

DEPARTAMENT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

TREBALL DE RECERCA.

Títol:

PERFIL DE SENSIBILITZACIÓ A DIVERSES VARIETATS  
D'ENCIAM EN PACIENTS AL·LÈRGICS I REACTIVITAT  
ENCREUADA.

Autor:

SÒNIA GELIS CAPARROS

Directors:

MIQUEL VILARDELL TARRÉS

OLGA LUENGO SÁNCHEZ

Convocatòria:

SETEMBRE 2011

## ÍNDEX:

Resum.....	3
Introducció.....	4
Objectius de l'estudi.....	7
Material i mètodes.....	8
Resultats.....	14
Discussió.....	21
Conclusions.....	23
Bibliografia.....	24

## RESUM:

Introducció: L'al·lèrgia als vegetals és cada cop més prevalent. Existeixen pocs estudis sobre els perfils antigènics i al·lèrgics de l'enciam i les seves varietats. Fins al moment s'ha descrit com a al·lèrgic major i únic una nsLTP: Lac s 1.

Objectius: Analitzar el perfil de sensibilització a diverses varietats d'enciam en pacients al·lèrgics i la reactivitat encreuada entre les mateixes. Estudiar el perfil de reconeixement molecular a l'extracte d'enciam.

Material i mètodes: Es van incloure 25 pacients sensibilitzats a enciam. Per estudiar el perfil de sensibilització i la reactivitat creuada es van realitzar proves cutànies a bateries estàndard de pneumoal·lèrgens / aliments i a una bateria d'extractes crus de diferents varietats d'enciams i panal·lèrgens alimentaris , a més d'un qüestionari dirigit. Per a l'estudi de reconeixement molecular es van realitzar immunodeteccions, ImmunoCAP-ISAC i ISAC-Inhibició.

Resultats: Les proves cutànies a enciams van mostrar sensibilitzacions aleatòries a les diferents varietats. L'anàlisi estadístic no va permetre establir patrons d'associació. A les immunodeteccions el 70% dels pacients reconeixien LTP , la resta no presentaven bandes fixadores d'IgE o les presentaven amb pes molecular superior. Es va aïllar en un dels sèrums una banda fixadora d'IgE de 14KDa. Mitjançant tècniques d'inhibició de l'ISAC es va demostrar la presència de profilina en l'extracte d'enciam.

Conclusions: Els perfils de sensibilització a diverses varietats d'enciam no mostren patrons específics ni suggereixen reactivitat encreuada deguda a l'expressió d'al·lèrgens diferents. A més d'estar sensibilitzats a Lac s 1, alguns pacients estan sensibilitzats a al·lèrgens menors. Un d'ells podria tractar-se d'una profilina.

## INTRODUCCIÓ

L'al·lèrgia als aliments d'origen vegetal, a més de ser una de les causes més freqüents d'al·lèrgia alimentària, ha estat en els darrers anys la base per a la realització d'estudis que han permès conèixer els al·lèrgens, les seves característiques físico-químiques i els processos de reactivitat encreuada<sup>1</sup>.

El fenomen de la reactivitat encreuada<sup>2</sup> es dona quan un anticòs de tipus IgE generat originàriament front a un al·lèrgen concret reconeix una proteïna similar d'una altra font al·lèrgica. Així és com s'explica que pacients afectats d'al·lèrgia respiratòria per sensibilització primària a pol·lens presentin posteriorment símptomes després de la ingesta de certs aliments, o que, pacients que presenten al·lèrgia per sensibilització a un aliment amb el pas del temps la presentin amb altres aliments. Per tal que existeixi reactivitat encreuada entre proteïnes s'ha de donar una identitat de seqüència entre elles superior al 70%. La probabilitat que existeixi reactivitat encreuada entre vegetals és tant més alta quan més properes son filogenèticament les espècies.

La biologia molecular ha permès identificar les molècules al·lèrgèniques que hi ha en els aliments millorant així la capacitat diagnòstica per part dels facultatius i generant la possibilitat d'estudiar perfils de sensibilització en els pacients. La importància de conèixer aquests perfils recau en les diferències de pronòstic clínic i de maneig dels pacients, i la possibilitat futura de realitzar tractaments específics.

Els al·lèrgens més importants implicats en quadres d'al·lèrgia a vegetals coneguts fins al moment inclouen les proteïnes transportadores de lípids (LTP), les profilines, els homòlegs de Bet v 1, les taumatines, les quitinases, les proteïnes de reserva: les albúmines 2s i les prolamines, entre d'altres<sup>3,4</sup>. Les LTP<sup>5</sup> son unes proteïnes altament resistents i amb capacitat de sensibilitzar de forma primària per via digestiva. Els pacients sensibilitzats a les LTP solen presentar simptomatologia sistèmica en forma d'urticària (U), angioedema (AE) o anafilaxi (AF), encara que també poden presentar-se com a síndrome d'al·lèrgia oral (SAO)<sup>6</sup>. Les profilines<sup>7</sup> formen part dels grups proteics làbils: sense capacitat de suportar el tractament tèrmic, el pH gàstric ni les enzimes digestives<sup>8</sup>. La sensibilització a aquestes proteïnes es considera secundària a una sensibilització pol·línica prèvia o primària. La forma clínic de presentació més freqüent és de tipus oral i/o faringi ja que a la seva arribada a l'estómac les profilines son desnaturalitzades pels enzims gàstrics i el pH àcid. Malgrat tot, s'han descrit reaccions de tipus sistèmic<sup>9</sup>. Tenen com a característica la gran ubiqüitat que presenten en el medi, ja que es troben en la totalitat de les espècies animals i vegetals<sup>10</sup>, i la gran similitud que presenten entre elles, el que fa que tinguin una elevada reactivitat encreuada. Les profilines constitueixen una família de panal·lèrgens altament conservada i és una de les principals responsables de la co-sensibilització entre pol·lens i aliments.

Respecte a l'al·lèrgia a l'enciam pocs son els estudis que s'han realitzat fins al moment.

