



Universidad de Málaga

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Dermatología

TESIS DOCTORAL

**PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN EN
PACIENTES CON ALERGIA A
MELOCOTÓN, Y ESTUDIO DE LOS
CAMBIOS INMUNOLÓGICOS, EFICACIA Y
TOLERANCIA A INMUNOTERAPIA
ESPECÍFICA CON MELOCOTÓN.**

Gádor Bogas Herrera



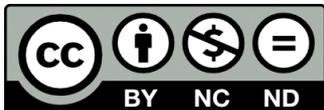


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Gádor Bogas Herrera

 <http://orcid.org/0000-0003-1868-3471>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Gádor Bogas Herrera

Málaga, 2016

Doña MARIA JOSÉ TORRES JAÉN, Doctora en Medicina y Cirugía y Doña CRISTOBALINA MAYORGA MAYORGA, Doctora en Biología.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta GÁDOR BOGAS HERRERA con el título “**Perfil de sensibilización en pacientes con alergia a melocotón, y estudio de los cambios inmunológicos, eficacia y tolerancia a inmunoterapia específica con melocotón**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Málaga a 28 de Marzo de 2016.

Fdo. María José Torres Jaén

Fdo. Cristobalina Mayorga Mayorga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Doña MARÍA JOSÉ TORRES JAÉN, Doctora en Medicina y Cirugía, y Doña CRISTOBALINA MAYORGA MAYORGA, Doctora en Biología,

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta GÁDOR BOGAS HERRERA, con el título “**Perfil de sensibilización en pacientes con alergia a melocotón, y estudio de los cambios inmunológicos, eficacia y tolerancia a inmunoterapia específica con melocotón**” se ha realizado bajo nuestra dirección y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Málaga a 28 de Marzo de 2016.

Fdo. Cristobalina Mayorga Mayorga

Fdo. Dra. María José Torres Jaén



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Yo, GÁDOR BOGAS HERRERA, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Perfil de sensibilización en pacientes con alergia a melocotón, y estudio de los cambios inmunológicos, eficacia y tolerancia a inmunoterapia específica con melocotón”**, que ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. María José Torres Jaén y la Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga y bajo la tutela de la Dra. María José Torres Jaén.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 28 de Marzo de 2016.

Fdo. Gádor Bogas Herrera



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Creo que todas las líneas de este trabajo deberían haber sido de **AGRADECIMIENTOS**, imposible haberlo podido realizar sin la ayuda en tan distintas formas que siempre se me ha dado.

Empezando, mis padres y mi hermano. Siempre apoyándome, entendiéndome, enseñándome, cuidándome..., y un sin fin de incalculables etcéteras cargadas de un gran esfuerzo diario por su parte (sí, aún está ahí la “estaquita”), que han permitido formar mi personalidad y que pueda estar donde ahora me hallo. Muchas gracias.

Desde el primer día que pisé la puerta de este Servicio de Alergia salí con una sonrisa en la cara, sabiendo que la decisión que tanto rondó en mi cabeza era la acertada, pues hablando claro, fácil de decisión no soy, je je. Ese día Pepa, mi incuestionable Directora, Tutora, y Profesora, sin dudarle ni un segundo, me dio su teléfono y preguntó que porqué había elegido esta fascinante especialidad. Mi respuesta entre otras cosas, “por la investigación, que no sé si se me dará bien”, y desde entonces no ha parado en enseñarme, cuidarme y confiar en mí hasta cuándo yo no lo he hecho, GRACIAS. Suerte tener dos tutoras para que nunca nos falte de nada, como dos madres, Paloma, muchísimas gracias por todo. Y aunque no figure como tal también lo es, y le estoy muy agradecida por todo, Carmen. Además, ese día también conocí a todas las enfermeras y auxiliares, en especial Lolilla, Maribel, Luisa, y Mara, que hacen fácil el día a día, con una alegría contagiosa, y mucho, mucho cariño. Y a Inma, con una frase que nunca olvidaré, y que se ha hecho realidad gracias y gracias a todas ellas, y es que sólo dice “verdades como puños”. Una relación muy especial, porque ella es muy especial, siempre atenta, y enseñándome, no puedo estar más agradecida. En Almería, mi tierra, terminé de conocer a quiénes hoy son mis AMIGAS (Paqui, María, Esther, Ana, Rakel) y mi familia malagueña. No está pagado salir del trabajo con una sonrisa, de verdad, y mantenerla fuera de él gracias a ellas. Esther, suavizó lo más impactante de la residencia, desde el principio me ofreció su ayuda e hizo fácil mi primera y su última guardia. María, un abrazo suyo lo arregla todo. Rakel, su energía, sus momentos de risas y su gran personalidad, sólo pueden hacerte empezar bien cualquier mañana. ¿Y qué decir de Paqui? Qué gran amiga, qué gran profesora, qué gran artista, que gran todo! Sin ella no habría sido posible, y no hay mayor verdad. Cuántos momentos compartidos que deseo no hayan hecho nada más que comenzar, y cuánto me aguanta, siempre con buenos consejos, que no es fácil. GRACIAS con mayúsculas. De un poco más lejos tuvo que venir la última “patica” que ha sabido complementarnos desde el minuto cero, Jonhatan, eres tan especial!!!! No sólo te debo un baile, amigo.

En este camino, Miguel tiene un papel muy importante, muchas gracias por toda la confianza depositada en mí, siempre mirando por promocionarme y hacerme aprender cosas interesantes que mi ojo sólo no ve, y sin el que nada habría sido lo que es.

La llegada al laboratorio fue uno de los grandes momentos de esta andadura, el pilar maestro que lo sustenta todo, Lina, ¡un millón de GRACIAS desde el principio! Me has sabido guiar, corregir incansablemente, y solucionar siempre todas las cosas y todas las dudas, que han sido demasiadas, con la mejor de las sonrisas. Aquí tuve el placer de conocer y ser ayudada por tantas personas que no quiero olvidar a nadie, pero he de destacar a Ana, además amiga, con sus sabias explicaciones, a Miguel por todo lo compartido, Adri, Tahía, Mari Carmen, Kike, Jose, Pablo, y las mejores incorporaciones de Maria José, y Francis. ¡gracias!

¿Quién iba a decir dónde me llevaría el melocotón? Tan sabiamente, como son, mis abuelos me han sabido cuidar aquí y desde el cielo, desde que nací, con él. Abuelita, tenemos un trato, por favor no lo olvides nunca. Y es que mi familia es tan grande como su corazón. Han sabido perdonarme todos

los momentos importantes que me he perdido por perseguir mis objetivos, aún cuándo ellos siempre han estado ahí en los míos, y me han apoyado incansablemente como sólo ellos saben, ¡os quiero tanto!. Las “nuevas incorporaciones” a la familia, mis ahijados Marcos y Paula, han permitido que sea la súper Tita más feliz del mundo, y me han ayudado a superar los momentos de flaqueza. Junto a ellos, mis amigos “de siempre”, con sus mensajes de ánimo a pesar de la distancia y en cualquier circunstancia. Muchas gracias en especial a Úrsula (my sister), Pino, Antonio, y Lola.

Y por último y por ello más importante, tú, Juan Ramón, comprendiendo hasta sin palabras, sacrificándote hasta infinitas veces más que yo, siendo a la vez amigo, profesor, y amor. Eres en quién me apoyo, y en quien confío. Sin toda la ayuda que siempre me das nada podría haber sido, y aún así ahí sigues. GRACIAS.

a Tí



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CERTIFICADOS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1.- Alergia alimentaria	43
1.1. Conceptos	43
1.2. Epidemiología	46
1.2.1. Factores de riesgo	46
1.3. Fisiopatología	49
1.3.1. Mecanismo de reacción alérgica mediada por IgE	49
1.3.1.1. Características fenotípicas y funcionales de Treg	52
1.3.2. Mecanismo patológico en el tracto gastrointestinal	55
1.4. Clínica	58
1.4.1. Síntomas cutáneos	58
1.4.2. Síntomas respiratorios	60
1.4.3. Síntomas gastrointestinales	60
1.4.4. Síndrome de alergia oral	61
1.4.5. Afectación multiorgánica	62
2.- Alergia a alimentos de origen vegetal mediada por IgE	65
2.1. Características de las proteínas alergénicas	65
2.1.1. Características físico-químicas	65
2.1.2. Panalérgenos	68
2.2. Alérgenos implicados	68
2.2.1. Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras	69
2.2.2. Proteínas de reserva	70
2.2.3. Proteínas de defensa	73
2.3. Epidemiología de alérgenos de origen vegetal	78
2.3.1. Frutas	78
2.3.2. Hortalizas	79
2.3.3. Frutos secos	80
2.3.4. Legumbres	81
2.3.5. Semillas	82
2.3.6. Cereales	83
2.4. Síndromes de reactividad cruzada	84
2.4.1. Síndrome LTP	84
2.4.2. Síndrome abedul-alimentos vegetales	86
2.4.3. Síndrome apio-artemisa-especias	87
2.4.4. Síndrome profilinas-frutas-tomate	87
2.4.5. Síndrome látex-frutas	87

2.4.6. Otros síndromes	88
2.5. Diagnóstico	90
2.5.1. Historia clínica	91
2.5.2. Pruebas cutáneas	94
2.5.3. Determinación de IgE específica	97
2.5.4. Test de activación de basófilos	100
2.5.5. Pruebas de provocación a doble ciego controlada con placebo	102
2.6. Historia natural	106
2.7. Tratamiento	109
2.7.1. Evitación	109
2.7.2. Tratamiento sintomático	110
2.7.3. Tratamiento inmunomodulador	112
2.7.3.1. Inmunoterapia subcutánea	113
2.7.3.2. Inmunoterapia oral	114
2.7.3.3. Inmunoterapia sublingual	115
2.7.4. Mecanismo inmunológico implicado en la inmunoterapia específica a alérgenos alimentarios	117
JUSTIFICACIÓN	123
OBJETIVOS	127
MATERIAL Y MÉTODOS	131
1.- Diseño del estudio	131
2.- Ámbito de estudio	131
3.- Grupos de estudio	132
3.1. Grupo tratado con ITSL-Pru p 3	133
3.1.1. Alérgicos a cacahuete (Grupo A)	133
3.1.2. Sensibilizados a cacahuete (Grupo B)	133
3.1.3. No sensibilizados no alérgicos a cacahuete (Grupo C)	133
3.2. Grupo no tratado con ITSL-Pru p 3	133
4.- Normas éticas	134
5.- Descripción de la inmunoterapia	134
5.1. Vía y forma de administración	135
5.2. Calendario de dosis	135
6.- Metodología de técnicas y pruebas de estudio	136
6.1. Estudio alérgico <i>in vivo</i>	136
6.1.1. Historia clínica	136
6.1.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas con aeroalérgenos, y extractos de alimentos	138
6.1.3. Provocación oral a doble ciego controlada con placebo (PPDCCP)	140
6.2. Estudio <i>in vitro</i>	143
6.2.1. Obtención y procesamiento de muestras	143
6.2.2. Determinación humoral de IgE e IgG4 específica (ImmunoCap)	146
6.2.3. Estudio celular por el test de activación de basófilos	149
6.2.4. Estudio celular a través de células dendríticas y	152

subpoblaciones de linfocitos	
6.2.4.1. Obtención de células dendríticas inmaduras	153
6.2.4.2. Fenotipado y maduración de CD	154
6.2.4.3. Fenotipado de subpoblaciones de linfocitos	154
6.2.4.4. Estudios de proliferación a través de marcaje con CFSE	156
5.- Variables de estudio y análisis estadístico	158
5.1. Variables relacionadas con el paciente	158
5.2. Variables relacionadas con cada uno de los episodios	158
5.3. Variables relacionadas con los métodos diagnósticos	158
5.3.1. <i>In vivo</i>	158
5.3.2. <i>In vitro</i>	159
RESULTADOS	163
1.- Características clínicas y demográficas	164
1.1. Pacientes tratados con ITSL-Pru p 3	164
1.2. Pacientes no tratados con ITSL-Pru p 3	169
1.3. Pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, en relación a cacahuete	172
1.3.1. Grupo A	172
1.3.2. Grupo B	174
1.3.3. Grupo C	175
2.- Respuesta clínica	176
2.1. Prueba cutánea intraepidérmica	177
2.1.1. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica en melocotón	177
2.1.2. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica en relación a cacahuete	178
2.1.2.1. Grupo A	178
2.1.2.2. Grupo B	179
2.1.2.3. Grupo C	179
2.2. PPDCCP	180
2.2.1. Cambios en tolerancia con melocotón	180
2.2.2. Cambios en tolerancia en relación a cacahuete	184
2.2.2.1. Grupo A	184
2.2.2.2. Grupo B	186
2.2.2.3. Grupo C	186
3.- Evaluación de la seguridad	187
4.- Respuesta humoral	188
4.1. ImmunoCAP para IgE, IgG4	188
4.1.1. Cambios en las características IgE	188
4.1.2. Cambios en las características IgG4 secuenciales	189
4.1.3. Cambios en las características IgG4/IgE secuenciales	189
4.2. ImmunoCAP para IgE, IgG4, en relación a la reactividad a cacahuete	190
4.2.1. Cambios en las características de IgE secuenciales en grupos A, B, y C	190
4.2.2. Cambios en las características de IgG4 secuenciales en grupos A, B y C	192

4.2.3. Cambios en las características de IgG4/gE secuenciales en grupos A, B, y C	193
5.- Respuesta celular	194
5.1. Test de activación de basófilos (BAT)	194
5.1.1. Análisis de la concentración óptima mediante curvas dosis-respuesta	194
5.1.2. Análisis de la reactividad del basófilo	195
5.2. Cambios en las características fenotípicas	197
5.2.1. Células dendríticas	197
5.2.1.1. Características fenotípicas a nivel basal	197
5.2.1.2. Cambios en la maduración de las CD durante 1 año de ITSL-Pru p 3	198
5.2.2. Cambios en las subpoblaciones de linfocitos (Th1/Th2/Th9/Treg/NK/B) durante 1 año de ITSL-Pru p 3	200
5.2.2.1. Características fenotípicas a nivel basal	200
5.2.2.2. Cambios de las características fenotípicas secuenciales	201
5.3. Cambios en la respuesta proliferativa específica a Pru p 3 de las subpoblaciones linfocitarias (Th1/Th2/Th9/Treg/NK/B)	203
5.3.1. Proliferación basal	204
5.3.2. Análisis de los cambios en la respuesta proliferativa específica	206
DISCUSIÓN	211
CONCLUSIONES	225
ANEXOS	229
BIBLIOGRAFÍA	259

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Clasificación fenotípica y funcional de las células Treg.

Tabla 2. Clasificación por Brown de las reacciones sistémicas.

Tabla 3. Contraindicaciones relativas al uso de adrenalina en el tratamiento de una reacción alérgica sistémica.

Tabla 4. Tabla resumen estudios hasta la fecha de ITSL con alimentos.

Tabla 5. Tabla con la pauta de administración de dosis de ITSL-Pru p 3, y total de μg .

Tabla 6. Batería de alérgenos testados para prueba cutánea intraepidérmica.

Tabla 7. Tabla donde se describe la cantidad de melocotón tolerada tiempo 0, el tipo de reacción presentada y el tratamiento recibido de los pacientes incluidos a recibir ITSL-Pru p 3.

Tabla 8. Se describe la cantidad de melocotón tolerada a tiempo 0, el tipo de reacción presentada y el tratamiento recibido de los pacientes incluidos a no recibir ITSL-Pru p 3.

Tabla 9. Tabla con la cantidad total tolerada de cada paciente del grupo ITSL-Pru p 3, a los 12 meses de tratamiento, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio y a T12.

Tabla 10. Tabla con la cantidad total tolerada de cada paciente del grupo no ITSL-Pru p 3, a los 12 meses de tratamiento, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio y a T(12).

