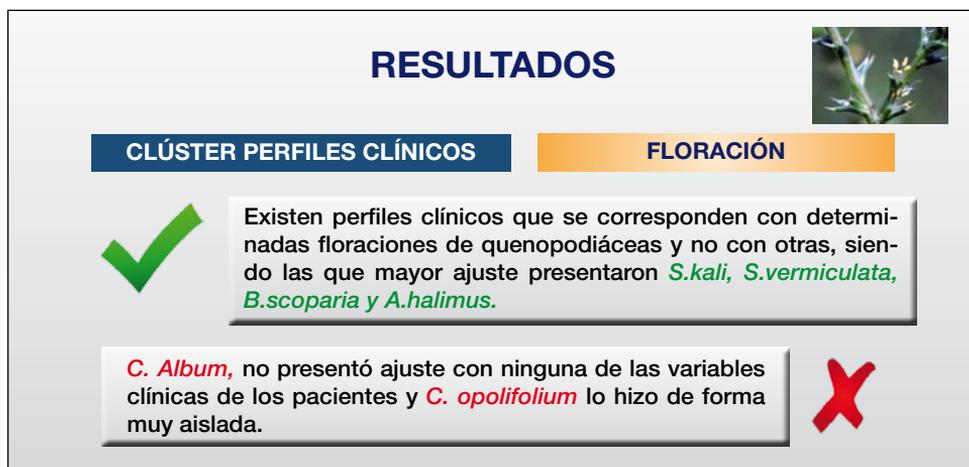
De los datos obtenidos, podemos decir, que algunos de los clústers de las variables clínicas, presentan un buen ajuste con el recuento de polen ambiental, pero no todos. En trabajos como el de la Dra. Ferrer, se planteaba la hipótesis de que algunas especies que no tienen una gran relevancia en la suma total de polen ambiental, podrían estar causando sintomatología de estos pacientes.

De los resultados obtenidos al comparar los perfiles clínicos y la floración de las especies de Quenopodiáceas, se observa en general, que hay relación entre la evolución temporal de los síntomas de alguno de los grupos de pacientes con la floración de alguna de las especies a estudio. Esta similitud sugiere que hay pacientes que presentan sensibilidad a esa floración, mientras que otros no.

De todo ello, podemos afirmar que existen perfiles clínicos que se corresponden con determinadas floraciones de quenopodiáceas y no con otras, siendo las que mayor ajuste presentaron *S. kali*, *S. vermiculata*, *B. scoparia* y *A. halimus* (Figura 13).

También pudimos ver que *C. Album*, no presentó ajuste con ninguna de las variables clínicas de los pacientes y *C. opolifolium* lo hizo de forma muy aislada.

Figura 13



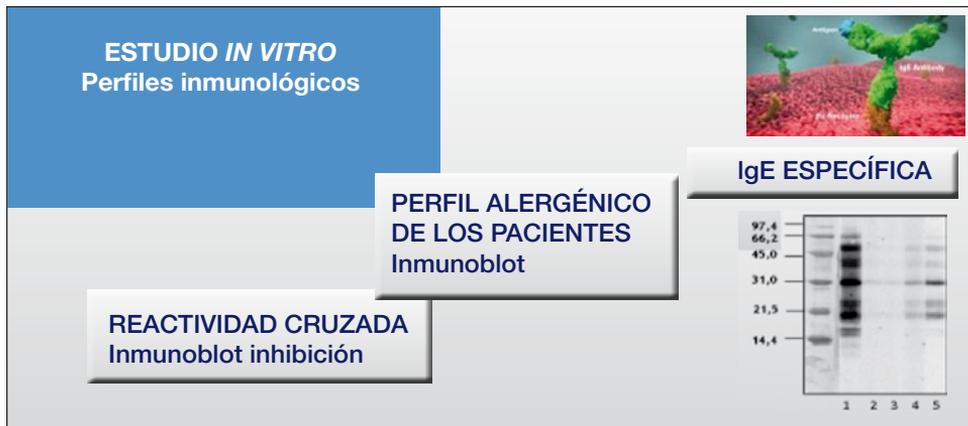
3. Estudio *in vitro*

El estudio se realizó para las cuatro especies más relevantes en el seguimiento de campo realizado en nuestra área y en el análisis detallado de la floración y que presentaron una mayor correlación con los perfiles clínicos de los pacientes.