L'enciam (*Lactuca sativa*) és un vegetal que pertany a la família de les compostes (*compositae*), al igual que altres vegetals com les endívies, el gira-sol o l'artemísia. Existeixen quatre grups botànics o varietats en funció de les seves característiques morfològiques: *lactuca sativa* var. *Longifolia* (romana, baby), *L.sativa* var *capitata* (batavia, trocadero, iceberg), *L.sativa* var *inybacea* (Lollo Rossa, Red salad Bowl, Cracarelle), *L sativa* var *augustana*. Filogenèticament molt properes existeixen dos famílies que s'han inclòs en l'estudi: *cichorium* (escarola, endívia i fulla de roure), *valerionella* (canonge, rúcula).

L'any 1993<sup>11</sup> es va publicar la primera evidència de que l'enciam podia donar dermatitis de contacte i un any després es va descriure el primer cas d'anafilaxi després de la seva ingesta<sup>12</sup>. L'any 1998<sup>13</sup> es va publicar el primer estudi en que es demostrava que l'enciam contenia al·lèrgens. Mitjançant estudi d'immunodetecció es van descriure dos proteïnes amb potencial al·lèrgenic: una de 16KDa, figuradament una profilina, i una altra de 9KDa, presumiblement una LTP. L'any 2003<sup>14</sup> es va demostrar que la proteïna de 9KDa era efectivament una LTP. Es va catalogar com a al·lèrgen principal de l'enciam i se la va denominar Lac s 1. Posteriorment es va demostrar la implicació de Lac s 1 en diversos episodis d'anafilaxi en pacients que havien consumit enciam<sup>15</sup>. Recentment s'ha demostrat la presència de reactivitat encreuada entre Lac s 1 i Pru p 3 (LTP, al·lèrgen principal del préssec) mitjançant assajos d'inhibició<sup>16</sup>. En el moment actual l'únic al·lèrgen descrit de l'enciam és Lac s 1 i així consta a [www.allergome.org](http://www.allergome.org) (plataforma mundial virtual, d'actualització diària, on consten tots els al·lèrgens descrits).

Les tècniques diagnòstiques d'al·lèrgia amb les que es treballa actualment es basen en la detecció d'IgE específica d'extracte complet d'una font biològica. La determinació es pot fer de forma qualitativa usant les proves cutànies (PC) o quantitativa usant la determinació d'IgE específica sèrica. L'ús de l'extracte complet no permet conèixer quin és l'al·lèrgen concret causal de la sensibilització del pacient. La introducció de l'ús de micromatrius d'al·lèrgens en l'estudi d'al·lèrgia alimentària permet diagnosticar sensibilitzacions a una o més molècules d'una o varies fonts al·lèrgèniques. Amb l'ús d'aquesta tècnica s'introdueix el concepte de diagnòstic per components i amb aquest es pot obtenir el perfil de sensibilització al·lèrgenic de cada pacient<sup>17,18</sup>. Estar sensibilitzat a LTP pot comportar risc de reaccions greus (AF) mentre que el fet d'estar-ho a profilines implicaria reaccions menys greus i la alta probabilitat de reaccions encreuades amb altres aliments i pol·lens.

Fins ara no s'ha estudiat l'existència de reactivitat encreuada entre enciams o si estar sensibilitzat a un grup o subfamília implica risc d'estar-ho a altres. Hi ha publicat un estudi similar entre varietats de tomàquets<sup>19</sup>. En aquest, es demostra que existeixen diferències en els perfils antigènics i al·lèrgènics quan s'analitza la composició de les diferents varietats de tomàquets que existeixen en l'àrea

mediterrània. Els autors descriuen una LTP i una PG2A com als al·lèrgens més importants implicats en la sensibilització a tomàquet en la nostra població però demostren a més l'existència d'altres proteïnes amb capacitat de fixar antigen implicades en les reaccions.

En el cas de l'enciam, observacions clíniques indiquen que no tots el pacients al·lèrgics a enciam estan sensibilitzats a LTP i per tant hi deu haver també altres proteïnes al·lèrgèniques responsables de les reaccions.

## OBJECTIUS DE L'ESTUDI:

L'objectiu principal de l'estudi és analitzar el perfil de sensibilització a diverses varietats d'enciam en pacients al·lèrgics i la reactivitat encreuada entre les mateixes.

L'objectiu secundari és estudiar el perfil de reconeixement molecular a l'extracte d'enciam dels pacients al·lèrgics.

## MATERIAL I MÈTODES

### Pacients:

Es varen incloure 25 pacients diagnosticats de sensibilització a enciam per prova cutània positiva ( extracte Laboratoris Leti SL), a les consultes externes d'al·lèrgia entre abril i desembre de 2010.

Tots els pacients varen firmar el consentiment informat.

El protocol de l'estudi amb nº de registre PR (AG)193/2011 va ser aprovat per el comitè ètic de l'Hospital Vall d'Hebron segons les normes de BPC (CPMP/ICH/135/95) i el Real Decret 223/2004.

### Tests cutànis:

A tots els pacients se'ls va realitzar proves cutànies en prick a tres bateries d'al·lèrgens:

Bateria estàndard de pneumoal·lèrgens de l'Hospital Vall d'Hebron: Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, alternària, aspergillus, cladosporium, penicillium, epiteli de gos, epiteli de gat, làtex, arbres I, arbres II, cupressus, olea europea, platanus, gramínies, malesa, parietària, artemísia, plantatge, mercurialis, cynodon, phragmites, panerola.

Bateria estàndard d'aliments de l'Hospital Vall d'Hebron: ametlla, avellana, cacauet, nou de nogall, pinyó, festuc, castanya, pipa de gira-sol, maduixa, meló, kiwi, poma, pell de préssec, plàtan, avocat, enciam, tomàquet, mongeta verda, pèsol, lletia, farina de tramussos, farina de soja, cereals, gluten, gliadina, ou, llet de vaca, peix blanc, peix blau, calamar, gamba, musclo, porc, pollastre, mostassa, anisakis, làtex.

Bateria d'extractes crus de diferents varietats d'enciams i panal·lèrgens alimentaris: romana, baby, meravella, trocadero, iceberg, batavia, escarola, endívia, fulla de roure, rúcula, canonge com a varietats d'enciam .LTP de préssec (30µg/ml; Laboratoris ALK-Abelló) i profilina de palmera (50µg/ml; Laboratoris ALK-Abelló) (Figura 1).

Les proves cutànies a diverses varietats d'enciam es van realitzar per la tècnica de prick-prick amb homogeneïtzat de l'enciam en fresc.