Tabla 11. Cantidad total acumulada de cacahuete tolerada en cada paciente del grupo A, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio (T(0) y a T(12)).

Tabla 12. Muestra el número (N) y porcentaje (%) de reacciones adversas durante el año de tratamiento con ITSL-Pru p 3. Se recoge la necesidad de tratamiento y la clasificación de los síntomas presentados.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Clasificación de hipersensibilidad a alimentos de la EAACI y la WAO 2003.

Figura 2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad por Gell y Coombs.

Figura 3. Representación de la presentación de Ag por las CD a las células T vírgenes y otros factores de la respuesta innata que inducen a las células T a la producción de interleucinas y a diferenciarse en los distintos tipos: Th1, Th2, Th9, Th17, y sus funciones.

Figura 4. Presentación de antígeno del linfocito B a linfocito T por unión al receptor tipo Toll, y moléculas coestimuladoras.

Figura 5. Mecanismos de tolerancia oral. **(A)** Inmunidad, en el que se requiere unión del receptor T (TCR) al complejo mayor de histocompatibilidad en presencia de citoquinas y moléculas coestimuladoras. **(B)** Baja dosis, mecanismo dirigido por las Treg. Respuesta inmune de supresión a través citoquinas o asociadas a la superficie de membrana, como IL-4, IL-10, y TGF- β . **(C)** Alta dosis, mediado por anergia a través del ligando del receptor de la célula T en ausencia de señales coestimuladoras; o delección clonal del linfocito por apoptosis mediada por el ligando FAS (CD95L).

Figura 6. Mecanismos de absorción intestinal. **(A)** Envío de prolongaciones por parte de las CD a la luz intestinal. **(B)** Células M captan Ags particulados y los mandan a las CD subepiteliales, que están próximas a las Placas de Peyer. **(C)** Antígenos solubles pasan a través del epitelio hasta llegar directamente al capilar; ser presentados por las CEI a las células T; o captados por los macrófagos de la lámina propia para dirigirse al ganglio linfático.

Figura 7. Imágenes de lesiones de urticaria y angioedema.

Figura 8. Imágenes de endoscopia digestiva que muestra la “traqueización del esófago (imagen de la izquierda), y de biopsia de esófago con tinción de eosina donde se observan >20 Eo por campo (imagen de la derecha).

Figura 9. Representación de las fases de sensibilización primaria y efectora con los cambios a nivel celular y citoquinas principales que intervienen, así como los órganos y sistemas posibles afectados.

Figura 10. Clasificación proteínas vegetales según su función.

Figura 11. Estructura tridimensional Profilina del abedul Bet v 2

Figura 12. Estructura tridimensional de Albúmina 2S de la semilla de colza.

Figura 13. Estructura tridimensional de vicilina de soja.

Figura 14. Estructura tridimensional de heveína del látex.

Figura 15. Estructura tridimensional del polen de abedul Bet v 1.

Figura 16. Secuencia de aminoácidos alineados para alimentos, látex y pólenes pertenecientes a la familia LTP. En la columna de la derecha se indica el porcentaje de identidad respecto a Pru p 3.

Figura 17. Se muestra en verde la presunta secuencia de epítomos para IgE. Marcado sobre rectángulo las 4 alfa-hélices.

Figura 18. Alfa-hélices en verde. Puentes disulfuro en rojo. Zonas lipofóbicas en azul y lipofílicas en rojo. Modelos obtenidos de la Base de Datos de la estructura de las proteínas.

Figura 19. Representación orden taxonómico familias de frutos secos.

Figura 20. Esquema elementos para el diagnóstico alergia alimentos.

Figura 21. Posibles factores influyen en el desarrollo de la reacción.

Figura 22. Técnica de realización de prueba intraepidérmica y lectura del habón posterior.

Figura 23. Técnica Prick by Prick.

Figura 24. Equipamiento, procedimiento, y ejemplo de lectura de técnica Microarray.

Figura 25. Representación técnica BAT.

Figura 26. Ejemplo de validación receta para provocación doble ciego (izquierda). Y de aumento de dosis enmascaradas progresivas (derecha).

Figura 27. Escala visual analógica para el prurito.

Figura 28. Representación del balance de células Th2 y Treg, y efectos por la IT (representado en naranja).

Figura 29. Regulación inmune durante la IT

Figura 30. Representación adaptada de Nouri-Aria y cols. (1), del aumento de IgG4 en pacientes tratados con IT específica con polen de gramíneas.

Figura 31. Esquema síntomas subjetivos.

Figura 32. Distribución de las células sanguíneas en un gradiente de densidad continuo.

Figura 33. Procesamiento de las muestras. Obtención de la fracción mononuclear (PBMC).

Figura 34. Columna magnética Miltenyi MACS para aislamiento de subpoblaciones celulares.

Figura 35. Equipamiento UniCap.

Figura 36. Fundamentos del Test de activación de basófilos.

Figura 37. Separación de linfocitos (LI), monocitos ($M\emptyset$), y obtención de CDmo a partir de las PBMC.

Figura 38. (A) Imagen de una molécula de CFSE. (B) División celular marcada con CFSE de forma que el colorante se distribuye en las células hijas (G-1), y así sucesivamente (G-2).

Figura 39. Pacientes estudiados (N%) según el tiempo entre la reacción y el estudio.

Figura 40. Total de pacientes que participan en el estudio. N tratados y no tratados.

Figura 41. Perfil de sensibilización a pólenes en los pacientes que van a recibir ITSL-Pru p 3

Figura 42. N(%) pacientes con síntomas por inhalación de polen.

Figura 43. Perfiles de sensibilización a otros alimentos vegetales (frutos secos) en los pacientes del grupo ITSL-Pru p 3.

Figura 44. Perfiles de sensibilización a otros alimentos vegetales en los pacientes del grupo ITSL-Pru p 3.

Figura 45. Clasificación de los pacientes grupo ITSL-Pru p 3 en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia T0, según Brown, en %.

Figura 46. Perfil de sensibilización a pólenes en los pacientes que no van a recibir ITSL-Pru p 3.

Figura 47. N(%) pacientes sin ITSL-Pru p 3 con síntomas por inhalación de polen.

Figura 48. Perfiles de sensibilización a otros alimentos vegetales (frutos secos) en los pacientes del grupo no ITSL-Pru p 3.

Figura 49. Perfiles de sensibilización a otros alimentos vegetales en los pacientes del grupo no ITSL-Pru p 3.

Figura 50. Clasificación de los pacientes grupo no ITSL-Pru p 3, en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia T0, según Brown, en %.

Figura 51. N(%) pacientes grupo A con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

Figura 52. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo A en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0. **A)** En relación a la PPDCCP con cacahuete. **B)** En relación a la PPDCCP melocotón.

Figura 53. N(%) pacientes grupo B con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

Figura 54. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo B en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0, en relación a la PPDCCP con melocotón.

Figura 55. N(%) pacientes grupo C con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

Figura 56. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo C en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0, en relación a la PPDCCP con melocotón.

Figura 57. Diagrama de los pacientes seleccionados para el estudio inicial y al año.

Figura 58. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica medida por planimetría del tamaño del habón al inicio y tras un año de ITSL-Pru p 3.

Figura 59. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica medida por planimetría del tamaño del habón al inicio y tras un año de seguimiento en el grupo no ITSL-Pru p 3.

Figura 60. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 y cacahuete en el Grupo A (mm²).

Figura 61. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 en el Grupo B (mm²).

Figura 62. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 en el Grupo C (mm²).

Figura 63. Diagrama de los pacientes seleccionados para el estudio inicial y al año, y resultados tras PPDCCP.

Figura 64. Gráfica con la cantidad de melocotón tolerada a los 12 meses de ITSL-Pru p 3.

Figura 65. Gráfica con la cantidad de melocotón tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo sin ITSL-Pru p 3.

Figura 66. Cambios en la cantidad de melocotón y cacahuete tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo A.

Figura 67. Cambios en la cantidad de melocotón tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo B.

Figura 68. Cambios en la cantidad de melocotón tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo C.

Figura 69. Comparación de los cambios en IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 (izquierda) y en el grupo No tratado (derecha).

Figura 70. Comparación de los cambios de IgG4e para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 (izquierda) y en el grupo no tratado (derecha).

Figura 71. Comparación de los cambios en la proporción IgG4/IgE para Pru p 3 y Ara h 9 durante los 12 meses de seguimiento en el grupo ITSL-Prup 3 (izquierda) y no ITSL-Pru p 3 (derecha).

Figura 72. Comparación de los cambios de IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 en el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

Figura 73. Comparación de los cambios en IgG4e para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 para el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

Figura 74. Comparación de los cambios en IgG4e/IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 para el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

Figura 75. Curva dosis-respuesta con concentraciones seriadas de ($\mu\text{g/mL}$) de Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón (N=5) y no sensibilizados-contrroles (N=5), para el test de activación de basófilos.

Figura 76. Curva dosis-respuesta con concentraciones seriadas de ($\mu\text{g/mL}$) de Ara h 9 en pacientes alérgicos a melocotón (N=5) y no sensibilizados-contrroles (N=5), para el test de activación de basófilos.

Figura 77. Cambios en BAT en grupo tratados y no tratados durante 1 año para Pru p 3 y Ara h 9.

Figura 78. Cambios en BAT en grupos A-C tratados con ITSL-Pru p 3 durante 1 año, para Pru p 3 y Ara h 9, según % células CD63⁺.

Figura 79. Resultados de maduración CD a nivel basal en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CD80, CD86, CCR/, CD40, y CD83.

Figura 80. Resultados de maduración CD a distintos tiempos (basal, 1mes, 6 meses, y 12 meses) en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CD80 y CD86.

Figura 81. Resultados de maduración CD secuencial (basal, 1mes, 6 meses, y 12 meses) en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CCR7, CD40 y CD83.

Figura 82. Fenotipo expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2, Th9, NK, Cél. Plasmáticas, y Treg) previo al inicio de ITSL-Pru p 3 en el grupo de pacientes que van o no a recibir el tratamiento, y sujetos tolerantes a melocotón.

Figura 83. Fenotipo secuencial (basal, un mes, 6 meses y a los 12 meses), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2, Th9) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

Figura 84. Fenotipo secuencial (basal, un mes, 6 meses y 12 meses), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (NK^{Bright} y NK^{Dim}) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

Figura 85. Fenotipo secuencial (basal, T(1), T(6), T(12)), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Células Plasmáticas, y Treg) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

Figura 86. Análisis de la proliferación de subpoblaciones linfocitarias (Th2, Th9, Th1), expresado en IP en estado basal frente a Pru p 3, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados a melocotón.

Figura 87. Análisis de la proliferación (IP) frente a Pru p 3, de subpoblaciones linfocitarias (NK^{Bright}, NK^{Dim}) en estado basal, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados a melocotón.

Figura 88. Análisis de la proliferación (IP) frente a Pru p 3, en las CP y Treg a nivel basal, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

Figura 89. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, en las subpoblaciones de linfocitos Th2, Th9, Th1, para los grupos de pacientes que van o no recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

Figura 90. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, para los NK^{Bright} y NK^{Dim}, en los grupos de pacientes que van a recibir o no ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

Figura 91. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, para las CP y Treg, en los grupos de pacientes que van a recibir o no ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

AAAAI: Academia Americana de Alergia, Asma, e Inmunología (del inglés, *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*).

Ac: Anticuerpo

Act c 1: kiwi (del latín, *Actidinia chinensis*)

Ag: Antígeno

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

Amb a 6: ambrosía (del latín, *Ambrosia artemisifolia*)

Ana c 1: piña (del latín, *Ananas comosus*)

Ana o 3: anacardo (del latín, *Anacardium occidentale*)

Antihistamínicos-H1: receptor de histamina tipo 1

Antihistamínicos-H2: receptor de histamina tipo 2

Api g 4: apio (del latín, *Apium graveolens*)

Ara h 6: cacahuete (del latín, *Arachis hiipogea*)

Art v 3: polen de artemisa (del latín, *Artemisia vulgaris*)

Asp o 1: espárrago (del latín, *Asparagus officinalis*)

Ba: Basófilo

BAT: test de activación de basófilos (del inglés, *Basophil Activation Test*)

Ber e 1: nuez de Brasil (del latín, *Bertolletia excelsa*)

Bet v 3: polen de abedul (del latín, *Betula verrucosa*)

Bra o 3: repollo (del latín, *Brassica oleacea*)

Bra r 1: nabos (del latín, *Brassica rapa*)

°C: grados centígrados

Cap a 2: pimiento (del latín, *Capsicum annuum*)

Car i 1: nuez pecana (del latín, *Caria illinoensis*)

Cas s 5: castaña (del latín, *Castanea sativa*)

CCD: Determinantes de carbohidratos con reactividad cruzada (del inglés, *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*)

CD: Cluster of differentiation

CD: células dendríticas

CD95L: ligando para FAS

CDim: Células dendríticas inmaduras

CEI: células del epitelio intestinal

CEI: Comité de ética de la investigación

Células M: enterocitos especializados sin borde en cepillos

CFSE: 5,6-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidyl ester

Cic a: garbanzo (del latín, *Cicer arietinum*)

Cit l 3: limón (del latín, *Citrus limon*)

Cit r 3: mandarina (del latín *Citrus reticulata*)

Cit s 2: naranja (del latín, *Citrus sinensis*)

Cm: centímetros

cm³: centímetros cúbicos

CMP: proteínas de la leche de vaca (del inglés, *Cow Milk Proteins*)

Co.: *Compañía*

CO₂: dióxido de carbono

Cols.: Colaboradores

Cor a 2: avellana (del latín, *Corylus avellana*)

CPA: Célula presentadora de Antígeno

CTLA-4: antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*)

Cu+2: ión cobre

Cuc m 2: melón (del latín, *Cucumis melón*)

Cys-Cys: Resíduos de Cisteína

Dau c 4: zanahoria (del latín, *Daucus carota*)

DCCP: doble ciego controlado con placebo

Der p 1: ácaro del polvo doméstico (del latín, *Dermatophagoides pteronissimus*)

DMSO: dimetilsulfóxido

EAACI: Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (*del inglés, European Academy of Allergy and Clinical Immunology*)

ECF-A: factor quimiotáctico del eosinófilo para la anafilaxia (del inglés, *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis*)

ECP: proteína catiónica del eosinófilo (del inglés, *Eosinophil Cationic Protein*)

EDTA: ácido etilen-diamino-Tetra-Acético

ELISA: enzimoimmunoensayo (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

EMA: agencia europea del medicamento (del inglés *European Medicines Agency*)

Eo: Eosinófilo

EVA: escala visual analógica

Fab: fragmentos de unión al antígeno

Fc ϵ RI: receptor de alta afinidad para la fracción FC de la IgE

Fc ϵ RII: receptor de baja afinidad para la fracción FC de la IgE

FEV1: Volumen Espiración Máxima

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FLA2: proteína Fosfolipasa A2

fMLP: péptido quimiotáctico N-Formil-Met-Leu-Phe

Foxp3: factores de transcripción de la familia de proteínas *forkhead*

Fra a 4: fresa (del latín, *Fragaria ananassa*)

FPIES: síndrome de Enterocolitis inducida por proteínas (del inglés, *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome*)

FSC: tamaño celular (Forward scatter celular)

g: gramos

GALT: tejido linfoide asociado a mucosas del sistema gastrointestinal.