Estas especies fueron: *S. kali*, *S. vermiculata*, *B. scoparia* y *A. halimus*

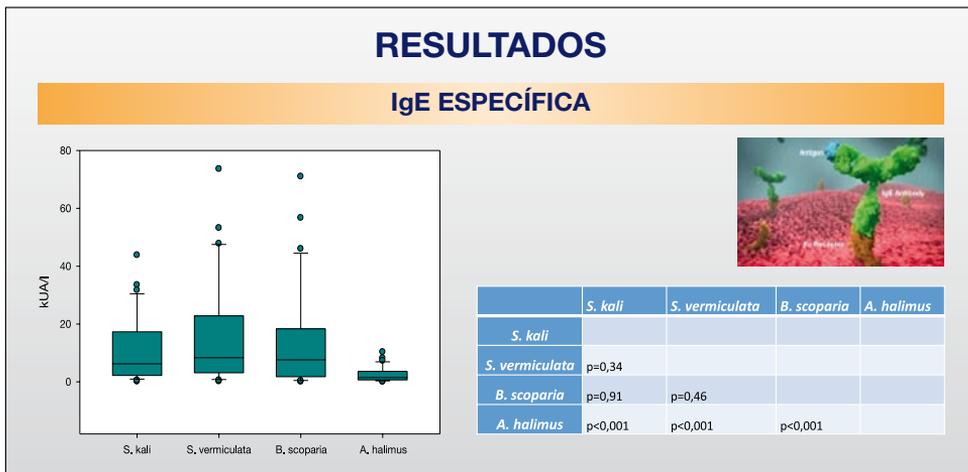
Para la caracterización de los sueros de los pacientes se realizaron los siguientes ensayos (Figura 14):

Figura 14



- **Determinación de la IgE específica:** En las muestras de suero , de forma individual, de pacientes monosensibilizados a Quenopodiáceas se determinó la IgE específica frente a las cuatro especies seleccionadas.
- **Perfil alergénico de los pacientes:** El suero de los pacientes, se utilizó para realizar un ensayo de inmunoblot, con el que se determinó el perfil alergénico de cada uno de ellos, para las 4 especies de Quenopodiáceas seleccionadas.
- **Reactividad cruzada:** Los estudios de reactividad cruzada se realizaron mediante inmunoblot inhibición, con un pool de sueros, con aquellos que reconocieron alguna banda en alguno de los 4 extractos mediante inmunoblot.

Figura 15.



3.1. Resultados de la determinación de IgE específica

Como podemos ver, los niveles de IgE específica más elevados, con medias muy similares fueron para *S. vermiculata* ($16,5 \pm 1,8$ kU/L) y *B. scoparia* ($15,2 \pm 2,9$ kU/L), con cifras menores pero próximas para *S. kali*. El nivel más bajo de IgE detectado fue para *A. halimus*, con una diferencia muy importante con respecto a las otras especies.

Se realizó así mismo, un análisis estadístico de las diferencias entre la IgE de cada una de las especies, encontrándose únicamente diferencias significativas con *A. halimus*, (Figura 15)

3.2. Resultados de la comparación de los perfiles clínicos, con la Ig E específica de las especies

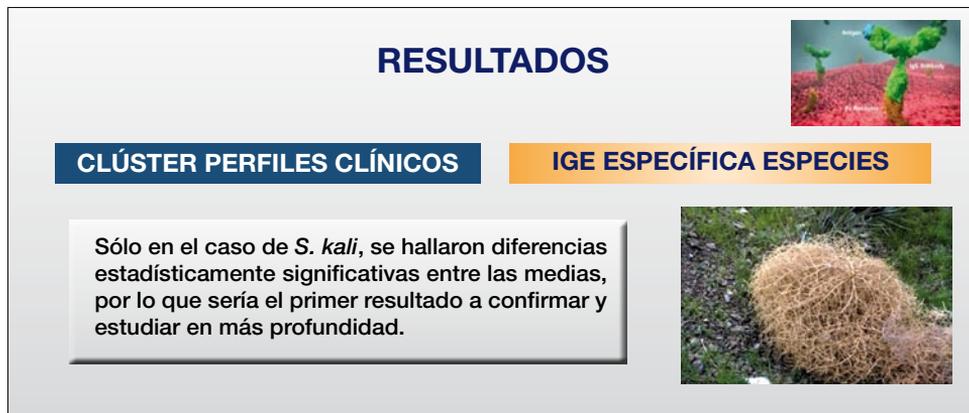
Cada clúster de estas dos variables de síntomas se compararon con los valores de IgE específica obtenida para cada una de las especies de quenopodiáceas seleccionadas: *S. kali*, *S. vermiculata*, *B. scoparia* y *A. halimus*.