Totes les bateries contenien histamina 10mg/ml i solució salina com a controls positius i negatius respectivament. Les proves cutànies es consideraven positives si apareixia un eritema 3mm superior al control negatiu 15 minuts després de l'aplicació intraepidèrmica de la solució.



		Test cutàni (pàpul.la/eritema)
	Suero fisiològic	
	Histamina	
<i>Lactuca sativa longifolia</i>	Romana	
	Baby	
<i>Lactuca sativa capitata</i>	Maravilla	
	Trocadero	
	Iceberg	
	Batavia	
<i>Cichorium endivia</i> <i>Cichorium intybus</i>	Escarola	
	Endivia	
	Fulla de roure	
<i>Valerianella locusta</i>	Rúcula	
	Canónigo	
	LTP purificada de préssec (30µg/ml. ALK-Abelló)	
	Profilina purificada de palmera (50µg/ml. ALK-Abelló)	

**Figura 1.** Bateria de les diverses varietats d'enciams agrupades per famílies i panal·lèrgens alimentaris.

### Qüestionari dirigit:

Tots els participants a l'estudi van respondre un qüestionari, amb l'ajuda de l'investigador, per recollir les característiques clíniques de la reacció al·lèrgica presentada amb la ingesta d'enciams.

#### ESTUDIO LECHUGAS : REACTIVIDAD CRUZADA.

Código de paciente:.....

1. ¿Ha presentado algún tipo de reacción alérgica después de comer lechuga?

NO. Pasar a la pregunta 3.

SI.

2. En caso de haber presentado reacción alérgica con algún tipo de lechuga marque en la siguiente tabla con que lechugas ha tenido reacción y el tipo de reacción que ha presentado:

	No como habitualmente	Como habitualmente y lo tolero	Urticaria y/o angioedema	Picor en boca, oreja ojos.	Anafilaxia
ICEBERG					
ROMANA					
TROCADERO					
CANÓNIGO					
ENDIVIA					
MARAVILLA					

RÚCULA					
BABY					
BATAVIA					
ESCAROLA					
HOJA ROBLE					

3. ¿Tiene alergia a otros alimentos?

NO. Pasar a la pregunta 7.

SI.

4. En caso de presentar reacciones alérgicas con otros alimentos marcar en la siguiente tabla el tipo de alimento y la reacción que ha presentado:

	No como habitualmente	Como habitualmente y tolero	Urticaria y/o angioedema	Picor en boca, orejas u ojos	Anafilaxia
Avellanas					
Almendras					
Cacahuete					
Melocotón					
Manzana					
Melón					
Pepino					
Tomate					

En caso de presentar síntomas con otros alimentos anotar:

ALIMENTO	Urticaria	Angioedema	Picor en boca, ojos u orejas	Anafilaxia

5. ¿Ha presentado en alguna ocasión una reacción alérgica dónde, además del alimento, estén implicados antiinflamatorios, alcohol o ejercicio físico?

NO. Pasar a la pregunta 7.

SI.

6. Escriba en la tabla el alimento y el factor implicado:

ALIMENTO	Antiinflamatorios	Ejercicio físico	Alcohol


7. ¿Tiene alergia a pólenes?

NO.

SI.

8. En caso de presentar alergia a pólenes escoja una opción de entre las siguientes:

Primero presenté alergia ( rinoconjuntivitis o Asma) a pólenes y meses o años después empecé a presentar alergia tras la ingesta de alimentos.

Primero presenté alergia a alimentos y posteriormente presenté la alergia a pólenes.

Tengo alergia a pólenes pero no tengo síntomas de alergia con ningún alimento.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN.

### Extracció de sang i obtenció de sèrum:

L'extracció es va realitzar usant tubs Vacutainer SST® (BD,SA) amb gelosa. A cada pacient se li va extreure un tub de 5ml, que es deixava a temperatura ambient durant una hora i posteriorment es centrifugava a 2000g durant 10 minuts. El sèrum sobrenedant es recollia amb una pipeta Pasteur i es procedia a aliquidar 100µl en tubs Eppendorf d' 1.5ml. Els tubs van ser degudament etiquetats amb el número corresponent al pacient i emmagatzemats a -20° C fins a la seva utilització.

### Obtenció d'extracte proteic de l'enciam:

L'extracte proteic es va obtenir a partir de mostra d'enciam fresc, amb petites modificacions dels protocols descrits per Vieths S<sup>20</sup> i Bascones<sup>16</sup>. Breument, es varen homogeneïtzar 200 grams d'enciam amb 100mL d'acetona. Posteriorment es va centrifugar a 4500g durant 15 minuts i el pellet es va rentar tres vegades amb acetona a -80°C. Després del darrer rentat el pellet es va assecat i liofilitzar. Es van diluir tres grams de pols seca en 110mL de tampó fosfat (pH 7.4), agitant durant 2 hores a 4°C. Posteriorment es va centrifugar a 20000g durant 45 minuts a 5°C i el sobrenedant es va tornar a liofilitzar. L'extracte liofilitzat es va emmagatzemar a -20°C fins al seu ús.

### Obtenció d'extracte proteic de meló:

L'extracte proteic del meló es va obtenir a partir de mostra de polpa de meló fresca seguin el mateix protocol que en l'extracte anterior.

### SDS-PAGE i Immunodetecció:

L'electroforesi es va realitzar en un sistema discontinu d'acord al procediment descrit per Laemmli(1970). La polimerització dels gels i el desenvolupament de l'electroforesi es van dur a terme en un aparell X-CCell Surelock ( Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Es van utilitzar gels d'acrilamida comercials (NuPAGE ® Novex ® Bis-Tris Mini Gels, Invitrogen, Carlsbad,CA,USA) amb gradient 4 al 12%. Es van carregar 10 mg d'extracte liofilitzat en tampó de càrrega 2x (100mm Tris-HCL pH 6.8, 4% SDS, 0.2% blau de bromofenol, 20% glicerol), desnaturalitzant a 95°C durant 5 minuts. Els marcadors utilitzats van ser d'ampli espectre de 3-200 KDa ( SE Blue Plus II, Ivitrogen, Carlsbad, CA, USA ). Les proteïnes es van separar sotmetent-les a un corrent de 100 volts durant 90 minuts. Els gels es van tenyir amb Coomassie Col·loidal G-250 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Per estudiar el perfil de reconeixement al·lèrgic es van realitzar immunodeteccions amb el sèrum de 14 pacients sensibilitzats a enciam.