GITR: receptor de la familia del TNF inducido por glucocorticoides (del inglés, *Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor-related gene*)

GLP: similar a germinas (del inglés, *Germin-Like Protein*)

Gly m 5: soja (del latín, *Glycine max*)

GM-CSF: factor estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (del inglés, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

Hel a 3: semilla de girasol (del latín *Helianthus annuus*)

Hev b 6.01: látex (del latín, *Hevea brasiliensis*)

HLA: haplotipos del antígeno leucocitario humano (del inglés *Human leukocyte Antigen*)

Hor v: cebada (del latín, *Hordeum vulgare*)

HRUM: Hospital Regional Universitario de Málaga

HTA: Hipertensión arterial

I¹²⁵: yodo marcado radioactivamente

IBIMA: Instituto de Investigación Biomédica de Málaga

IE: índice de estimulación

IECA: inhibidor del enzima convertidor de angiotensina

IgA: Inmunoglobulina tipo A

IgE: Inmunoglobulina tipo E

IgG4: Inmunoglobulina tipo G-4

IL: Interleuquina

IL-2R: Receptor para la IL-2

IFN- γ : interferón gamma

IM: índice de maduración

IMAO: inhibidor de la monoaminoxidasa

IQR: rangos intercuartílicos

IT: Inmunoterapia

ITO: Inmunoterapia oral

ITSC: Inmunoterapia subcutánea

ITSL: Inmunoterapia sublingual

ITSL-Pru p 3: inmunoterapia específica sublingual con extracto enriquecido en Pru p 3

iv: intravenoso

Jug r 1: nuez de nogal (del latín *Junglan regia*)

KDa: KiloDalton

kU/L: KiloUnidades/Litro

LAG-3: gen de activación de linfocitos (del inglés, *Lymphocyte-Activation Gene-3*)

Lac s 1: lechuga (del latín, *Lactuca sativa*)

LEAP: aprendizaje temprano acerca de alergia cacahuete (del inglés, *Learning Early About Peanut allergy*)

Len c 2: lenteja (del latín, *Lens culinaris*)

LOAEL: nivel mínimo observable a partir del cuál se desencadena una reacción (del inglés, *Low Observable Adverse Event Level*)

LPS: lipopolisacárido

LT: linfocito T

LT: Leucotrienos

LTP: proteína de transferencia de lípidos (del inglés, *Lipid Transfer Protein*)

M: Molar

Mal d 1: manzana (del latín, *Malus domestica*)

MALT: sistema inmunitario asociado a mucosas (del inglés, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)

Ma: Mastocito

MC: medio completo

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*)

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II

µg: microgramos

mg/mL: miligramos/mililitros

Mor n 3: mora (del latín, *Morus nigra*)

Mm: milímetros

Mus a 1: plátano (del latín, *Musa acuminata*)

ng: nanogramos

NIAID: Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (del inglés, *National Institute Allergic and Infectious Diseases*)

NK: Linfocito T *Natural Killer*

NOAEL: nivel mínimo observable a partir del cuál no se encuentra reacción (del inglés, *Non Observable Adverse Event Level*)

NORA: estudio Europeo con datos de una red de reacciones alérgicas graves (del inglés, *First European data from the network of severe allergic reactions*)

nsLTP: Lipid Transfer Protein no específica (del inglés, no specific)

Ole e 1: polen de olivo (del latín, *Olea europea*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

Ory s: arroz (del latín, *Oryza sativa*)

PAF: factor activador plaquetario (del inglés, *Platelet-Activating Factor*)

Par j 2: polen de parietaria (del latín, *Parietaria judaica*)

PBMC: fracción mononuclear (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: Tampón Fosfato salino (del inglés, phosphate buffer saline)

PE: ficoeritrina

Pers a 1: aguacate (del latín, *Persea americana*)

Pha v 3: judías verdes (del latín, *Phaseolus vulgaris*)

Phl p 7: polen de gramíneas (del latín, *Phleum pratensis*)

Pis v 1: pistacho (del latín, *Pistachia vera*)

Pla a 3: platanero de sombra (del latín, *Platanus acerifolia*)

PPDCCP: Pruebas de provocación a doble ciego controlada con placebo

PR: proteínas de defensa (PR, del inglés *Pathogenesis-Related proteins*)

Pru ar 3: albaricoque (del latín, *Prunus armeniaca*)

Pru av 4: cereza (del latín, *Prunus avium*)

Pru d 3: ciruela (del latín *Prunus domestica*)

Pru du 3: almendra (del latín *Prunus dulcis*)

Pru p 3: Género *Prunus*, especie *persica*, y el número de orden con el que fue descubierto 3.

Pun g 1: granada (del latín, *Punica granatum*)

p/v: peso/volumen

Pyr c 4: pera (del latín, *Pyrus communis*)

Q-50: cuestionario de calidad de vida

RAST: prueba de radio alergo absorción (del inglés, *Radio-Allergo-Sorbent Test*).

RCSB Protein Data Bank: Estructura bioinformática de colaboración para la investigación de la estructura (del inglés: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)

RD: Real Decreto

rhIL-3: Interleuquina tipo 3 recombinante humana

ROC: *Receiver Operating Characteristic*.

RP40: medio *Roswell Park*

Rpm: revoluciones por minuto

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

rPru p 3: alérgeno recombinante Pru p 3

S: Svedbergs

S.A.: Sociedad Anónima

SAO: síndrome de alergia oral

SBF: suero bovino fetal

SEAIC: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

Ses i 4: sésamo (del latín, *Sesamun indicum*)

SI: índice de estimulación (del inglés *Stimulation Index*)

Sin a 1: mostaza (del latín, *Sinapis alba*)

Sola l 3: tomate (del latín, *Solanum lycopersicum*)

Sola t 2: patata (del latín, *solanum tuberosum*)

SSC: granularidad celular (side scatter celular)

STAT6: polimorfismo del gen (del inglés, *signal transducer and activator of transcription-6*)

TCR: receptor tipo Toll (del inglés *T Cell Receptor*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante-beta (del inglés, *Transforming Growth Factor-beta*)

Th: Linfocito T colaborador (del inglés, *Helper*)

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumour Necrosis Factor-alfa*),

Treg: Células T reguladoras

Tri a 36: trigo (del latín, *Triticum aestivum*)

TSLP: limfopoyetina del estroma tímico (del inglés, *Thymic stromal lymphopietin*)

TTL: Test de transformación linfocitaria

UGC: Unidad de Gestión Clínica

UI: Unidad Internacional

UK: Reino Unido (*United Kingdom*)

Vit v 1: uva (del latín *Vitis hipogea*)

VPN: valor predictivo negativo

WAO: Comité de la Organización Mundial de Alergia (del inglés, *World Allergy Organisation*)

Zea m 14: maíz (del latín, *Zea mays*)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.- ALERGIA ALIMENTARIA

1.1. Conceptos

En los últimos 50 años, se ha producido un aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas, que ha alcanzado proporciones epidémicas, así como un aumento del número de hospitalizaciones (2), como ha sido demostrado en estudios poblacionales longitudinales (3).

El término alergia a los alimentos se refiere a una respuesta inmunológica específica dirigida frente a un alimento, que ocurre de forma reproducible tras exposición a dicho alimento. En estos años se ha avanzado para promover una terminología común, dada la gran confusión que existía en torno al concepto de alergia y específicamente alimentaria. La creación de una nomenclatura sistemática idea del Dr David Marsh en 1970, junto a la primera definición de alérgeno mayoritario (o mayor) y alérgeno minoritario (o menor), sentaron las bases de la nomenclatura actual para la clasificación y designación de los alérgenos (4). En ella se diferencian los alérgenos del extracto completo de la fuente alérgica según la frecuencia con la que se detecta inmunoglobulina E (IgE) específica frente a los mismos en la población de pacientes sensibilizados. En este sentido, se definen como “alérgenos mayoritarios” aquellos en los que se detecta unión a IgE específica con una frecuencia superior al 50%, y “alérgenos minoritarios” los que producen IgE con niveles de detección por debajo del 50% (5). En 1984, el Comité de Reacciones Adversas a Alimentos de la Academia Americana de Alergia e Inmunología Clínica (AAAAI, del inglés *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*) y el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID, del inglés *National Institute Allergic and Infectious Diseases*) (6) publicaron el “Manual de Reacciones Adversas a Alimentos” (7), que fue posteriormente modificado en 1995 por el Subcomité de Reacciones Adversas a Alimentos de la *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) (8). En este documento se define a la reacción adversa a alimentos como cualquier reacción anómala producida por la ingestión de un alimento. Estas reacciones han sido clasificadas en base a los mecanismos implicados como: tóxicas, las que pueden afectar a cualquier individuo cuando se administra a una dosis suficiente; y no tóxicas, o dependientes de la susceptibilidad individual, que pueden así mismo ser mediadas por mecanismos tanto inmunológicos o alérgicos como no inmunológicos o de intolerancia. En la nomenclatura revisada en 2001 se propuso la definición de hipersensibilidad a alimentos como cualquier reacción adversa a alimentos (9) (Figura 1), que incluye:

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

i) Alergia a alimentos mediadas por mecanismos inmunológicos, subdivididos en mediadas por IgE, o no mediadas por IgE. Éstas últimas se caracterizan por la no existencia de anticuerpos IgE específicos frente al alimento y por tanto no se puede confirmar por pruebas *in vivo/vitro*, ni pruebas de provocación, ni existe clínica que se correlacione con un mecanismo IgE. Pueden afectar a cualquier individuo susceptible, generalmente son de inicio tardío (más de 2 horas tras la ingesta del alimento), afectación tipo gastrointestinal, y que no ceden tras tratamiento con antihistamínicos o adrenalina.

ii) Reacción adversa no inmunológica a alimentos. Son reacciones no mediadas por mecanismos inmunológicos, producidas por déficits enzimáticos o sustancias vasoactivas presentes de forma natural en algunos alimentos.

Esta clasificación fue refrendada en 2003 por el Comité de la Organización Mundial de Alergia (WAO) y modificada por la NIAID en 2010 (Figura 1) (6, 10).



Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos de la EAACI, WAO, y NIAID 2010.

A la hora de abordar la evaluación de una reacción alérgica a alimentos es importante diferenciar entre fuente, extracto y molécula alergénica:

- **Fuente** es aquel tejido o partícula, comida u organismo, inductor de alergia, como por ejemplo leche, o el ácaro del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*), de los que se obtiene el extracto crudo.

- **Extracto** es la mezcla no fraccionada de proteínas, polisacáridos, y lípidos que incluye aquellos con capacidad alergénica y no alergénica.
- **Moléculas alergénicas o alérgenos** son las moléculas (proteínas y glicoproteínas) derivadas del extracto con capacidad de ser identificadas por anticuerpos IgE específicos tanto de forma nativa, como purificada, o recombinante.

En los últimos años, el Subcomité de la Nomenclatura del Alérgeno de las Sociedades Inmunológicas de la Unión Internacional (<http://www.allergen.org>) ha realizado distintas propuestas de sistemas de clasificación de los alérgenos alimentarios, basados en su fuente de origen. Sin embargo, el sistema más natural se basaría en las propiedades que comparten los alérgenos en cuanto a su estructura y función. De esta forma se clasificarían en familias si tienen una identidad de secuencia mayor al 30%, y en superfamilias si comparten estructura y función que sugieran un origen filogenético común a pesar de tener una baja identidad de secuencia (11) (RCSB Protein Data Bank).

Como normal general, los alérgenos se nombran usando las tres primeras letras del género para la primera palabra, seguido de una única letra que identifica la especie (cuando presenta al menos el 67% de homología en la secuencia de aminoácidos), y de un número que muestra el orden cronológico en el que fue identificado (12), como por ejemplo para el alérgeno mayor del melocotón, Pru p 3, (Género *Prunus*, especie *persica*, y el número de orden con el que fue descubierto). Esto ha ayudado a la ordenación y el manejo de la gran cantidad de proteínas identificadas como alérgenos desde los años 80 (13). Por último, es importante destacar que un alérgeno primario es aquella molécula que originó la sensibilización, al contrario de la sensibilización secundaria que es debida a reactividad cruzada. En general, los alérgenos mayores son también primarios y genuinos (14).

1.2. Epidemiología

La primera vez que se publicaron datos de reacción anafiláctica debida a la ingesta de alimentos, fue en 1988 por Yunginger y cols (15). En este estudio realizado en un período de 16 meses, se incluyeron 7 casos (11 a 43 años de edad) de muerte por anafilaxia a cacahuete, nuez pecana, cangrejo y pescado, en su mayoría ocurridas por su ingestión fuera de casa sin la administración de adrenalina, en los que se demostraron niveles elevados de IgE contra el alimento causante. Desde este momento hasta nuestros días es un desafío determinar la prevalencia de la alergia alimentaria. Las dificultades que nos encontramos para su determinación son las diferencias en el diseño y tipo de estudios así como la propia definición de alergia alimentaria en cada uno de ellos. Además, hay que tener en cuenta que los estudios con cifras de prevalencia más elevadas, se centran únicamente en el análisis de los alimentos más frecuentes (16). Durante mucho tiempo se ha sobreestimado la prevalencia de las reacciones debidas a la ingesta de alimentos, estimándose en torno al 6-8% de la población pediátrica menor de 4 años de edad, y aproximadamente del 4% a partir de los 10 años, según un estudio de S. Allan Bock (17). Actualmente las cifras que se calculan son más bajas, con una incidencia en la población general en torno al 1-2% (18), en concordancia con la NIAID, y siempre menor al 10%.

Se estima que cada año entre 4-5 habitantes de cada 100.000 sufren un choque anafiláctico, con un riesgo acumulado de 0.5-2% (19). En América y Europa, los alimentos son la principal causa de anafilaxia atendidas en los servicios de emergencia, estimadas en alrededor de 30.000 reacciones, y 200 muertes por año sólo en los Estados Unidos (20), y 48 muertes en Reino Unido (21). En una revisión (22) en la que se incluyeron 117 pacientes pediátricos atendidos por sospecha de reacción alérgica en el Hospital de Melbourne, la comida fue la causante del 85% de ellas. Aunque la frecuencia de estas reacciones no es muy alta, la carga de la enfermedad es inmensa en cuanto a la reducción de la calidad de vida, no sólo para los pacientes, sino para las familias, escuelas, y comunidades. Esto se refleja en el estudio realizado por Avery y cols. donde se demuestra que la calidad de vida de los niños con alergia a cacahuete era peor que la de los que sufrían de diabetes mellitus (23).

1.2.1. Factores de riesgo:

Los factores de riesgo comunes son la presencia de asma, el desconocimiento por parte de los pacientes de haber ingerido un alimento al que eran alérgicos a pesar de haber presentado síntomas más leves previamente, el desarrollo de sintomatología en menos de 2

horas, y la presencia de frutos secos y cacahuete como los más implicados. De hecho, según Bock y cols. (24), de 63 casos evaluados con sospecha de alergia a alimentos, el 90% se debieron a dichos alimentos.

Aunque en la actualidad se han identificado como alérgenos más de 170 proteínas de los alimentos caracterizados en distintas familias, la mayor prevalencia se concentra en unos pocos grupos principales, como frutos secos, frutas, huevos, leche, y pescados-mariscos, siendo estos los responsables de alrededor del 90% de reacciones alérgicas por alimentos (6, 25).