Debido al pequeño número de casos en cada grupo, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas o no.

A pesar de que se observan diferencias en los valores de IgE para las dos variables a estudio de los grupos de pacientes con síntomas similares, no se pueden considerar estas diferencias como estadísticamente significativas, debido principalmente al reducido número de pacientes en el estudio.

Sólo en el caso de *S. kali*, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias, por lo que sería el primer resultado a confirmar y estudiar en más profundidad (Figura 16).

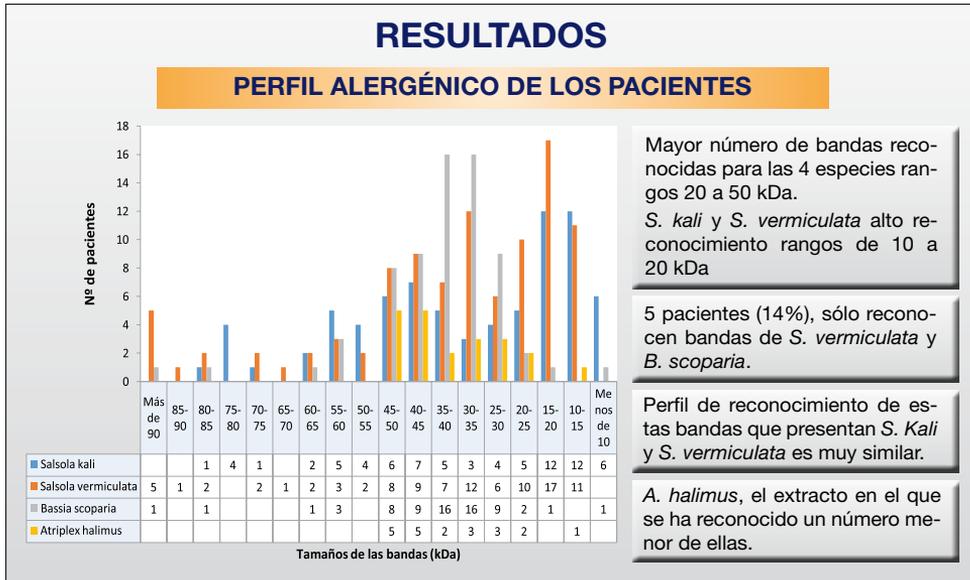
Figura 16.



3.3. Resultados de la comparación de los perfiles clínicos, con la Ig E específica de las especies

En el gráfico de la figura 17, se muestra el número de bandas reconocidas en el total de los pacientes, dentro de cada uno de los intervalos de tamaño establecidos (Figura 17).

Figura 17.



Mayor número de bandas reconocidas para las 4 especies rangos 20 a 50 kDa.

S. kali y *S. vermiculata* alto reconocimiento rangos de 10 a 20 kDa

5 pacientes (14%), sólo reconocen bandas de *S. vermiculata* y *B. scoparia*.

Perfil de reconocimiento de estas bandas que presentan *S. Kali* y *S. vermiculata* es muy similar.

A. halimus, el extracto en el que se ha reconocido un número menor de ellas.

Al analizar estos resultados, podremos apreciar las diferentes bandas proteicas y su tamaño, reconocidas por la IgE presente en los sueros de cada paciente, en relación a cada una de las especies de Quenopodiáceas.

En general, los pacientes con mayor reconocimiento de bandas, reconocen los extractos de las cuatro especies. Sin embargo, cinco de los pacientes (14%), solamente reconocen bandas en los extractos de *S. vermiculata* y *B. scoparia*.

En *S. kali* y *S. vermiculata*, reconocen un número similar de bandas, siendo *A. halimus*, el extracto en el que se ha reconocido un número menor de ellas.

En cuanto al tamaño de las bandas, podemos decir que el mayor número de ellas, en los extractos de las 4 especies, se encuentra en rangos de entre 20 a 50 kDa. En el caso de *S. kali* y *S. vermiculata*, también se encuentra un alto reconocimiento de bandas de 10 a 20 kDa que no ocurre en el caso de *B. scoparia* y *A. halimus*.