Les proteïnes de l'extracte d'enciam separades en un SDS-PAGE, es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa de 0.45 micres (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) a 15 V durant 30 minuts. Després de comprovar que la transferència havia estat correcta mitjançant la tinció de la membrana amb una solució de Vermell Ponceau, 2% àcid acètic), la membrana es va bloquejar amb NET 1x(Tris-HCl 5 mM pH 7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 5mm, 0.005% Tritó X-100) + 0.25% gelatina durant 2 hores a TA i es va incubar tota la nit a 4°C, tallada en tires, amb els sèrums dels pacients diluïts d'1:3 a 1:10 (segons la intensitat de la senyal) en NET 1x. Com a controls negatius es va utilitzar el sèrum d'un pacient no sensibilitzat i el tampó de rentat NET 1x.

Després d'1 hora de rentat en NET 1x a TA, es van incubar durant 1 hora, amb anti-IgE humana de conill (DakoCytomation, Dinamarca) a una dilució 1:2000 a TA. Al cap d'aquest temps, es van repetir els rentats amb NET 1x durant 1 hora amb canvis cada 10 minuts, i es va incubar amb un tercer anticòs de cabra anti-IgG de conill marcat amb peroxidasa (DakoCytomation, Dinamarca) a una dilució 1:4000. Després de rentar amb NET 1x, es va revelar per quimioluminiscència (Luminol®, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Regne Unit) en plaques d'autoradiografia (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Regne Unit).

### ImmunoCAP-ISAC:

A un subgrup de pacients se'ls va realitzar determinació d'IgE específica sèrica a 103 al·lèrgens individuals mitjançant la micromatriu comercial Immuno-CAP-ISAC ® (Phadia, Suècia) segons les instruccions del fabricant. Breument, els llocs de reacció del bioxip es van incubar amb 10µl de sèrum durant 2 hores a TA, i després realitzar diversos rentats amb tampó TBS-T (clorur de sodi 150 mM, Tris base 10 mM, i Tween 20 0,5%, pH 8,0) durant mitja hora, es va incubar amb anticòs anti-IgE humana marcat amb el fluoròfor Cy3 durant una altra hora. A continuació es va escanejar el bioxip al ScanArray GX Microarray Scanner (Perkin Elmer. Waltham,

Massachusetts, EUA) i l'anàlisi final es va realitzar per ordinador amb un programa automatitzat. El programari realitza una corba patró mitjançant el calibratge del sèrum analitzat en cada un dels quatre llocs. Amb aquesta corba, les intensitats fluorescents es transformen en concentracions d'IgE específica en unitats ISU (ISAC Standardised Units).

### ISAC-Inhibició:

Per tal de caracteritzar els al·lèrgens principals presents en l'extracte d'enciam, es va realitzar la determinació d'IgE específica a al·lèrgens individuals per microarray ImmunoCAP ISAC® després d'incubar el sèrum d'un subgrup de pacients sensibilitzats a enciam amb l'extracte cru d'enciam.

Es va incubar 100µl de sèrum amb 1 mg d'extracte d'enciam liofilitzat durant tota la nit a 40°C. A continuació es va realitzar la determinació d'IgE específica sèrica amb la micromatriu ISAC® ( Phadia, Suecia) segons s'ha descrit prèviament.

La inhibició amb meló es va fer seguint la mateixa metodologia: 1 mg d'extracte de meló liofilitzat incubat amb 100µml de sèrum i detrmnació d'IgE específica sèrica posterior.

### Anàlisi de dades:

L'anàlisi de les variables de l'estudi es va realitzar utilitzant el paquet estadístic SPSS versió 17.0.

## RESULTATS

Dels 25 pacients inclosos amb sensibilització a enciam per prova cutània, 16 foren dones i 9 homes, amb una mitjana d'edat de 34 anys (rang 23-44). Malgrat estar sensibilitzats, 4/25 (16%) toleraven la ingesta d'enciam. Dels que presentaven clínica amb la ingesta, 9/21 (43%) referien síndrome d'al·lèrgia oral, 7/21 (33%) urticària i/o angioedema i 5/21 (24%) anafilaxi. La majoria dels pacients no sabien identificar o no recordaven la classe d'enciam causant de la reacció, la qual cosa va impossibilitar establir quina varietat produïa símptomes amb més freqüència ni si s'associaven a una expressió clínica determinada. Dels pacients que havien presentat símptomes després de la ingesta d'enciam aproximadament la meitat seguien menjant algunes subclasses mentre que la resta els evitaven tots.

El 24% dels pacients referien algun cofactor (alcohol, antiinflamatoris o exercici físic) potencialment implicat en les reaccions al·lèrgiques després de la ingesta d'enciam.

El 80% dels pacients presentava sensibilització a pol·len. El més prevalent era el de *Platanus* (44%), seguit de *Artemisia* (40%), gramínies (28%), *Parietaria* (28%) i olivera (12%).

En quant a les co-sensibilitzacions alimentàries cal destacar que cap dels participants presentava al·lèrgia a l'enciam de forma aïllada. El 80% presentaven sensibilització a fruits secs i el 72% a fruites rosàcies.

### Proves cutànies:

A la taula 1 es mostren els resultats de les proves cutànies específiques amb les varietats d'enciams:

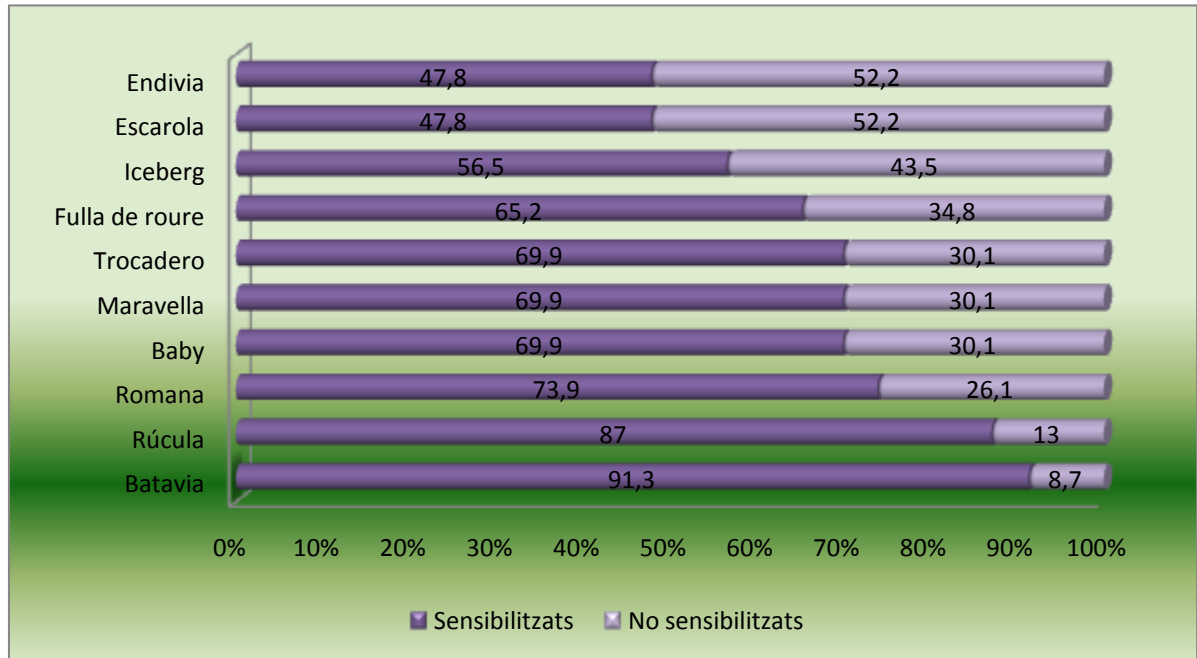
**Taula1. Resultats de les proves cutànies intraepidèrmiques amb les varietats d'enciams**

Substàncies testades	P A C I E N T																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
HISTAMINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa longifolia</i> : Romana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa longifolia</i> : Baby	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa capitata</i> : Maravella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa capitata</i> : Trocadero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa capitata</i> : Iceberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactuca sativa capitata</i> : Batavia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cichorium endívia</i> : Escarola	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cichorium intybus</i> : Endívia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cichorium intybus</i> : Fulla de roure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Varianella locusta</i> : Rúcula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Varianella locusta</i> : Canónoge(canónigo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteïna purificada de préssecs: LTP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteïna purificada de palmera : PROFILINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

◆ Test cutàni positiu.

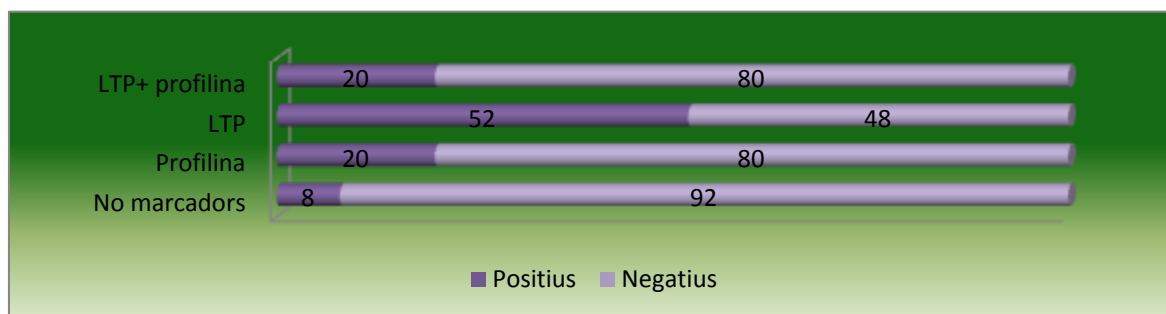
◆ Test cutàni negatiu

Les varietats que induïen reactivitat cutània amb més freqüència foren la Batavia i la Rúcula i les que menys l'endívia i l'escarola (Fig. 2)



**Figura 2. Percentatge de pacients sensibles a cada varietat d'enciam segons prova cutània intraepidèrmica.**

La sensibilització a panal·lèrgens es va comprovar en 23 pacients (92%): 13 pacients a LTP, 5 a profilina i 5 a ambdós (Fig. 3).

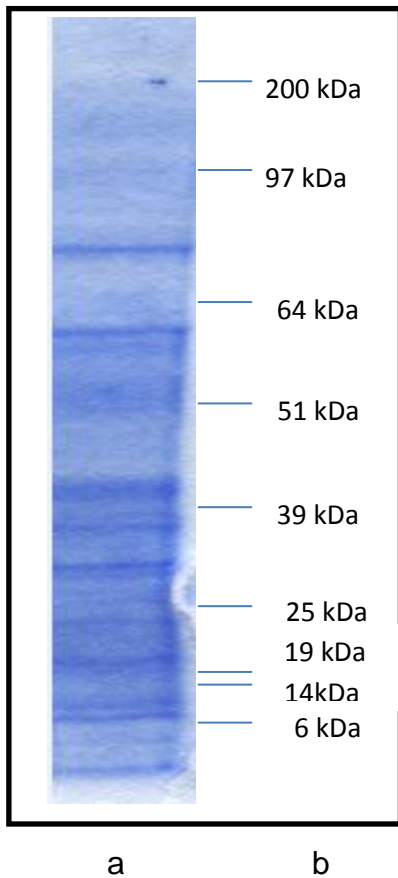


**Figura 3. Percentatge de pacients sensibilitzats a panal·lèrgens**

No es va trobar associació entre la sensibilització a diferents varietats d'enciam ni de la mateixa família ni entre famílies diferents.