Respecto a la edad, la alergia alimentaria es más frecuente en la infancia, donde predomina la alergia a la leche y el huevo, en los que se alcanza la tolerancia espontánea ampliamente en la edad escolar. Sin embargo, en la edad adulta emergen nuevas alergias como son los crustáceos, moluscos, y vegetales (26), y los patrones de presentación cambian, encontrándose reacciones a alimentos dentro de la misma familia en el caso de origen animal, a diferencia de la alergia a alimentos de origen vegetal que frecuentemente se presenta con manifestaciones debidas a alimentos de diversas familias (27). La prevalencia de alergia a leche de vaca, huevo, cacahuete, pescado y mariscos es de un 3% para todas las edades según un meta-análisis del programa de EuroPrevall publicado en 2007 (28), en el que se realizó una revisión en MEDLINE y EMBASE entre 1900-2005, centrándose sólo en aquellos estudios que incluyeran provocaciones a doble ciego (N=6). En EuroPrevall (29) también se revisó la prevalencia de alergia a alimentos de origen vegetal, incluyendo frutas, vegetales, legumbres, frutos secos, trigo, cereales, soja, y semillas, y encontraron que era del 0.1-4.3% para frutas y frutos secos; 0.1-1.4% para vegetales; y menor del 1% para trigo, soja, y sésamo. Otros estudios posteriores han obtenido resultados similares, como el de Venter y cols. (30) en Reino Unido, y Osterballe y cols. (31) en Dinamarca, en los que si bien encontraron, según un cuestionario, una prevalencia del 20% de reacciones adversas para alimentos no relacionados con polen, ésta bajaba al 1.7% tras pruebas de provocación. Usando los resultados serológicos de IgE de las muestras recogidas durante la Inspección Nacional de Salud y Nutrición de Estados Unidos entre 2005-2006, Liu y cols. (32) estimaron el riesgo de alergia a alimentos para leche de vaca en un 0.4%, para huevo de gallina del 0.2%, para cacahuete del 1.3%, y para gamba del 1%; siendo del 1.8% para cada uno cuando se estratifica por edad de 1 a 5 años.

Además hay que tener en cuenta que la prevalencia de reacciones a estos alimentos se ve influenciada por las diferencias geográficas atribuidas a los distintos hábitos de consumo, como en el caso del sésamo en Israel, consumido desde la infancia, y que ocupa el tercer

lugar (33); el pescado en España o Japón (34-36), las frutas y verduras en Europa (34, 37-39); el cacahuete en EEUU (40), y que ha doblado su prevalencia en los últimos 10 años; o el kiwi, una fruta cuya importancia está aumentando actualmente en nuestro país. Pero además del consumo, otros factores como el tipo de cocción (41), el contenido en grasa del procesado (42), y el grado de procesado de los alimentos también influyen en su capacidad alergénica tal y como se demuestra por ejemplo con las diferencias de alergia al cacahuete encontradas entre la población judía de Israel y Reino Unido. Así se ha observado una prevalencia significativamente menor de alergia en los niños que desde el año de edad consumen snacks de maíz hechos de mantequilla de cacahuete como ocurre en Israel, frente a los que lo introducen más tardíamente en la dieta, en menor cantidad diaria, y de forma tostada como es el caso de la población pediátrica de Reino Unido (43).

En 1992 se realizó en España un estudio epidemiológico multicéntrico denominado Alergológica 92 (34), promovido por la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), en el que a partir de los datos de más de 4.000 pacientes de consultas de alergia, se obtuvo que las frutas estaban implicadas en un 30% de los pacientes sensibilizados a alimentos siendo el grupo más frecuente en la población por encima de los 5 años de edad, estos resultados fueron posteriormente confirmados en 2009 (44).

Otro problema importante cuando se evalúan reacciones alérgicas a alimentos es la presencia de cofactores. Así la incidencia de anafilaxia inducida por el ejercicio es un fenómeno importante y cuya influencia parece estar en aumento, debido posiblemente al aumento de popularidad en la práctica de deporte durante la pasada década. Este problema es dos veces más frecuente en mujeres, y en más del 60% de los casos ocurre en menores de 30 años. En una encuesta realizada a 199 pacientes, en el 54% de los casos, la ingestión del alimento dos horas antes del ejercicio fue el factor relacionado con reacción alérgica (45).

Otros factores de riesgo epidemiológicos, como la atopia, vía de exposición, el tratamiento concomitante con antiácidos, reducción en el consumo de ácidos grasos omega-3, el riesgo genético, o la hipótesis de la higiene, entre otros, han sido analizados en distintas ocasiones, con resultados no concluyentes (46-52). Además, existe un número creciente de estudios que apoyan la idea de que una exposición a los alimentos más alergénicos tardía en la infancia puede suponer un aumento del riesgo a padecer alergia (51). Por último hay que señalar que aunque pueden haber diferencias étnicas, éstas hasta el momento no han sido suficientemente analizadas.

1.3. Fisiopatología

La alergia a alimentos se encuentra básicamente incluida dentro de las reacciones de tipo I o reacciones inmediatas humorales mediadas por IgE, de la clasificación de Gell y Coombs (53) (Figura 2). El desarrollo de alergia alimentaria se produce en varios pasos y requiere repetidas exposiciones a un determinado antígeno (fase de sensibilización).

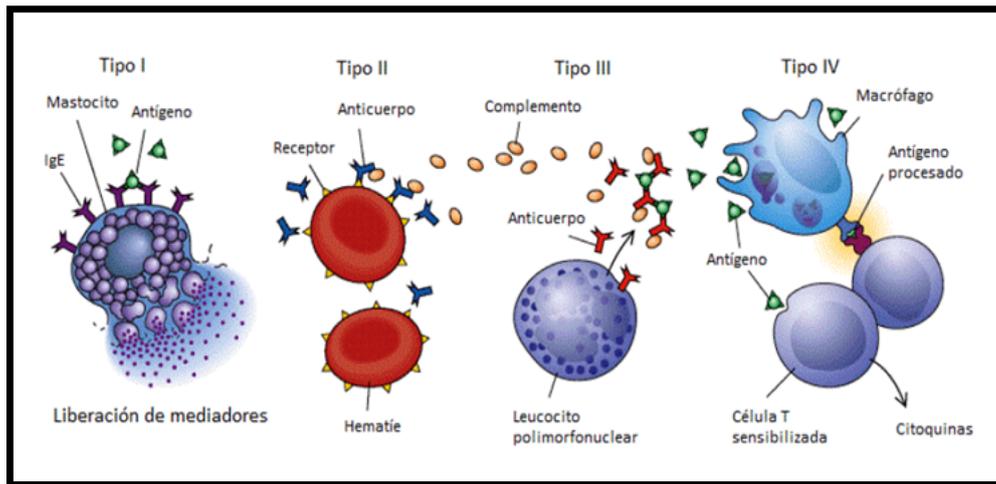


Figura 2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad por Gell y Coombs.

1.3.1. Mecanismo de reacción alérgica mediada por IgE:

Tras la absorción y procesamiento del antígeno por las células presentadoras (CPA) (células dendríticas, (CD)), éste es presentado en el entorno de una molécula mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés Major Histocompatibility Complex) a los linfocitos T vírgenes, los cuales, dependiendo de diferentes señales (moléculas coestimuladoras, citoquinas, quimiocinas,...), se pueden diferenciar en distintas subpoblaciones efectoras Th1, Th2, Th9 o Th17, que se caracterizan a su vez por el perfil de citoquinas que producen, y van a estar implicadas en diferentes respuestas inflamatorias (Figura 3). Aunque las células Th2, productoras de interleucinas (IL) IL-4, IL-5 e IL-13 (54-57), han sido clásicamente descritas como la principal población responsable en la respuesta alérgica, en los últimos años se ha descrito una nueva población de células T efectoras, Th9 que son inducidas por el factor transformador de crecimiento-beta (TGF- β , del inglés Transforming Growth Factor-beta) en presencia de IL-4 (58-60).

Algunos estudios sitúan a las CD como la CPA profesionales capaces de iniciar y dirigir la respuesta inmune (61), éstas se encuentran presentes en la lámina propia, placas de Peyer, en los ganglios mesentéricos, e intercaladas entre las células del epitelio intestinal (CEI), enviando prolongaciones a la luz intestinal para rastrear el paso de antígenos (62) y poder así procesarlos y presentarlos a las células T vírgenes. En un estado inflamatorio expresan gran cantidad de moléculas coestimuladoras CD80/86, y condicionadas por las CEI pueden liberar IL-4, e IL-6, y no IL-12, promocionando así una respuesta Th2 (63), que a su vez induce un cambio de isotipo en las células B hacia la producción de IgE específica (64).

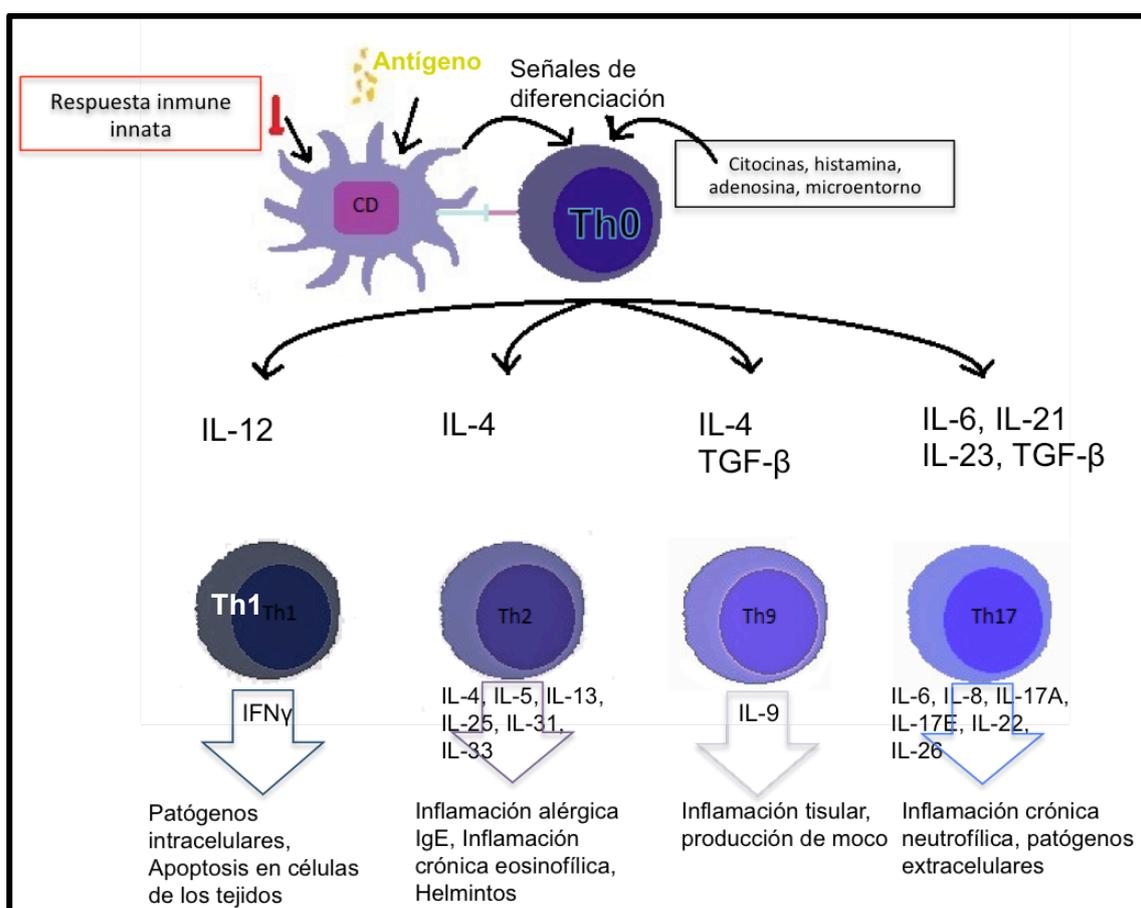


Figura 3. Representación de la presentación de Ag por las CD a las células T vírgenes y otros factores de la respuesta innata que inducen a las células T a la producción de interleucinas y a diferenciarse en los distintos tipos: Th1, Th2, Th9, Th17, y sus funciones.

Una vez producido el proceso de sensibilización, una exposición antigénica posterior inicia una respuesta inmune efectora por la unión entrecruzada del alérgeno a diferentes moléculas de IgE específicas unidas a su receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI) que expresan de forma constitutiva mastocitos y basófilos en su superficie (65), y a su vez estimula positivamente el aumento de su receptor de baja afinidad CD23 sobre la superficie de los

enterocitos (66). Tras la activación celular se produce la degranulación y se liberan aminas vasoactivas como la histamina (67) y citoquinas (68) responsables del reclutamiento de otras células efectoras como eosinófilos o Th2; y se sintetizan mediadores proinflamatorios lipídicos como las prostaglandinas o leucotrienos (LTc4, LTe4 y LTd4), o quimiocinas tales como factor activador plaquetario (PAF, del inglés Platelet-Activating Factor) y factor quimiotáctico del eosinófilo para la anafilaxia (ECF-A, del inglés Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis) (69). Todo esto desencadena en minutos una respuesta tisular visible a nivel de piel, y mucosas (nasal, bronquial, ocular, y del tracto gastrointestinal), que puede continuar a las 2-24 horas a una reacción poco estudiada en el enfoque digestivo, de tipo tardío, por infiltración del tejido con granulocitos y linfocitos (70).

En alergia a alimentos el tracto gastrointestinal es el más directamente afectado (71). Este forma parte del sistema inmunitario asociado a mucosas (MALT, del inglés Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), el cual se encuentra continuamente expuesto al medio ambiente externo a través de la gran área de superficie de su barrera epitelial, por la que una gran cantidad y variedad de proteínas alimentarias y agentes potencialmente patógenos, entran en contacto con las células del sistema inmunitario. El proceso común que ocurre en la mayoría de los sujetos es la realización de un reconocimiento inmunológico de estas proteínas, sin reaccionar frente a ellas. Este es el concepto conocido primariamente como tolerancia, descrito en 1911 por Wells (72). Suponen la activación de múltiples mecanismos inmunológicos, que finalmente conducen a la activación de las células T reguladoras inductoras de tolerancia. En los últimos años se ha podido comprobar el papel importante de las células T reguladoras (Treg) en la inducción de tolerancia oral (73). Esta se genera por el tipo de CD y puede ser producida por una única dosis alta, originando delección clonal o anergia por unión al receptor tipo Toll (TCR, del inglés T Cell Receptor) en ausencia de moléculas coestimuladoras (74, 75); o bien por dosis bajas repetidas mediadas por células Treg (71) (Figura 4).

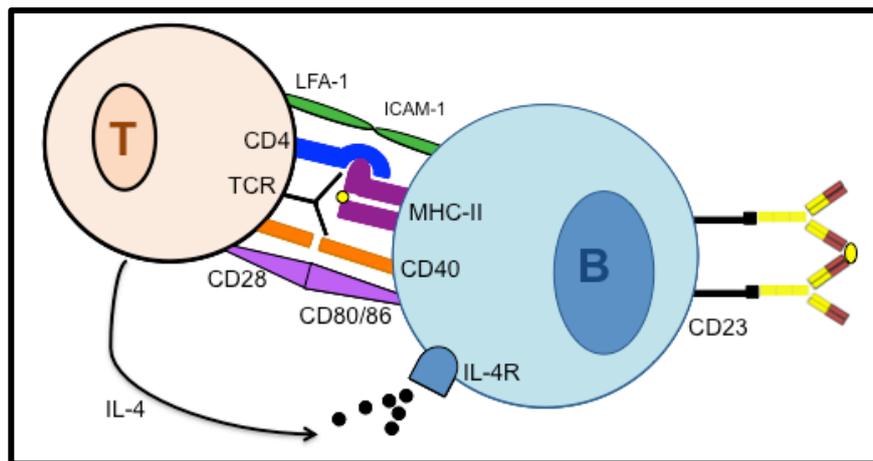


Figura 4. Presentación de antígeno del linfocito B a linfocito T por unión al receptor tipo Toll, y moléculas coestimuladoras.

1.3.1.1. Características fenotípicas y funcionales de las células Treg

Las Treg se clasifican según sus características fenotípicas y funcionales (Tabla 1):

- ❖ **Células Treg naturales.** Son células $CD4^+$ y $CD8^+$ que se forman en el timo con un programa ya definido para ejercer la supresión sobre aquellas células T que reaccionan contra antígeno propio. Su función es la regulación de la respuesta autoinmune.
 - ✧ Células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Su función es el control en órganos linfoides secundarios de las células T autorreactivas que escapan a la selección negativa, asegurando así la tolerancia periférica.
 - ✧ Células natural killer T (NKT). Subpoblación de células T que presentan propiedades de células NK, pero expresan el TCR α/β (una cadena α invariable unida a varias cadenas β). Las NKT secretan grandes cantidades de citoquinas tanto Th1 (interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés Tumour Necrosis Factor-alfa)), como Th2 (IL-4 e IL-13) (76) y factor de transformación del crecimiento (TGF- β), éstas se han relacionado con enfermedades autoinmunes en modelos animales (77).