En cuanto al perfil de reconocimiento de estas bandas, vemos que el que presentan *S. Kali* y *S. vermiculata* es muy similar. No ocurriendo así en los otros dos extractos.

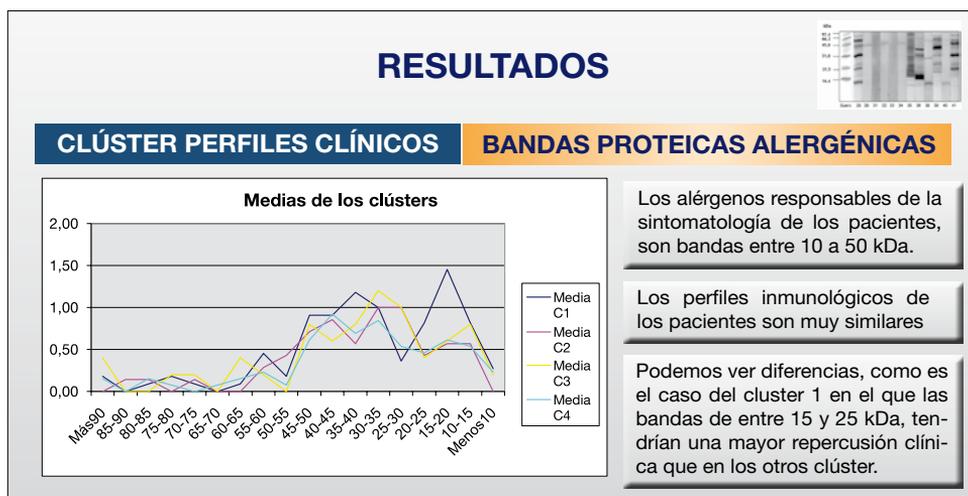
Finalmente, comparando el nivel de IgE específica para cada especie de quenopodiáceas, de cada uno de los pacientes hemos podido comprobar que no tiene relación con el número ni la intensidad de las bandas proteicas alergénicas reconocidas en el inmunoblot.

3.4. Resultados de la comparación de los perfiles clínicos, con las bandas proteicas

Para ello se utilizó como metodología estadística, la comparación de medias. Se comparó la media de la suma de las bandas, teniendo en cuenta su rango de tamaño, con los clúster clínicos de los pacientes.

Mediante un análisis descriptivo, podemos decir que el reconocimiento de bandas alergénicas para los 4 clúster es muy elevado entre las bandas de entre 10 a 50 kDa. Aunque este reconocimiento presenta características similares, vemos que en el clúster 1 aparece un elevado reconocimiento de bandas de entre 15 y 25 kDa, significativamente mayor que en los otros 3 clúster (Figura 18).

Figura 18.



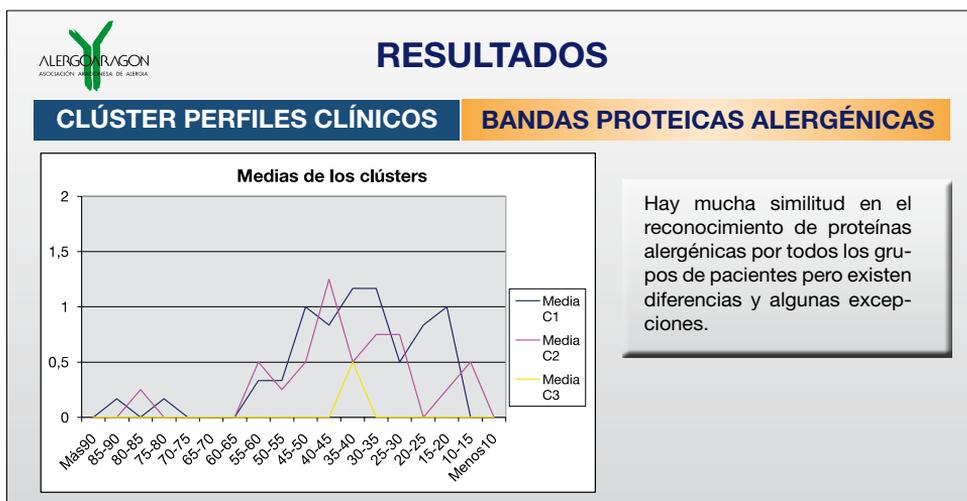
Así mismo en los clúster 1 y 3 aparece un moderado reconocimiento de las bandas de entre 55 y 65 kDa.