### SDS-PAGE i Immunodetecció

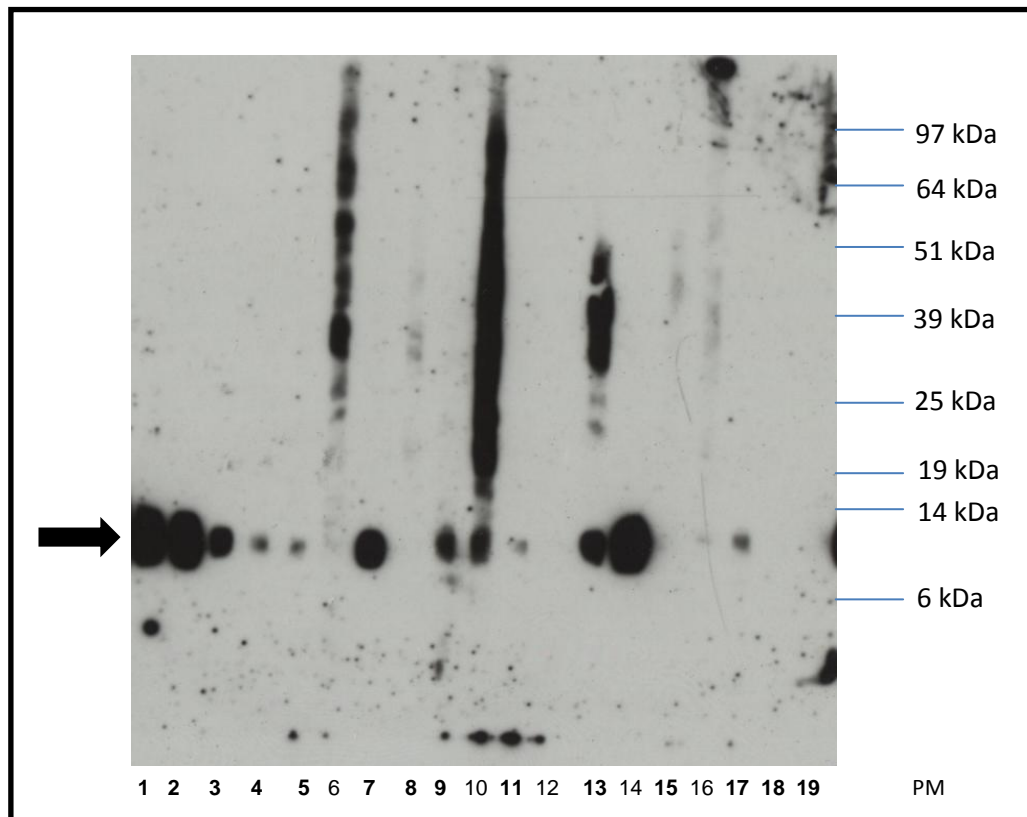
Les proteïnes de l'extracte d'enciam es van separar mitjançant SDS-PAGE. A la figura 4 s'observen les proteïnes, compreses en un rang de pesos mol·leculars entre 6-90 KD.



**Figura 4. SDS-Page d'extracte d'enciam (a), marcador de pes molecular (b).**



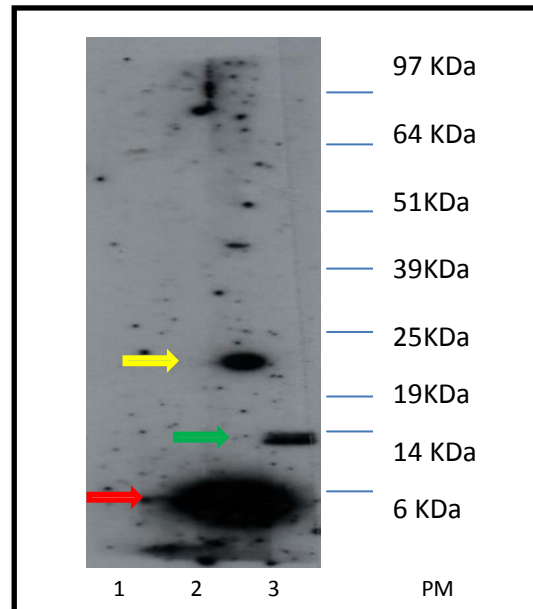
A la Figura 5 es mostra el resultat de l'immunodetecció realitzada a un subgrup de 14 pacients.



**Figura 5. Immunodetecció d'extracte d'enciam.** Carrils 1-5,7-9,11,13,15,17-19: sèrum de pacients sensibilitzats a enciam. Controls: Carril 6 i 15: control positiu per profilina; carril 14: control positiu per LTP; carril 10 i 16: control positiu per LTP i profilina; carril 12: control negatiu. PM: pesos moleculars

La banda proteica de 9 kDa, corresponent al pes molecular de la LTP (fletxa) és la que es detecta amb més freqüència (10/14 pacients) i intensitat. En alguns casos (pacients 8,13,15), s'observen bandes fixadores d'IgE en rangs de PM de 14 a 64 kDa.

A la figura 6 es mostra les immunodeteccions amb sèrum de dos pacients al·lèrgics a enciam, un amb sensibilització demostrada a LTP i l'altre exclusivament sensibilitzat a profilines (per prova cutània i ISAC). Amb el sèrum del pacient sensibilitzat a profilines destacava la fixació d'IgE a una banda de pes molecular aproximat de 14 kDa, mentre que aquesta no apareixia amb el sèrum del pacient al·lèrgic a LTP, que fixava una banda de 9 kDa (probablement corresponent a Lac s 1) i una banda proteica d'uns 22-24 kDa.



**Figura 6. Immunodetecció en l'extracte d'enciam.** Carril 1: control negatiu; carril 2: sèrum de pacient sensibilitzat a LTP (pacient 11); carril 3: sèrum de pacient sensibilitzat a profilina (pacient 23). PM: pesos moleculars.

No es va trobar cap associació entre les manifestacions clíniques (SAO, urticària/angioedema, anafilàxi o tolerància) i els diferents patrons de reconeixement en les immunodeteccions.

### ISAC- ISAC Inhibició:

Amb l'objectiu de comprovar la presència de LTP (Lac s1) en l'extracte d'enciam, es varen realitzar inhibicions d'ISAC®.

En el cas d'un pacient que presentava IgE específica enfront LTP (per immunodetecció i per ISAC), es veia que la preincubació del sèrum del pacient amb l'extracte d'enciam inhibia el reconeixement de les LTPs presents a l'ISAC (Pru p 3, Cor a 8 i Art v 3). Així, després de la incubació del sèrum amb extracte d'enciam, desapareixia de la detecció d'IgE específica per Cor a 8 i Art v3 i es produïa una inhibició del 80% dels nivells d'IgE específica per de Pru p 3 (Fig. 7).