- ❖ **Células Treg adaptativas.** Son células $CD4^+$ que se desarrollan también en el timo, pero a diferencia de las anteriores, adquieren su actividad supresora en la periferia.

Su función es regular la respuesta no sólo contra Ag propios sino también frente Ag extraños. Estas células a su vez se dividen en (78, 79):

- ✧ Células T colaboradoras tipo 3 (Tc3). Las cuales se inducen por la administración oral de un Ag.
- ✧ Células T reguladoras 1 (Tr1). Las cuales se inducen por la administración del Ag en presencia de IL-10.

Tanto las células Treg naturales y adaptativas son antígeno específicas, pero ejercen su función reguladora por distintas vías. Las células Treg naturales necesitan el contacto célula-célula; en cambio las células Treg adaptativas liberan al medio citoquinas supresoras de la actividad, como el TGF- β en células Tc3 (79), o IL-10 para el caso de las células Tr1 (78).

Fenotipo de las células Treg. Las células Treg naturales fueron las primeras en identificarse debido a la expresión constitutiva de la cadena α del receptor IL-2 (IL-2R), denominado CD25 (80). Sin embargo, también se sabe que, tras la activación de las células T, lo primero que ocurre es la inducción del receptor de alta afinidad para la IL-2 (IL-2R), de esta forma, las células T efectoras también pueden expresar el CD25. Por ello se diferenciaron a las Treg en su análisis fenotípico, por su mayor intensidad en la expresión de CD25 (CD4⁺CD25^{high}) (81). Además se han sugerido otros marcadores como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) (82), el receptor de la familia del TNF inducido por glucocorticoides (GITR, del inglés Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor-related gene) (83) y el gen de activación de linfocitos (LAG-3, del inglés *Lymphocyte-Activation Gene-3*) (84) que bien no se expresan consistentemente en las células Treg, y/o también pueden ser detectados en otros tipos celulares además de células Treg (79) tales como linfocitos T activados (tanto CD4⁺ como CD8⁺, para el caso de (CTLA-4).

En los últimos años, la proteína Foxp3, un miembro de los factores de transcripción de la familia de proteínas *forkhead* las cuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes envueltos en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y longevidad, se ha introducido como marcador exclusivo de las células Treg naturales (85), mostrándose la presencia de Foxp3 mayoritariamente en células CD4⁺CD25^{high}. Aunque no es exclusivo de células Treg CD4⁺CD25⁺ (79). Además se ha observado que los sujetos que presentan una mutación en el gen que codifica este factor de transcripción Foxp3 manifiestan un desorden fatal, consistente en disregulación inmune, poliendocrinopatía,

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

enteropatía, y síndrome ligado a X, que permite la supervivencia si es que recae sólo en una delección de la región no codificante para Foxp3, pero clínicamente se expresaría como una enteropatía grave en el contexto de alergia alimentaria y dermatitis atópica (86, 87).

Estudios recientes (88), demuestran que la disminución de la expresión del CD127 (receptor de la cadena α de IL-7, IL7-R) facilita la detección de las células Treg Foxp3⁺. Liu W. y cols. también propusieron que el CD127 podría ser un marcador capaz de purificar las células Treg adaptativas (los subconjuntos Tr1 y Tc3) (88).

Tipo Treg	Origen	Fenotipo	Mecanismo de acción	Respuesta
Natural ◇ CD4CD25Foxp3 ◇ NKT	T i m o	CD4 ⁺ o CD8 ⁺ CD25 ^{High} Foxp3 ⁺	Contacto cél-cél (CTLA-4; TGF- β)	Th1/Th2 (principalmente Th1)
Adaptativa ◇ Tr1	p e r i f e r i a	CD4 ⁺ Foxp3 ⁻	IL-10	Th1/Th2
◇ Tc3		CD4 ⁺ Foxp3 (¿?)	TGF- β	Th1/Th2

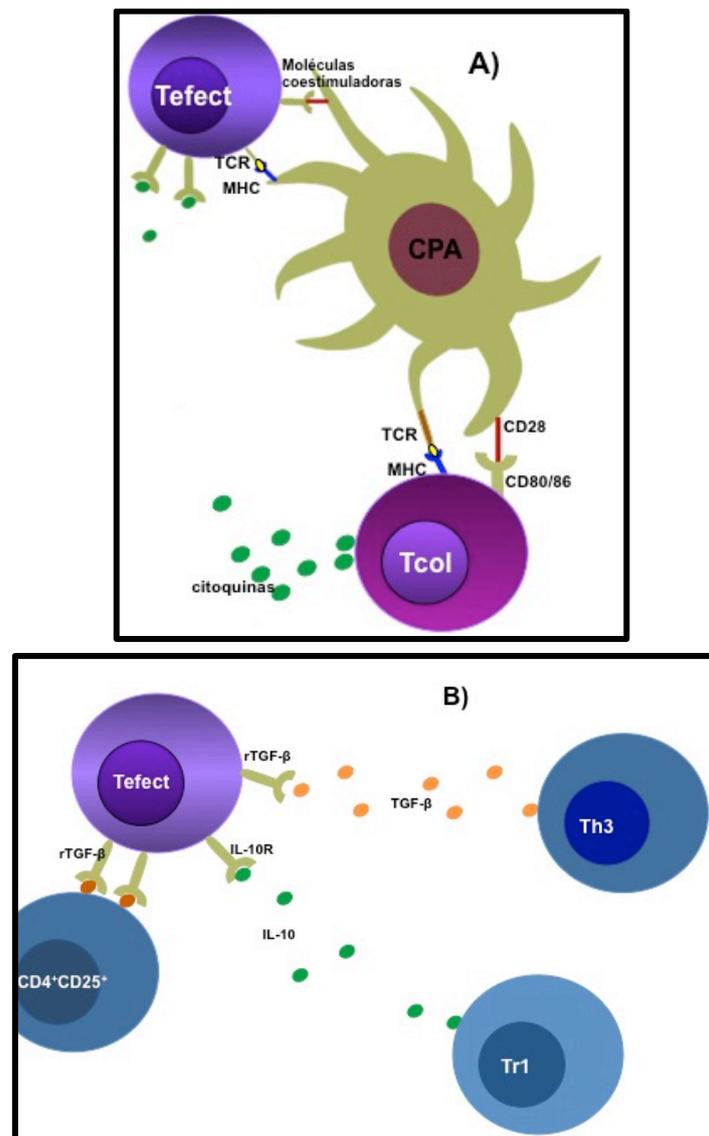
Tabla 1. Clasificación fenotípica y funcional de las células Treg.

Las Treg son capaces de suprimir las respuestas efectoras en reacciones alérgicas a través de diferentes mecanismos. Suprimiendo la degranulación de células efectoras inducida por el alérgeno específico (89), inhibir el reclutamiento de eosinófilos y otras células efectoras a los tejidos inflamados (90) y promover la producción de IgG4 e inhibir la producción de IgE alérgeno específica actuando sobre los linfocitos B (91). Las Treg pueden interactuar con células residentes en tejidos para contribuir a su remodelación, y promover la generación de CD con fenotipo tolerogénico. Estas funciones se realizan a través de diferentes mecanismos de supresión: citocinas inhibitoras (IL-10, TGF-B), citólisis (secreción de moléculas citotóxicas como granzimas), mecanismos de disrupción metabólica (CD25, AMPc y adenosina), y mecanismos que tienen a las CD como diana (CTLA-4, PD-1) (92, 93).

Un fallo o una pérdida en la tolerancia oral es lo que se hipotetiza como el principal problema en la hipersensibilidad alérgica a alimentos (94), siendo la naturaleza de esta respuesta similar a cualquier respuesta inmunitaria.

1.3.2. Mecanismo patológico en el tracto gastrointestinal

Cuando un alimento es ingerido por una persona no alérgica, las proteínas del alimento se asimilan de forma eficiente tras la acción gástrica, pancreática, y de las proteasas del borde en cepillo intestinal, aun así, alrededor de un 2% de 50-90 gramos de proteínas ingeridas de forma diaria en la dieta (95), se absorben como tales. La entrada del Ag es modulada por mecanismos inmunológicos inespecíficos en el tracto gastrointestinal, compuestos por el ácido gástrico, el moco, las enzimas digestivas, una flora intestinal intacta, y el peristaltismo, que generalmente disminuyen la alergenicidad de las proteínas (71), así como por la estructura física del propio epitelio. El desarrollo de tolerancia recae en todos ellos y en otros factores importantes que incluyen: la forma y dosis del antígeno, la estabilidad a tratamientos térmicos, la predisposición genética (41), la edad del sujeto, y la similitud con las proteínas endógenas del huésped (11).



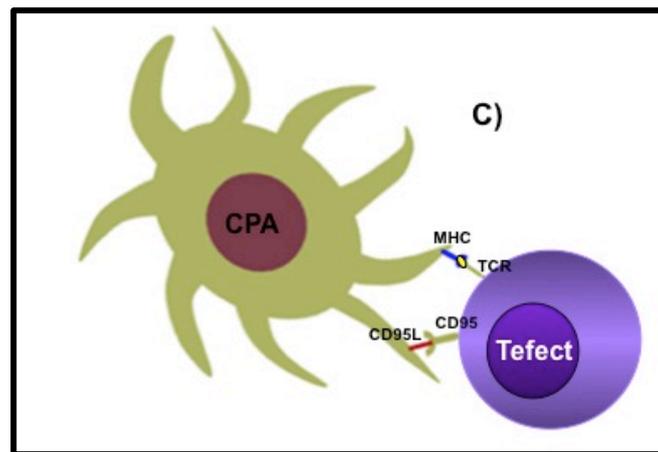
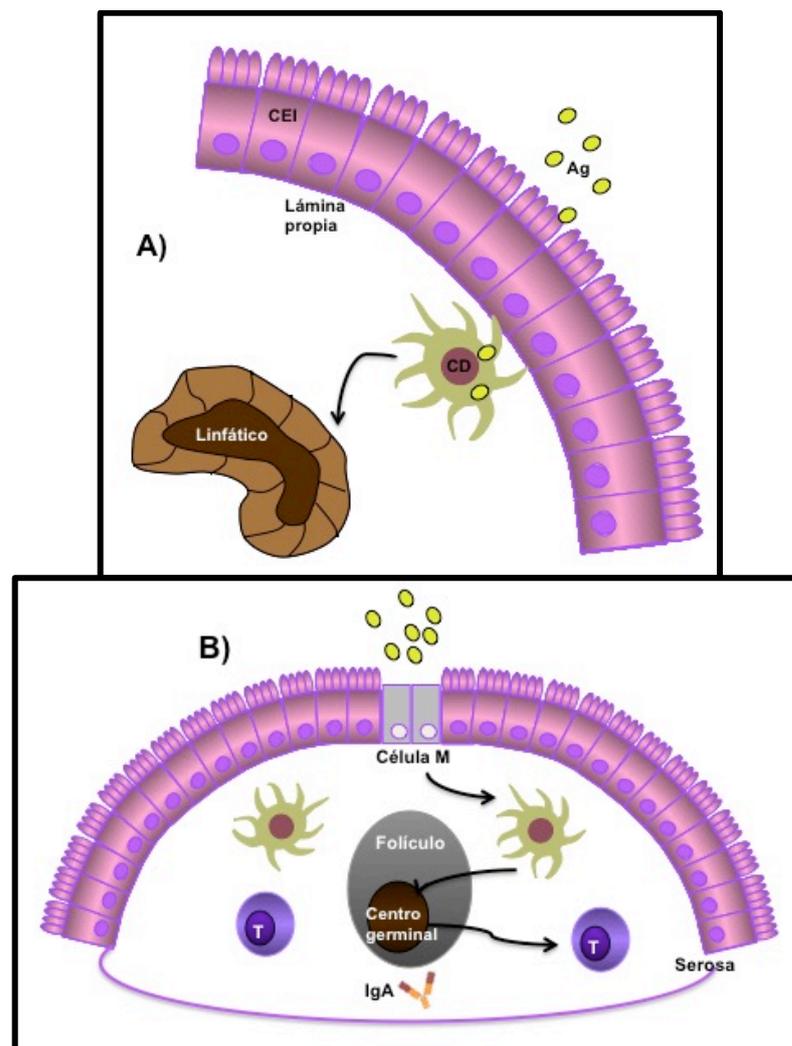


Figura 5. Mecanismos de tolerancia oral. (A) Inmunidad, en el que se requiere unión del receptor T (TCR) al complejo mayor de histocompatibilidad en presencia de citoquinas y moléculas coestimuladoras. (B) Baja dosis, mecanismo dirigido por las Treg. Respuesta inmune de supresión a través citoquinas o asociadas a la superficie de membrana, como IL-4, IL-10, y TGF- β . (C) Alta dosis, mediado por anergia a través del ligando del receptor de la célula T en ausencia de señales coestimuladas; o deleción clonal del linfocito por apoptosis mediada por el ligando FAS (CD95L).

La barrera mucosa del tracto gastrointestinal humano consiste en una superficie de uniones fuertes de epitelio cilíndrico monoestratificado estructurado entre criptas y vellosidades, sobre un estroma de tejido conectivo poblado de linfocitos, que constituyen el 20% del total del organismo, en relación con los folículos linfoides o placas de Peyer. Las proteínas de los alimentos pueden ser absorbidas y procesadas desde la luz intestinal de distintas maneras (Figura 6).

- Si el antígeno es soluble, los enterocitos especializados sin borde en cepillos (células M) asociados a mucosas del sistema gastrointestinal (GALT), lo fagocitan y trasladan a la región apical de la placa de Peyer con la que están en contacto, la cual es rica en CD. Estas células captan y transportan al Ag al centro germinal rodeado de células T y rico en células B (96), migran al ganglio mesentérico a través del sistema linfático portal, donde se encuentran con sus homólogos T y B. Estos últimos maduran a células plasmáticas productoras de IgA. La secreción local no inflamatoria de IgA es la respuesta inicial que ocurre en las superficies mucosas (97), estimulada por la producción de IL-6 y TGF- β (98). De ahí esos linfocitos pueden migrar a cualquier órgano diana específico que componen el MALT, mediante el fenómeno conocido como *homing* o asentamiento (99).
- Vía paracelular (100), coincidiendo con estados inflamatorios y aumento de IFN- γ .
- O bien transcelular, donde las CEI se comportan como CPA, dado que expresan de forma constitutiva en su membrana basolateral el MHC-II (32, 101). Así estas CEI

captan el Ag por endocitosis mediada por receptor en fase líquida a través de las microvellosidades de la membrana (102) y contactan con dos poblaciones de células T, los presentes en la lámina propia, o intraepitelial. Los linfocitos intraepiteliales expresan la integrina $\alpha E\beta 7$ que se une a la E-cadherina de las CEI y migran a través de la membrana basal, en contraste con los linfocitos de la lámina propia, que contactan con las CEI a través de proyecciones basolaterales, y expresan alrededor de 2/3 de ellos $CD4^+$, muy importantes para establecer la tolerancia oral.