Las bandas mayores de 65 KDa, no son apenas reconocidas por los clúster.

Podríamos decir por lo tanto que los alérgenos responsables de la sintomatología de los pacientes, son bandas entre 10 a 50 kDa. Aunque los perfiles inmunológicos de los pacientes son muy similares, podemos ver diferencias, como es el caso del clúster 1 en el que las bandas de entre 15 y 25 kDa, tendrían una mayor repercusión clínica que en los otros clúster. Así mismo, no encontraríamos relación clínica apenas con bandas mayores de 65KDa.

Podemos decir que el reconocimiento de bandas alergénicas para el clúster 1 y 2 es de rangos entre 10 y 60 kDa a excepción del clúster 3 que únicamente reconoce bandas de entre 30 y 45 kDa y elevado entre las bandas de entre 10 a 50 kDa. Aunque este reconocimiento presenta características similares, vemos que en el clúster 1 aparece un elevado reconocimiento de bandas de entre 15 y 25 kDa, significativamente mayor que en los otros dos clúster al igual que ocurría con la variable anterior. También en el clúster 1 se reconocen bandas de rangos de entre 70 y 90 kDa y el clúster 2 de entre 80 y 90 kDa.. De nuevo vemos que aunque hay mucha similitud en el reconocimiento de proteínas alergénicas por todos los grupos de pacientes, también existen diferencias y algunas excepciones (Figura 19).

Figura 19



3.4. Reactividad cruzada entre especies

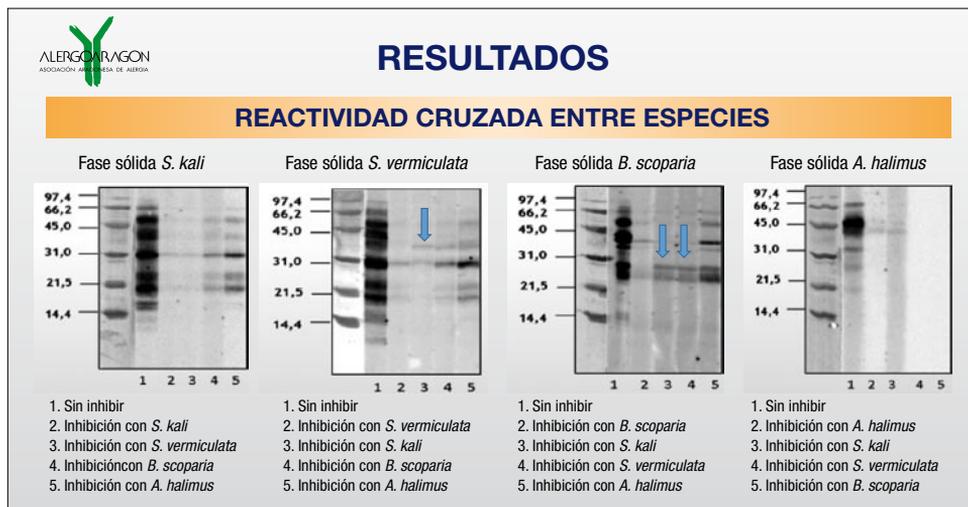
S. kali y *S. vermiculata* presentan una elevada reactividad cruzada entre ellas pero no completa, ya que aparece una banda de unos 40KDa en *S. vermiculata* que no es inhibida por *S. kali*.

S. kali y *S. vermiculata* tienen también una elevada reactividad cruzada con *A. halimus* y *B. scoparia*.

B. scoparia presenta una reactividad cruzada completa con *A. halimus*, ya que inhibe su reconocimiento de forma completa y de forma parcial con *S. kali* y *S. vermiculata*.

A. halimus es la que menos capacidad de inhibición presenta. Dado que se inhibe completamente con el resto de extractos y él no es capaz de inhibir al resto. Esto nos indicaría que la sensibilización a este alérgeno es por reactividad cruzada y que el sensibilizador primario es Salsola y/o Bassia (Figura 20).