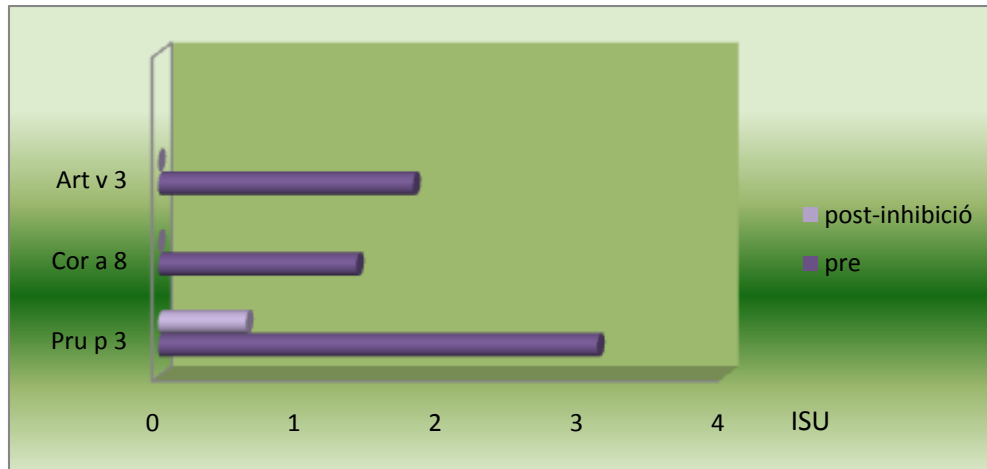


Figura 7. Resultats de l'ISAC post-inhibició amb extracte d'enciam (pacient nº 11).

Per confirmar la presència de profilines a l'extracte d'enciam es va realitzar una inhibició de l'ISAC amb sèrum del pacient 23, que només reconeixia profilina i no altres al·lèrgens per prova cutània, ISAC i immunodetecció i ISAC (Figura 8) . Després de la incubació amb extracte d'enciam (Figura 9) s'observava la inhibició completa de la detecció d'IgE específica per quatre de les cinc profilines incloses a l'ISAC® (Bet v 2, Ole e 2, Hev b 8 i Phl p 12). Com a control positiu d'inhibició es va utilitzar extracte de meló, que té un alt contingut en profilina ( Figura 10).

#### Marcadores Especie-Específicos

##### Animales

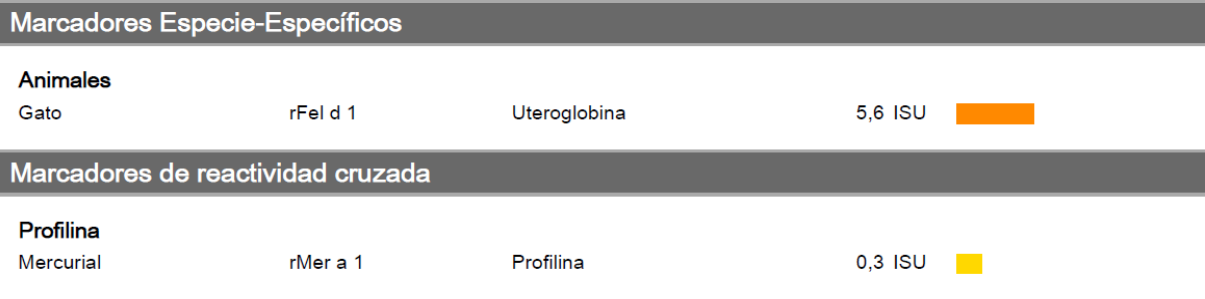
Gato	rFel d 1	Uteroglobina	2,5 ISU	<span style="color: orange;">■</span>
------	----------	--------------	---------	---------------------------------------

#### Marcadores de reactividad cruzada

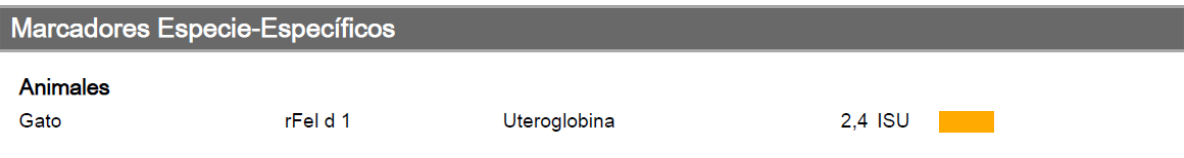
##### Profilina

Abedul	rBet v 2	Profilina	0,9 ISU	<span style="color: yellow;">■</span>
Olivo	nOle e 2	Profilina	0,8 ISU	<span style="color: yellow;">■</span>
Látex	rHev b 8	Profilina	0,9 ISU	<span style="color: yellow;">■</span>
Mercurial	rMer a 1	Profilina	1,1 ISU	<span style="color: yellow;">■</span>
Hierba Timotea	rPhl p 12	Profilina	0,4 ISU	<span style="color: yellow;">■</span>

Figura 8. Resultats de l'ISAC del pacient nº 23 pre-incubació.



**Figura 9. Resultats de l'ISAC del pacient nº23 post- incubació amb extracte d'enciam.**



**Figura 10. Resultats de l'ISAC del pacienyt nº23 post-incubació amb meló.**

## DISCUSSIÓ

Els estudis sobre l'al·lèrgia a l'enciam s'han dut a terme en la darrera dècada. Inicialment es varen descriure casos de dermatitis de contacte<sup>11</sup> i després s'han publicat estudis de pacients amb simptomatologia sistèmica<sup>8,9,12</sup>. L'únic al·lèrgen d'enciam registrat a les bases de dades és Lac s 1<sup>13</sup>, una proteïna de la família de les nsLTP. Aquesta LTP té una identitat de seqüència molt alta amb altres proteïnes de tipus LTP com la de préssec, la poma, el pol·len de plataner o el pol·len d'artemisia i per tant una alta capacitat de presentar reactivitat encreuada<sup>14</sup>.

Fins a data d'avui no s'ha publicat cap estudi que compari la sensibilització als diferents tipus d'enciams ni si existeix alta o baixa probabilitat de presentar simptomatologia amb la ingesta d'una varietat quan s'ha presentat simptomatologia amb una altra. Aquesta informació seria rellevant a l'hora de plantejar estudis al·lèrgològics amb l'objectiu d'indicar la dieta que han de seguir aquests pacients.