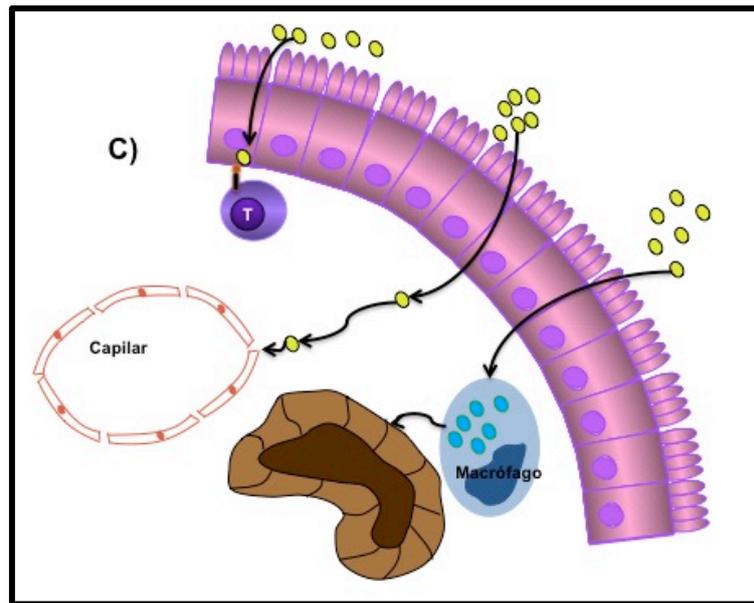


Figura 6. Mecanismos de absorción intestinal. (A) Envío de prolongaciones por parte de las CD a la luz intestinal. (B) Células M captan Ags particulados y los mandan a las CD subepiteliales, que están próximas a las Placas de Peyer. (C) Antígenos solubles pasan a través del epitelio hasta llegar directamente al capilar; ser presentados por las CEI a las células T; o captados por los macrófagos de la lámina propia para dirigirse al ganglio linfático.

1.4. Clínica

En la expresión clínica de una reacción por alergia alimentaria, la piel como órgano diana, y la temporalidad tras la ingestión del alimento, juegan un papel destacado. El diagnóstico es eminentemente clínico puesto que las pruebas complementarias, tales como las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica, de forma aislada no tienen valor. Las manifestaciones IgE mediadas se presentan de minutos a horas tras la ingestión del alimento, siendo el tracto respiratorio, gastrointestinal, la piel y el sistema cardiovascular los órganos más frecuentemente implicados (27).

1.4.1. Síntomas cutáneos:

Los síntomas cutáneos ocurren en más del 80% de las reacciones alérgicas por alimentos (103) tanto en niños como en adultos. La urticaria aguda, definida como sensación pruriginosa evanescente sobre lesiones eritematosas máculo-papulares tipo habonoso que desaparecen en menos de 24 horas, junto al edema del tejido celular subcutáneo, o angioedema, son las más comunes, siendo atribuible en hasta un 20% de los casos a

alergia alimentaria (103). Pueden presentarse aisladamente o de forma conjunta, principalmente en cara y extremidades. En sí mismas no suponen un cuadro grave, aunque desde el punto de vista estético son muy alarmantes, y pueden causar una impotencia funcional temporal, por ejemplo por pérdida de visión ante angioedema palpebral, o de la deglución debido a angioedema de lengua sin repercusión de la vía respiratoria. Pueden ser provocadas por la ingestión o el contacto, de forma directa o inadvertida, con el alimento generalmente no cocinado como frutas o vegetales (104). Pueden ser producidas por una exposición accidental, como por ejemplo al compartir cubiertos, o a través de besos (105). La presentación de urticaria crónica como desencadenante de un mecanismo de alergia a alimentos mediada por IgE, es muy infrecuente, habiéndose demostrado en tan sólo un 10% de pacientes tras su estudio mediante pruebas de provocación (106).

En la evaluación de este tipo de reacciones es importante la realización de un diagnóstico diferencial de otras patologías en las que también se ve afectada la piel tales como infecciones, enfermedades endocrinas, tumorales, reumáticas, renales, síndrome aurículo-temporal o de Frey, y angioedema bradicinérgico. Otros síntomas que también se pueden producir, frecuentemente como anticipo de los anteriores, son *flushing*, prurito aislado, o erupción eritematosa morbiliforme.



Figura 7. Imágenes de lesiones de urticaria y angioedema.

Diferentes estudios han apuntado a la existencia de una relación de la alergia alimentaria con la exacerbación de la dermatitis atópica, sin embargo, la evidencia clínica se basa en tres pilares controvertidos como son la posible relación causa-efecto identificada mediante dietas de eliminación de 3-6 semanas, provocaciones no controladas (6), y de forma preventiva en eliminación profiláctica de los alimentos más alergénicos en la infancia (49). La evaluación con patrones objetivos de la relación causa efecto de la dermatitis atópica y

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

alergia alimentaria es difícil debido a: i) el curso mismo de la dermatitis atópica cambiante por diversos factores externos que se escapan al control; ii) la gran cantidad de falsos positivos en los niveles de IgE específica y pruebas intraepidérmicas debido a los altos niveles de IgE total circulante; iii) la propia fisiopatología del proceso que puede estar producida por disfunción epitelial debida a la mutación en el gen de la filagrina (107) u origen no mediado por IgE (108);

1.4.2. Síntomas respiratorios:

La prevalencia de asma exacerbado por reacción alérgica a alimentos no se confirma en los estudios epidemiológicos, sin embargo, existe una prevalencia en torno al 2-8% en pacientes con asma de base (109). Lo que sí se ha demostrado es el aumento del riesgo a padecer asma en la edad adulta en niños con alergia a los alimentos, concepto incluido dentro de lo que se denomina como la marcha atópica (51, 110). No obstante, los síntomas pueden suponer un riesgo vital, desde laringoespasma, angioedema de orofaringe, a broncoespasmo con disnea y autoescucha de sibilantes (111). Igualmente, los síntomas de vía respiratoria superior, como rinorrea, congestión nasal, prurito nasal o estornudos, típicamente ocurren junto con la afectación de otros órganos (103), como conjuntivitis tipo hiperemia conjuntival, prurito o epífora en hasta un 39% (112), y deben poner en alerta ante la posibilidad de una reacción sistémica (113). Una excepción a la presencia de una clínica respiratoria como síntoma aislado sería el caso de patología ocupacional, como ocurre por inhalación de proteínas volátiles de la cocción de pescado (114), o por harina de trigo como en el asma del panadero (115). No se han observado casos de otitis serosas en estudios con provocaciones controladas, si bien se pueden presentar dentro de la clínica alérgica mediada por IgE por aeroalérgenos de forma concomitante (116).

1.4.3. Síntomas gastrointestinales:

Los síntomas gastrointestinales cubren un amplio espectro de manifestaciones que pueden abarcar el tracto digestivo en toda su extensión, por lo que pueden variar e incluir síntomas tan inespecíficos y potencialmente severos por el riesgo de deshidratación como dolor abdominal tipo calambre, náuseas, vómitos, diarrea, flatulencias, reflujo gastroesofágico (117), e incluso rechazo del alimento en lactantes o niños pequeños.

Existen otros cuadros infrecuentes en los que típicamente no se encuentra mecanismo inmunológico mediado por IgE. Se ha postulado, que la ingestión de los alérgenos alimentarios produce inflamación local mediada por linfocitos T que conduce a un aumento de la permeabilidad intestinal y aparición de síntomas tardíos, principalmente en los primeros años de vida. Estos cuadros incluyen según el tramo afectado la

entero/proctitis/proctocolitis inducida por proteínas de la dieta. De ellos, la entidad clínica más grave es la enterocolitis por proteínas (FPIES, del inglés, *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome*), donde se producen vómitos reiterados en escopetazo, con repercusión del estado general, a los 60-90 minutos de la ingestión de leche, pescado, pollo, o cereales (118). La colitis hemorrágica se manifiesta en el lactante con deposiciones con sangre sin otra sintomatología (119). El cólico del lactante consiste en crisis de llanto y distensión abdominal con expresión de dolor durante el primer trimestre de vida, en el que se han implicado las proteínas de la leche de vaca (CMP, del inglés *Cow Milk Proteins*) como desencadenantes (120). Y según el tramo afectado también se puede encontrar un grupo de desórdenes caracterizados por disfagia, vómitos, náuseas y/o dolor abdominal postprandial con biopsia de la mucosa rica en eosinófilos y una eosinofilia periférica en hasta el 50% de los casos (Figura 8), denominado esofagitis/gastritis/gastroenteritis eosinofílica (121), en la que se han visto implicados con más frecuencia la leche de vaca, huevo, soja, trigo, frutos secos, y pescados y mariscos tras respuesta en dietas de eliminación (122).



Figura 8. Imágenes de endoscopia digestiva que muestra la “traqueización del esófago (imagen de la izquierda), y de biopsia de esófago con tinción de eosina donde se observan >20 Eo por campo (imagen de la derecha).

1.4.4. Síndrome de alergia oral

Una mención especial merece el concepto de síndrome de alergia oral (SAO), que se encuentra a caballo entre una dermatitis de contacto de la mucosa oral y la expresión de clínica mediada por IgE del aparato digestivo debida a los alimentos. Existen varias hipótesis que lo explican, una propone que los síntomas se deben a la gran concentración de mastocitos en la mucosa de la orofaringe (123) y de alérgenos rápidamente liberados por el efecto de la saliva; y otra a la gran concentración de células T en el tejido linfóide a este nivel (124). Este es el síntoma más frecuente de alergia a los alimentos en adultos, ocurriendo en más del 50% de los pacientes que refieren síntomas tras la ingesta de vegetales y frutas

frescas (123). Los síntomas son de corta aparición y duración, y pueden presentarse como prurito orofaríngeo acompañado o no de lesiones de urticaria peribucal, angioedema de labios, carraspera, e incluso picor en el cuello con eritema local, u ótico (125). Fue descrito por primera vez por Tuft y cols. hace más de 70 años para describir la alergia mediada por IgE debida a reacción cruzada por proteínas homólogas que comparten el polen y los alimentos (panalérgenos), y desde entonces el número de publicaciones al respecto ha ido creciendo, coincidiendo con el aumento de prevalencia de rinitis alérgica. Ya que se ha observado que entre pacientes con rinitis, la prevalencia de presentar además síntomas de SAO varía del 30 al 70% (126), con diferencias poblacionales, incluso regionales, debido a los cambios en los hábitos dietéticos y de palinología. También existen diferencias de acuerdo a la ruta de sensibilización (127) ya que, si bien menos frecuente, también se observan en sujetos sin polinosis asociada, generalmente del sur de Europa como España, debido a alérgenos estables como las LTP (del inglés, *Lipid Transfer Protein*) (128), presentando síntomas por ejemplo debido a la ingesta de manzana, sin sensibilización al polen de abedul o de gramíneas (129). Esto hace que la historia clínica y las pruebas diagnósticas complementarias sigan jugando un papel importante dado que un mismo alimento puede ser capaz de desencadenar tanto síntomas locales como el SAO, como sistémicos. En el desarrollo de SAO se han identificado una gran variedad de proteínas vegetales como son las proteínas de defensa (PR, del inglés *Pathogenesis-Related proteins*) (130), profilinas, inhibidores de la alfa-amilasa, peroxidasas, thiol proteasas, y lectinas, que serán objeto de estudio en mayor profundidad en los siguientes apartados de esta tesis.

1.4.5. Afectación multiorgánica:

La afectación sistémica, potencialmente fatal, que ocurre de segundos a pocas horas tras la ingesta de un alimento, se define como anafilaxia. Las manifestaciones clínicas son las clásicas de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, con afectación variable de la piel, como el órgano más frecuentemente implicado (prurito palmo-plantar y generalizado, urticaria, eritema, angioedema), del aparato digestivo (náuseas con alto contenido en moco, vómitos, dolor, diarrea explosiva), del aparato respiratorio (nasal, laríngea, pulmonar), y del cardiovascular (hipotensión, síncope, angina, arritmias), y que según la clasificación hecha por Brown (131) permite diferenciar la reacción anafiláctica en leve, moderada, o grave (Tabla 2).

Grado	Definido por
Leve	Sólo afectación cutánea o del tejido celular subcutáneo
Moderado	Afectación cardiovascular, respiratoria o gastrointestinal
Grave	Hipoxia, hipotensión o compromiso neurológico

Tabla 2. Clasificación por Brown de las reacciones sistémicas.

El síndrome resulta de la activación celular, generación y liberación masiva de mediadores inflamatorios como histamina y triptasa entre otros (132, 133), existiendo la posibilidad de reacciones “bifásicas” en hasta un 30% de los casos (134), en las que los síntomas recurren tras su resolución aparente, en el plazo de 4-72 horas (135).

Dada la afectación multiorgánica, rápida, y la incapacidad para predecir los órganos afectados o su orden de aparición, en el diagnóstico diferencial de la anafilaxia deben usarse los algoritmos existentes para diferenciar de otras patologías y poder así tratar al paciente de forma temprana y adecuada. Este diagnóstico diferencial deber realizarse con síndromes que se pueden asociar con eritema como el carcinoide, metastásico, feocromocitoma, mastocitosis...; síncope vasovagal; escombroidosis; angioedema hereditario; reacciones anafilactoides; o de otras causas de shock cardiogénico o de enfermedades respiratorias o cardiovasculares (136).

Los síntomas más graves con cierta frecuencia no son reconocidos como peligrosos, conduciendo a un diagnóstico y tratamiento tardío, que junto con la ingesta inadvertida del alérgeno, y los factores personales como el tratamiento concomitante con betabloqueantes o antagonistas de los canales del calcio (137), o el padecer asma en la adolescencia, hacen que se aumente el riesgo y la prevalencia de un desenlace fatal (24). Aunque el riesgo de producir una reacción grave es compartido por todos los alimentos, algunos son mas citados como causa de anafilaxia, son frutos secos y legumbres en general, pescados, mariscos, leche, huevo, frutas, semillas, y cereales o granos (129, 138).

Entre los factores que pueden influir para que dichos alimentos sean los principales responsables de una reacción anafiláctica, destacan su amplia utilización en múltiples

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

alimentos procesados e incorrectamente etiquetados, así como su elevada potencia alérgica.

2.- ALERGIA A ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL MEDIADA POR IgE

La implicación de los vegetales en la alergia está relacionada con su presencia en los alimentos de la dieta habitual, y sus características físico-químicas, pudiendo desencadenar un extenso espectro de síntomas clínicos mediados por IgE. Es una de las causas más frecuentes de alergia alimentaria (44), lo que unido a la alta frecuencia de reacciones sistémicas graves (139, 140), en paralelo a síntomas locales en la mucosa oral, ha promocionado su estudio en los últimos años. Como vegetales se incluyen alimentos tan variados y básicos como frutas, hortalizas, legumbres, frutos secos, semillas, y cereales, y así lo dividiremos posteriormente para su estudio.

2.1. Características de las proteínas alergénicas:

2.1.1. Características físico-químicas

Los estudios llevados a cabo a lo largo de los años han definido una serie de características importantes, que tanto de forma individual como combinadas, pueden condicionar la alergenicidad de las proteínas (141). Entre ellas se encuentran, el tamaño que no puede ser menor a 4-6 KDa (142), su integridad, su resistencia a la degradación por el número de puentes disulfuros presentes en su molécula, su capacidad de unión o transporte de calcio, su actividad proteolítica o enzimática (143), su similitud con otras proteínas, o las modificaciones postraduccionales, principalmente la glicosilación, que se producen en las proteínas extracelulares. Las glicoproteínas suelen producir cambios en la estabilidad, solubilidad, hidrofobicidad, y en la carga eléctrica, haciendo que los sitios glicosilados estén más expuestos al sistema inmune (143, 144). Se ha demostrado que muchos alérgenos de plantas son ricos en azúcares como la manosa, fructosa, xilosa, y N-acetil glucosamina, que son grupos que interaccionan específicamente con receptores de las CPA; sin embargo, en alérgenos animales esto no ha sido encontrado (142, 143, 145). De hecho, se ha demostrado que los alérgenos de gramíneas (Phl p 1) pierden sus propiedades alergénicas tras procesos de deglicosilación, ya que los azúcares presentes en estas proteínas son indispensables en el reconocimiento por los anticuerpos IgE (142, 145, 146). La reactividad cruzada entre algunos alérgenos glicosilados de diferentes especies de plantas depende en cierto grado de los carbohidratos presentes en la superficie de estas proteínas,

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

denominados carbohidratos determinantes de la reactividad cruzada (CCD, del inglés *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*), aunque por sí solos éstos son clínicamente irrelevantes (142).