Figura 20



Por todo lo expuesto podemos concluir lo siguiente:

- Podemos identificar perfiles clínicos en pacientes monosensibilizados a polen de Quenopodiáceas.
- Las floraciones de *S. kali*, *S. vermiculata*, *B. scoparia* y *A. halimus* fueron las que mayor ajuste presentaron con los perfiles clínicos.
- *C. album*, una de las especies, considerada tradicionalmente como parte fundamental en la alergia a quenopodiáceas en nuestra zona, no ha presentado ninguna relación con los perfiles clínicos de nuestros pacientes.
- La sintomatología de algunos de los grupos de pacientes, se ajustan bien a la floración de *A. halimus*, debería tenerse en cuenta en estudios futuros.
- La reactividad cruzada entre *S. kali* y *S. vermiculata* es alta, pero no completa, al igual que ocurre con *B. scoparia*.
- Las conclusiones anteriores, nos llevan a proponer cambios en el diagnóstico y tratamiento actual de alergia a Quenopodiáceas en Zaragoza. Por un lado dejar de considerar a *C. album*, como parte de ellos. Confirmar a *S. kali*, como parte fundamental y valorar añadir especies como *S. vermiculata* y *B. scoparia*.

Bibliografía

1. Alergologica 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España.: Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica. Egraf.; 2006.
2. Colas C, Monzon S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, et al. Correlation between Chenopodiaceae/Amaranthaceae pollen counts and allergic symptoms in Salsola kali monosensitized patients. Journal of investigational allergology & clinical immunology. 2005;15(4):254-8.

3. 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. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(4):810-6.
4. D'Amato G, Baena-Cagnani CE, Cecchi L, Annesi-Maesano I, Nunes C, Ansotegui I, et al. Climate change, air pollution and extreme events leading to increasing prevalence of allergic respiratory diseases. *Multidisciplinary respiratory medicine*. 2013;8(1):12.
5. Ferrer A, Larramendi CH, Huertas AJ, Pagan JA, Andreu C, Garcia-Abujeta JL, et al. Allergenic differences among pollens of three *Salsola* species. *International archives of allergy and immunology*. 2010;151(3):199-206.
6. 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. *International archives of allergy and immunology*. 2012;158(1):54-62.
7. Frenguelli G, Passalacqua G, Bonini S, Fiocchi A, Incorvaia C, Marcucci F, et al. Bridging allergologic and botanical knowledge in seasonal allergy: a role for phenology. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010;105(3):223-7.
8. Lombardero M, Duffort O, Selles JG, Hernandez J, Carreira J. Cross-reactivity among *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae*. *Annals of allergy*. 1985;54(5):430-6.
9. Luoto S, Lambert W, Blomqvist A, Emanuelsson C. The identification of allergen proteins in sugar beet (*Beta vulgaris*) pollen causing occupational allergy in greenhouses. *Clinical and molecular allergy : CMA*. 2008;6:7.
10. Pola J, Subiza J, Zapata C, Moral A, Feo F, Aerobiology Committee of the Spanish Society of A, et al. Correlation between total annual atmospheric pollen counts for *Chenopodiaceae--Amaranthaceae* and the prevalence of positive skin prick tests to *Chenopodium* and/or *Salsola* pollen extracts: a multicenter study. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2009;19(1):73-4.
11. Pola J, Zapata C, Sanz E. Polinosis en el área de Zaragoza. *Rev Esp Alergol inmunol Clin*. 1998;2:135-9.
12. Tehrani M, Sankian M, Assarehzadegan MA, Falak R, Jabbari F, Varasteh A. Immunochemical characterization of *Amaranthus retroflexus* pollen extract: extensive cross-reactive allergenic components among the four species of *Amaranthaceae/Chenopodiaceae*. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 2010;9(2):87-95.
13. Valero A, Alonso J, Antepará I, Baro E, Colas C, del Cuvillo A, et al. Health-related quality of life in allergic rhinitis: comparing the short form ESPRINT-15 and MiniRQLQ questionnaires. *Allergy*. 2007;62(12):1372-8.
14. Villalba M, Barderas R, Mas S, Colas C, Batanero E, Rodriguez R. *Amaranthaceae* pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2014;24(6):371-81; quiz 2 p preceding 82.
15. Weber RW. Impact of climate change on aeroallergens. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2012;108(5):294-9.
16. Wurtzen PA, Nelson HS, Lowenstein H, Ipsen H. Characterization of *Chenopodiales* (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Kochia scoparia*, *Salsola pestifer*) pollen allergens. *Allergy*. 1995;50(6):489-97.