Encara que en el present estudi s'observa que tots els pacients presenten sensibilització a més d'un tipus d'enciam, no es poden establir patrons d'associació entre la sensibilització a diverses varietats: ni quan l'anàlisi es realitza dins famílies ni quan es realitza entre famílies. Així doncs, malgrat que els pacients no estan sensibilitzats a totes les classes, no sembla que es degui a que intrínsecament continguin al·lèrgens diferents. Aquesta aparent sensibilització aleatòria a les diferents varietats es podria explicar per característiques pròpies del subjecte al·lèrgic com per exemple, l'afinitat de la IgE específica enfront l'enciam o l'epítip específic contra el que va dirigit la IgE.

En aquest estudi es constata que Lac s 1 és l'al·lèrgen majoritari en la nostra població de pacients al·lèrgics a l'enciam, malgrat això, fins a una quarta part dels pacients estudiats no presenten sensibilització a LTP. Aquest fet ja va ser descrit per M San Miguel-Moncín i cols<sup>13</sup> en un treball on es realitzaven immunodeteccions a 14 pacients que presentaven sensibilització a l'enciam demostrada per proves cutànies amb extracte comercial del mateix. Dels 14 pacients, 10 presentaven una banda de 9KDa compatible amb la LTP però n'hi havia 4, tots ells amb simptomatologia clínica després de la ingesta d'enciam, que presentaven altres bandes proteïques fixadores d'IgE amb un pes molecular superior al de la LTP, o simplement no presenten bandes. Els autors d'aquest treball van justificar la no troballa de LTP en aquests pacients per causa d'errors en la tècnica i van considerar la presència de les altres bandes fixadores d'IgE com a marcadors inespecífics.

Encara que només s'ha pogut observar amb el sèrum d'un pacient, el present estudi demostra que l'extracte d'enciam conté una proteïna de pes molecular aproximat de 14 kDa amb capacitat al·lèrgica, doncs el pacient sensibilitzat havia patit una reacció anafilàctica després de la ingesta d'enciam. Donada la extrema ubiqüitat de

les profilines en el regne vegetal es molt probable que la proteïna de 14 kDa correspongui a una profilina, no descrita fins ara com al·lergè de l'enciam.

L'assaig d'inhibició de l'ImmunoCAP ISAC® amb extracte d'enciam corrobora que, efectivament, l'extracte conté profilina, doncs s'inhibeix completament la IgE específica a quatre de les cinc profilines presents a l'ImmunoCAP ISAC®.

Per tal de confirmar que la proteïna al·lergènica de 14 kDa present a l'extracte d'enciam es una profilina serà necessari realitzar més estudis per aïllar i caracteritzar la seqüència peptídica de la proteïna.

## CONCLUSIONS

Els perfils de sensibilització a diverses varietats d'enciam no mostren patrons específics ni suggereixen reactivitat encreuada deguda a l'expressió d'al·lèrgens diferents.

A més d'estar sensibilitzats a l'al·lergen principal de l'enciam : Lac s 1, alguns pacients estan sensibilitzats a al·lèrgens menors. Un d'aquests al·lèrgens menors podria tractar-se molt probablement d'una profilina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Enrique E, Lázaro M, Cuesta J, Cisteró-Bahíma A. Peculiaridades clínicas de la alergia a los alimentos de origen vegetal. En: A. Peláez, I.J.Dávila, eds. Tratado de alergología. Sociedad Española de alergia e Inmunología clínica. Madrid, Editorial Ergon 2007: 858-870.
2. Aalberse RC, Akkerdaas J, Van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*. 2001;56(6):478-90.
3. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breitender H, Mills C. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:163-70
4. Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy* 1982;37:437-43.
5. Scheuer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel-Moncín MM, Retzek M, Hartz C et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:900-7.
6. Vassilopoulou E, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Rigby NR, Mills C, Van Ree et al. Severe Immediate Allergic Reactions to Grapes: Part of a Lipid Transfer Protein-Associated Clinical Syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143:92-102.
7. Scheuer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wüthrich B et al. Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4), and celery (Api g 4) with birch profilin Bet v 2. *J Chromatogr B* 2001; 759:315-25.
8. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1269-73.
9. Fah J, Wüthrich B, Vieths S. Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitizations to profiling. *Clin Exp allergy* 1995;25:1018-23
10. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P et al. Identification of profiling as a novel pollen allergen; IgE auto-reactivity in sensitized individuals. *Science* 1991;253:557-60.
11. Alonso MD, Martín JA, Cuevas M, Parra F, Lezaun A, Conde Salazar L, Guimaraen MD, Losada E. Occupational protein contact dermatitis from lettuce. *Contact dermatitis* 1993; 29:109-110.
12. Helbing A, Schwartz HJ, Lopez M, Leher SB, and Lettuce and carrot allergy: are they related? *Allergy Proc* 1994; 15(1):33-8.
13. Vila L, Sánchez G, Sans ML, Dieguez I, Martinez A, Palacios R, Martinez J. Study of a case of hypersensitivity to lettuce (*latuca sativa*). *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1031-1035.
14. San Miguel-Moncín MM, Krail M, Scheuer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cisteró-Bahíma A, Vieths S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy* 2003; 58: 511-517.
15. Hartz C, San Miguel-Moncín MdelM, Cisteró-Bahíma A, Fötisch K, Metzner KJ, Fortunato D, Lidholm J, Vieths S, Scheuer S. Molecular characterization of Lac s 1, the major allergen from lettuce (*Lactuca sativa*). *Mol Immunol* 2007 Apr;44 (11): 2820-30.



16. Bascones O, Rodriguez-Pérez R, Juste S, Moneo I, Caballero ML. Lettuce-Induced Anaphylaxis. Identification of the allergen Involved. *JbInvestig Clin Immunol* 2009 b; Vol 19(2): 154-157.
17. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003 ;33(1):7-13
18. Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarish R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy*. 2006 ;61(5):633-9
19. López-Matas MA, Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, Pagán JA, García-Abujeta JL, Bartra J, Andreu C, Lavín JR, Carnés J. Identification and quantification of tomato allergens: in vitro characterization of six different varieties. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011 ;106(3):230-8.
20. Vieths S, Schöning B, Petersen A. Characterization of the 18-KDa apple allergen by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;104:399-404