La pérdida de estabilidad y alergenicidad por cambios de temperatura, enzimáticos, o de pH ha sido demostrada para proteínas de la mostaza (Sin a 1), del olivo (Ole e 1) (146), y la lactoglobulina de la leche (147). Así como para proteínas con capacidad de unión y transporte de calcio presentes en plantas y animales como son la parvalbúmina del pescado, Bet v 3 del abedul, y Phl p 7 de gramíneas. En un estudio realizado con Bet v 3 se encontró que un alérgeno puede exponer epítomos variables según las diferentes conformaciones que puede adoptar (148). Otros alérgenos actúan como lectinas uniéndose a oligosacáridos. Ejemplos de éstas son los alérgenos del látex (Hev b 6.01, Hev b 6.02 y Heb b 11), del aguacate (Pers a 1), y otros presentes en plátano, kiwi, y castaña (149).

En la estructura molecular de las proteínas alergénicas existen regiones inmunodominantes, conocidas con el nombre de epítomos, las cuales interaccionan con fragmentos de unión al antígeno (Fab) de los anticuerpos IgE. Varios estudios han permitido establecer la presencia de epítomos lineales reconocidos por IgE en sueros de pacientes sensibilizados, sin embargo, normalmente los residuos que conforman un epítomo se encuentran en la superficie de dichas proteínas, localizados en diferentes posiciones de la secuencia **lineal** pero muy cercanos si la proteína se encuentra en su forma plegada, a éstos se les denomina epítomos **conformacionales** (11).

La alergia alimentaria es común en los primeros dos años de vida, coincidiendo con la etapa de la vida en la que existe una inmadurez en la barrera intestinal (150, 151). A medida que tiene lugar su maduración, se producen cambios en la permeabilidad intestinal que impiden la entrada a los epítomos conformacionales (152). A pesar de la especificidad de la IgE, en ocasiones ésta puede reconocer otros Ag con similitudes estructurales por encima del 50%. Aunque por lógica cabe pensar que esto puede ser normal entre alimentos de una misma familia taxonómica, se ha visto que también ocurre entre alimentos no relacionados (5). Por todo esto se han descrito dos patrones distintos de sensibilización a alimentos:

- a) Sensibilización primaria producida por vía digestiva a través de glicoproteínas resistentes y estables al calor, acidez, y proteasas; que se consideran alérgenos completos, pues son capaces de sensibilizar y además desencadenar una reacción alérgica (11).
- b) Sensibilización producida a través de aeroalérgenos. En este caso el alimento responsable se comporta como un alérgeno incompleto, incapaz de sensibilizar por

vía digestiva, tratándose comúnmente de proteínas termolábiles y fáciles de degradar.

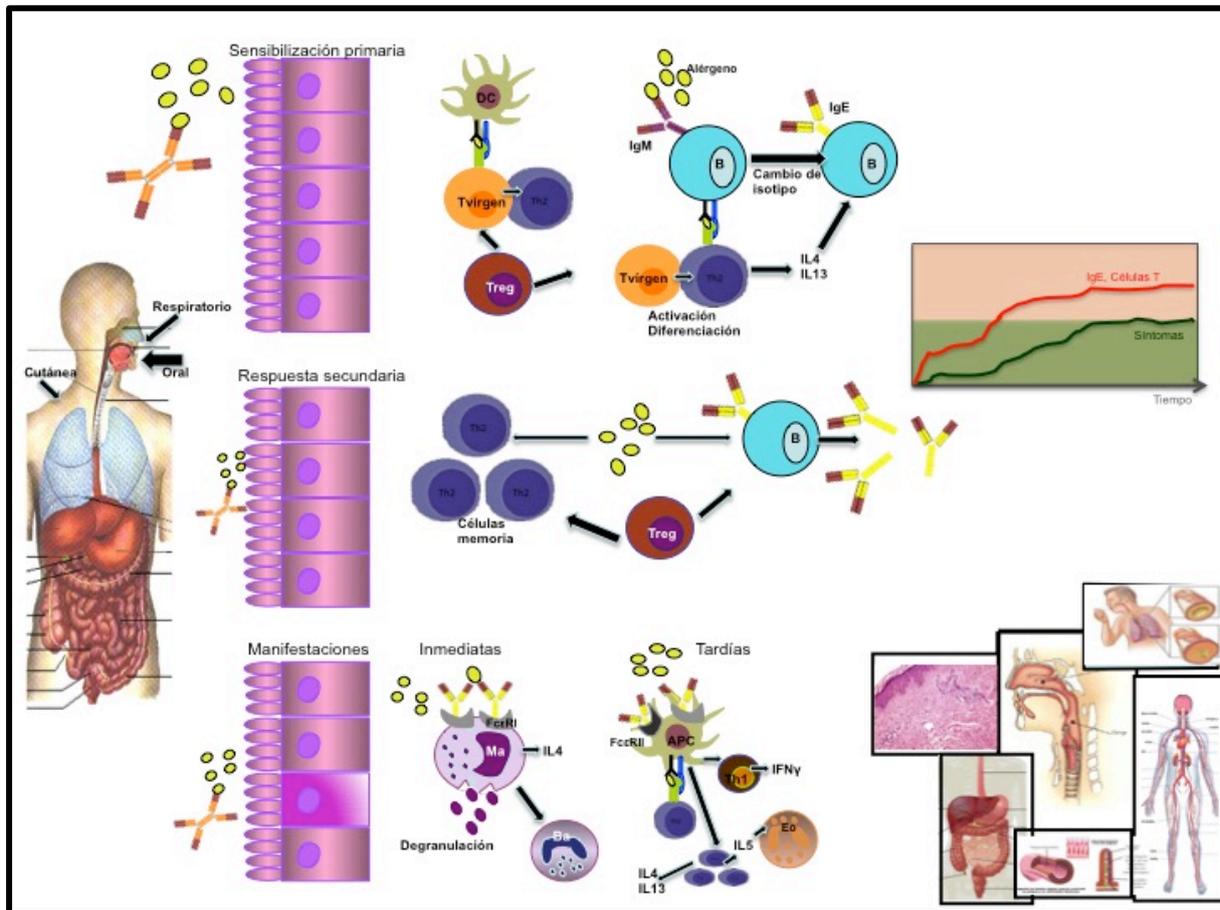


Figura 9. Representación de las fases de sensibilización primaria y efectora con los cambios a nivel celular y citoquinas principales que intervienen, así como los órganos y sistemas posibles afectados.

Un ejemplo de los diferentes patrones de sensibilización ocurre en las áreas ricas en abedules y otras especies del orden Fagales (aliso, avellano...) del centro y norte de Europa y la alergia a manzana. Los pacientes alérgicos a esta fruta presentan una sensibilización primaria al polen de abedul, concretamente a Bet v 1, y por reactividad cruzada se sensibilizan al alérgeno de manzana Mal d 1 (PR10), dando una clínica leve. Sin embargo, los pacientes alérgicos a manzana en el área mediterránea, donde la presencia de abedul es muy baja, muestran una sensibilización a la LTP de manzana, Mal d 3, siendo la causa principal la reactividad cruzada con la LTP de melocotón Pru p 3, y provocando reacciones más graves como la anafilaxia (5, 153). La sensibilización a frutas, sobre todo de la familia Rosaceae (melocotón, manzana, albaricoque...) aparece con frecuencia asociada

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

a alergia a los frutos secos, según el estudio de Lázaro y cols. (154), así el 49% de los pacientes alérgicos al melocotón también lo eran a los frutos secos.

2.1.2. Panalérgenos

El concepto de panalérgeno, del griego “pan” que significa “todo”, se utiliza para designar proteínas de familias no relacionadas taxonómicamente, con funciones homólogas involucradas en procesos vitales generales, y por tanto, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Los panalérgenos de las plantas comparten secuencias de regiones altamente conservadas, así como funciones y estructuras tridimensionales. Son responsables de gran cantidad de reacciones de reactividad cruzada mediada por IgE entre polen y fuentes de alérgenos alimentarios no relacionados taxonómicamente. Aunque son generalmente considerados como alérgenos menores, la sensibilización a panalérgenos puede ser muy problemática, pues aumenta el riesgo de sufrir múltiples sensibilizaciones con manifestaciones clínicas altamente relacionadas con factores de exposición y geográficos (155).

2.2. Alérgenos implicados

De todas las miles de proteínas presentes en un alimento, sólo una minoría son alergénicas, y la mayor parte pertenecen a unas pocas familias de proteínas. Las proteínas de plantas presentes en alimentos se pueden clasificar según su función en tres grandes grupos (Figura 10):

Proteínas de reserva, principalmente en semillas de las plantas superiores y algunas en los órganos vegetativos.

Proteínas de defensa, involucradas en los sistemas de protección frente a las invasiones de patógenos y plagas.

Y un tercer grupo heterogéneo en su función, compuesto entre otras por **proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras**, que se sintetizan en la planta de forma constitutiva o en respuesta a factores externos, en el que se incluyen las profilinas, oleosinas, y la β -fructofuranosidasa del tomate o la glioxalasa I del arroz (149).



Figura 10. Clasificación proteínas vegetales según su función.

2.2.1. Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras:

Las **profilinas** son proteínas citosólicas de pequeño tamaño (de 12 a 15 KDa) que representan una familia altamente conservada en la escala filogenética, por lo que se encuentran en todas las células eucariotas (156). Tienen una identidad de secuencia mayor al 75% entre diferentes especies. Su principal función en las células de las plantas es la motilidad del citoesqueleto, regulando la polimerización de los microfilamentos por unión de monómeros de actina y una plétora de otros ligandos como fosfatidil inositol fosfato (25). Su estructura tridimensional de dos alfa-hélices y cinco láminas beta antiparalelas en su parte central, se dobla hasta adoptar la forma globular compacta (155) (Figura 11), lo que las hace vulnerables a los procesos de desnaturalización por calor y digestión gástrica, y se traduce en su generación clínica relacionada con el SAO. Hasta la fecha, se cree que las secuencias más importantes de unión a IgE se agrupan en las regiones N 1-52 y C 106-132 (157). Se han identificado profilinas alergénicas en el polen de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, de alimentos, y en *Hevea brasiliensis* látex, lo que las convierte en una de las principales responsables de la co-sensibilización entre pólenes y alimentos (158). Distintos estudios revelan que la sensibilización a profilinas varía entre individuos del 5-40% según la zona geográfica, con una prevalencia del 20-38% para Europa Central y del Sur (155). Gracias a estudios de purificación y clonación, se considera a la profilina del abedul Bet v 2, como buen marcador de su sensibilización (159). De acuerdo con esto, todos los

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

pacientes que presentan IgE frente Bet v 2, están sensibilizados a polen de gramíneas. Las profilinas se encuentran como alérgeno mayoritario para melón (Cuc m 2) (160), sandía (Cit l 2), y naranja (Cit s 2), y también se muestran para plátano (Mus a 1), piña (Ana c 1), melocotón (Pru p 4) (161), fresa (Fra a 4), manzana (Mal d 4), cereza (Pru av 4), pera (Pyr c 4) (157, 159), avellana (Cor a 2), pimiento (Cap a 2) (162), apio (Api g 4) y en zanahoria (Dau c 4).



Figura 11. Estructura tridimensional Profilina del abedul Bet v 2

Las **oleosinas** son proteínas vegetales de reserva de las semillas. Su carácter hidrófobo las hace encontrarse dentro de los cuerpos lipídicos. Se han descrito asociadas a reacciones graves en cacahuete, avellana, y semillas como el sésamo (Ses i 4 y 5) (162, 163).

2.2.2. Proteínas de reserva:

La superfamilia de las prolaminas fue inicialmente descrita en base a un patrón conservado de residuos de cisteínas (Cys-Cys y Cys-X-Cis) dentro de una estructura tridimensional rica en alfa hélices (164).

Las **prolaminas** propiamente dichas son las proteínas mayoritarias de las harinas de cereales, con la excepción de avena y arroz. Insolubles en agua y con una composición de aminoácidos rica en prolina y glutamina a la que deben su nombre (156). Afectan principalmente a manipuladores de cereales, pero también se han descrito reacciones inmediatas tras su ingesta en niños debida al alérgeno Tri a 36 (165), o asociada a la gliadina ω -5 (Tri a 19) en casos de anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de la

ingestión de trigo (45, 166). Históricamente tomaron nombres específicos según el cereal, así, encontramos gliadinas en el trigo, hordeínas en la cebada, secalinas en el centeno, y zeínas en maíz, sin embargo, la clasificación actual se basa en sus funciones, pues un mismo cereal se compone de distintas fracciones, como el gluten del trigo, formado a partes iguales de gliadinas y gluteninas.

Las **albúminas 2S** son el principal grupo de proteínas de reserva de muchas especies de plantas dicotiledóneas (156). Reciben su nombre por presentar un coeficiente de sedimentación de 2 Svedbergs y ser solubles en agua con una estructura compacta formada por una súper hélice organizada de 4-5 hélices alfa (Figura 12). Generalmente se sintetizan en la semilla como una única cadena de 10-15 KDa y un tamaño de unos 90 a 135 aminoácidos (167), como en la semilla de girasol, pero dado su alto grado de polimorfismo, tras cambios postraduccionales también pueden encontrarse dos cadenas unidas por puentes disulfuro, como en la nuez de Brasil (Ber e 1). Ricas en aminoácidos como glutamina, arginina, cisteína y metionina, dado que suministran nutrientes durante la germinación de la planta, suelen ser resistentes a tratamientos térmicos o la actividad de enzimas proteolíticas (168, 169). Además, se ha demostrado la capacidad de interacción con bicapas lipídicas, lo que aumentaría su paso intacto a través de la barrera intestinal, en concreto Sin a 1 (mostaza amarilla) (170), así como la capacidad de unión al ión Cu^{+2} de Ber e 1 (171). Presentes fundamentalmente en frutos secos, se describen reacciones graves de hipersensibilidad a pesar de su baja identidad de secuencia, hallándose para la nuez (Jug r 1) (172), nuez pecana (Car i 1) (173), anacardo (Ana o 3) (174), nuez de Brasil (Ber e 1) (175), avellana (Cor a 14) (176), pistacho (Pis v 1), y en cacahuete, tanto Ara h 6, considerada incluso en algunos estudios como una isoforma de la más destacada, Ara h 2, su alérgeno mayor y representativo en países anglosajones, presente en hasta un 9% del extracto total (177, 178). También se han descrito en otros vegetales, como brécol, rábanos y nabos (Bra r 1) (179).

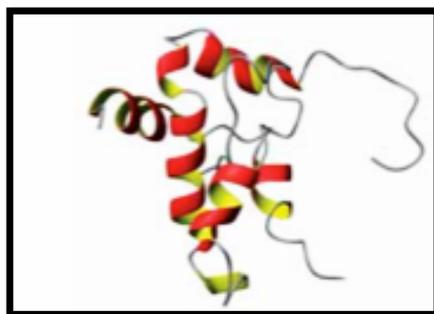


Figura 12. Estructura tridimensional de Albúmina 2S de la semilla de colza.

Los miembros de la superfamilia cupinas representan proteínas con funciones muy diversas cuya evolución pasa desde las archaea y bacterias hasta las células eucariotas. Fueron descubiertas gracias a que comparten secuencias de cadenas polipeptídicas y una estructura tridimensional con dominios de “barril β o cupina” (del latín *cupa*, barril) (180) que les confiere gran estabilidad. Se clasifican según consten de un solo dominio cupina (germinas) o dos (globulinas o bicupinas). Algunas poseen actividad enzimática como dioxigenasas, pero la mayoría son proteínas de reserva no catalíticas de las semillas de las plantas (25).

Las **germinas o GLP** (del inglés, *Germin-Like Protein*) son monohexameros de unos 250 KDa asociados formando trímeros con el dominio polipeptídico en estructura de alfa-hélice. De acuerdo a su función como proteínas de defensa, su organización molecular las hace estables a tratamientos térmicos, y su actividad enzimática a la acción proteolítica. Así se ha descrito la presencia de actividad peroxidasa, y súperoxido dismutasa en la cebada (181) y el aumento de la capacidad de unión a IgE gracias a la glicosilación en la naranja (Cit s 1), mandarina, clementina, y pimiento (182).

Las bicupinas o globulinas se han descrito como los principales componentes de la dieta humana dado que se encuentran en la mayoría de las proteínas de almacenaje. Su sensibilización puede ser primaria o por reactividad cruzada. Han sido estudiadas sobre todo en las leguminosas, como cacahuete y soja. Divididas en base a su coeficiente de sedimentación en **7S vicilinas y 11S leguminas**. Ambas presentan una digestión limitada y algo menor de estabilidad térmica que las albúminas 2S por pérdida de parte de la estructura cupina, a pesar de ello se han descrito ejemplos de aumento de la alergenicidad, como para Ara h 1 tras el tostado (41, 183) o en cacahuetes (184).

Las leguminas 11S son proteínas hexaméricas de 300-450 KDa ensambladas por dos trímeros (185), que han sido estudiadas para la avellana (*Cor a 9*) (186), nuez (*Jug r 4*) (187), anacardo (*Ana o 2*) (188), nuez de Brasil (*Ber e 2*) y Ara h 3 (189). En lo que se refiere a las vicilinas 7S, sólo se componen de trímeros de 150-180 KDa, y han sido descritas principalmente en el cacahuete, soja (Figura 13), lenteja, guisante, nuez y anacardo, sin embargo no muestran secuencias de identidad importantes, lo que puede explicar la baja reactividad cruzada in vitro entre cacahuete (*Ara h 1*) y anacardo (*Ana o 1*).

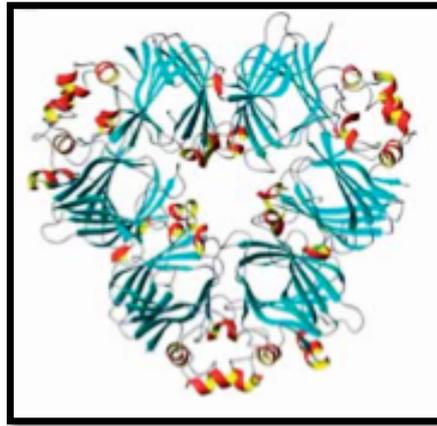


Figura 13. Estructura tridimensional de vicilina de soja.

2.2.3. Proteínas de defensa:

Las proteínas de defensa (muchas denominadas PR), como su nombre indica, se pueden inducir por distintos tipos de estrés o expresarse constitutivamente frente al ataque de patógenos o plagas. La mayoría presentan una estructura compacta estabilizada por puentes disulfuro, lo que las hace muy resistentes a tratamientos térmicos y enzimáticos (190). La componen una amplia variedad de familias, como previamente las descritas germinas, a destacar por su importancia clínica o estudio por su papel como alérgenos alimentarios son (149, 191):

Familia **PR-1**, tienen una amplia distribución entre los vegetales cultivados, pero sólo se ha encontrado hasta la fecha en una proteína minoritaria del melón (*Cuc m 3*) (192).

Proteasas y β -1,3-glucanasas (PR-2). Se trata de enzimas hidrolíticas con propiedades antifúngicas, con una caracterización alérgica escasa actualmente. Destacan la glucanasa del látex (*Hev b 2*) (193) y del plátano (*Mus a 5*) (194), la actidina del kiwi (*Act c 1*) (195) como uno de sus alérgenos mayoritarios asociados a reacciones graves, la serín-proteasa del melón (*Cuc m 1*) (196).

Quitinasas y proteínas con dominio heveína (PR-3, PR-4, PR-8). Son enzimas que catalizan la hidrólisis de polímeros de quitina del exoesqueleto de insectos y células de la pared de hongos. Las quitinasas de clase I contienen un dominio N-terminal llamado heveína, el cuál comparte una alta secuencia de identidad con el alérgeno mayor del látex, *Hev b 6.02* (Figura 14) (197). Se encuentran en frutas consumidas en fresco como hasta el

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

24% en aguacate (Pers a 1) (198), plátano (Mus a 2) (199), 22% en castaña (Cas s 5) (200), y kiwi (20% de los casos), junto a otros vegetales como la papaya, tomate, piña, o mango, dentro del llamado síndrome látex-fruta. Los péptidos responsables de su reactividad son péptidos de fácil degradación tras el estímulo de los ácidos gástricos (201). Las quitinasas de clase III pertenecen a la familia 18 de hidrolasas glicosiladas (202), a pesar de no poseer el dominio heveína se ha descrito como alérgeno en la frambuesa (203), lo que indica que su estructura conformacional con cuatro puentes disulfuro es también responsable de su alergenicidad (190).

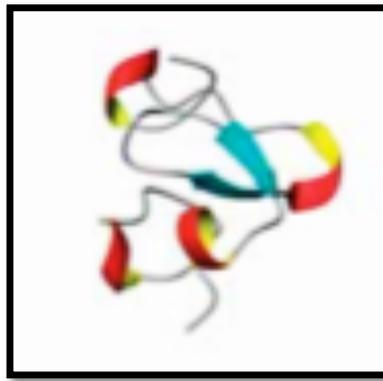


Figura 14. Estructura tridimensional de heveína del látex.

Las taumatinas (PR-5) reciben su nombre de una proteína de intenso sabor dulce aislada de una fruta encontrada en África, llamada *Thaumatococcus daniellii*. De 23 KDa y valor antifúngico, poseen 8 puentes disulfuro que les dota de una alta termorresistencia (204). Se han descrito alérgenos en frutas como manzana (Mal d 2) (205, 206), pimienta (Cap a 1), kiwi (Act c 2) (207), cereza (Pru av 2) (208), y melocotón (Pru p 2) (209).

Los **inhibidores de alfa-amilasa/tripsina** son proteínas solubles de 12-16 KDa que interfieren en la digestión de las plantas para impedir las enzimas del intestino de los insectos, que además poseen otros tipos de actividad inhibitoria de proteinasas o tipo tripsina. Se encuentran en las harinas de mayor consumo (trigo, centeno, cebada, arroz y maíz), con la capacidad de generar sensibilización vía digestiva e inhalatoria (114, 210). Igualmente se ha descrito dicha capacidad en algunas peroxidases glucosiladas presentes en harinas de trigo y cebada. Son proteínas de unos 36 KDa del grupo **PR-9**, que aún precisan de estudios adicionales (211).

Otros tipos de inhibidores de proteasas son los pertenecientes a la **familia Kunitz**, presentes en una amplia variedad de proteínas como la IL-1, y en alimentos como la patata

(Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4) (212), y algunas legumbres, la más destacada en la soja. Generalmente son de pequeño tamaño, con tres puentes disulfuro que le dan mayor alergenicidad, y a pesar de ser descritos como alérgenos menores en la soja (213), se han identificado como causantes de reacciones tipo anafilaxia (214). Además, se encuentran como contaminantes en cosméticos y alimentos procesados, debido al uso de lecitina de soja como agente emulsionante (215).

Homólogos de Bet v 1 (PR-10). Como se introdujo anteriormente, el transporte de esta proteína a través del epitelio se realiza sin actividad proteasa debido a su estructura molecular (216). Formada por alérgenos de unos 18 KDa con identidad de secuencia que varía del 40-90%, poseen una cavidad en su parte central (Figura 15) con capacidad de unir una multitud de ligandos como esteroides (desoxicolato) (217, 218), ácidos grasos, citosinas, y flavonoides, así como actividad ribonucleasa. Son proteínas termolábiles y sensibles a las proteasas digestivas (219), de ahí que su expresión clínica más frecuente sea asociada a síntomas locales y leves. La distribución taxonómica de los homólogos de Bet v 1 es bastante limitada. Alérgenos del polen se han encontrado exclusivamente en el orden *Fagales* (aliso y avellano), mientras que en los relacionados con alimentos, han sido frecuentemente asociadas. En frutas como kiwi (220), en la familia *Lauraceae* (fruta de la pasión) (221), y en Ericales (kaki o persimon) (222), así como de la familia *Rosaceae*, como manzana (Mal d 1) (223) y otras frutas de hueso, tales como melocotón (Pru p 1), y cereza (Pru av 1) (219, 224). Y en vegetales de la familia *Apiaceae* (zanahoria, apio, hinojo y especias) (225, 226), y *Fabaceae* (soja y cacahuete) (25, 158).

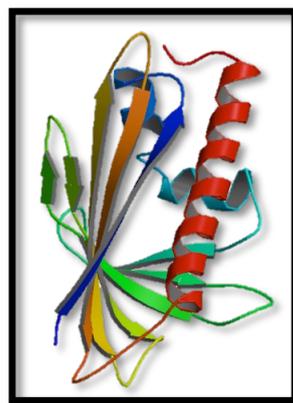


Figura 15. Estructura tridimensional del polen de abedul Bet v 1.

La familia de **proteínas de transferencia de lípidos (LTP, PR-14)**, fueron identificadas en extractos con un medio alcalino-neutro y punto isoeléctrico entre 9 y 10. Nombradas así por su habilidad para unir y transportar multitud de diferentes moléculas de lípidos (227), además de por participar en la síntesis de polímeros lipofílicos depositados en las superficies externas de órganos aéreos (228). En base a su peso molecular se pueden subdividir en dos proteínas no específicas: nsLTP1 de 9 KDa (la principal) y nsLTP2 de 7 KDa (191, 229-232). Forman una familia de polipéptidos básicos de unos 95 residuos de aminoácidos con diferentes grados de identidad de secuencia (del 30-95%) entre los amplios y distintos miembros que la componen (Figura 16 y 17). Su estructura muy conservada entre distintas especies (panalérgenos) de cuatro puentes disulfuro incluye cuatro alfa-hélices separadas por giros cortos y una cola C-terminal no estructurada, con un túnel interno hidrofóbico que atraviesa todo su eje (227) (Figura 18). El hipotético papel del tráfico de lípidos intracelular no es consistente con su ubicación extracelular, por ello se han realizado sucesivos experimentos demostrando que primariamente se localizan en el citosol para posteriormente ser excretadas y acumularse en la pared celular como moléculas estables presentes en la parte aérea de las plantas (como son hojas, semillas y flores), principalmente en la piel de las frutas (233, 234), excepto en ciruela y albaricoque (235). Por todo ello se explica y demuestra tras provocaciones doble ciego, su alta resistencia a la proteólisis, a la degradación endolisosomal, cambios bruscos de pH, o a tratamientos térmicos extremos como el procesado secuencial con ondas de ultrasonidos o microondas (236-240), y la influencia de su potencial alergénico por su asociación a síntomas sistémicos y graves, incluso tras la ingesta de alimentos y bebidas procesadas (241-245).

Foods	10	20	30	40	50	60	70	80	90	%id.												
Pru p 3	-ITCGQ	-VSSALAPCI	PIVVRGGGAV	PA--	CCNGIRNVN	NLARIT	TPDRQAACN	CLQLSASV	PGVNP	PNNAAAL	PGK-CGV	SIPIYK	ISASTNC	ATVK	--							
Mal d 3	-ITCGQ	-VSSSLAPCI	GVVRGGGAV	PA--	CCNGIRTV	INGLARIT	TADRQTAC	NCLNLAGS	ISGVNP	PNNAAAL	PGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	80							
Pru ar 3	-ITCGQ	-VSSSLAPCI	GVVRGGGAV	PA--	CCNGIRNVN	NLARIT	TPDRQAAC	NCLQLS	SGSISGV	PNNAAAL	PGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	91							
Pru av 3	-ITCGQ	-VSSNLAPCI	AVVRGGGAV	PA--	CCNGIRNIN	NLARIT	TADRQTAC	NCLQLS	ASVPGV	PNNAAAL	PGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	88							
Pru d 3	-ITCGQ	-VSSNLAPCI	PIVVRGGGAV	PA--	CCNGIRNVN	NLARIT	TPDRQAAC	NCLQLS	ASVPGV	PNNAAAL	PGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	95							
Vit v 1	TVTCGQ	-VASALSP	CLSLQKGGAV	PAG--	CCSGIKSL	NSAART	TGDRQAAC	CLLTF	SSSVG	INNYGL	ASGLPGK-CGV	SVPIYK	ISASTNC	ATVK	61							
Cor a 8	SLTCGQ	-IKGNLTP	CVLMLKNGG	VLP	PS--	CCKGVRAV	NDASRT	TSDRQ	ASACN	CLRDTAK	GIAGLN	PNLAAAL	PGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	59					
Zea m 14	ATSCGQ	-VASAIAP	CLSVARGGG	SGP	SAG--	CCSGVRS	LNNARIT	TADRR	ACNCLN	AAAGV	SGLNAG	NAASIP	SK-CGV	SIPIYK	ISASTNC	ATVK	63					
Hor v LTP1	-LNCGQ	-VDSKMKP	CLTVVQGG	PPSGE--	CCNGVRL	DNQ	QSSGDR	OTV	CNCLR	GIARGI	HNLN	LNNAA	ASIP	SK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	44				
Dau c LTP	-LTCGQ	-VIGALAP	CLGLRSQ	VNVVPL	TCCNV	VRLN	NARIT	TLD	KRTAC	CLLROTAN	AVTGL	NLNAAL	CLP	AR-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	55				
Cas s 8	SITCGQ	-VSKSLMP	CLTVLKS	NGGSP	PPGT	CCQ	GVKL*											46				
Asp o 1.01	-ITCGA	-DSKIG	-PGVS	VMGK	GPL*													43				
Asp o 1.02	-ITCGQ	AVSMIS	-PCVNV	ARG*														50				
Lac s 1	ATSCGQ	-VTPANLA*																64				
Latex																						
Hev b 12	-ITCGQ	-VQSALV	CLSLV	LKTTG	PTE	PAT-	CCNGVRT	INNA	KTTAD	ERTAC	CLL	SAAGSV	KGLN	PTTV	AL	CLPGK-CGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	65		
Pollens																						
Par j 1	QETCC	T-MVRALM	PCLP	FPVQ	GKEKE	PSK	G-CC	SAKRLD	GETK	TGPO	VHACE	CIQTAM	KYSD	IDGK	LVSEV	PKH-CG	IVDSK	LPPIDV	NMDCKT	28		
Par j 2	EEACCK	-VVQDIM	PLHF	VKGE	KEPS	SKE-CC	STKLS	EEVKT	TEQ	KREAC	CI	VRAT	KGIS	IGNEL	VAVE	PKR-CD	IKTLP	PPITAD	FDCKSI	27		
Ara t LTP	ALSCGS	-VNSNLA	ACIG	VLQ	GGV	IP	PA--	CCSGV	KNLS	IAKTT	TPDRQA	ACNC	IQGA	ARAL	GSGLN	NAGRA	AGIP	KACGV	NIPIYK	ISASTNC	ATVK	53
Art v 3	ALTCS	D-VSNKIS	PCLS	MLK	QGG	VP	AD--	CCAG	VKGL	ND*										40		
Ole e 7	APSQST	-VITALLT	SCVSI	IDDQ*																19		

Figura 16. Secuencia de aminoácidos alineados para alimentos, látex y pólenes pertenecientes a la familia LTP. En la columna de la derecha se indica el porcentaje de identidad respecto a Pru p 3.

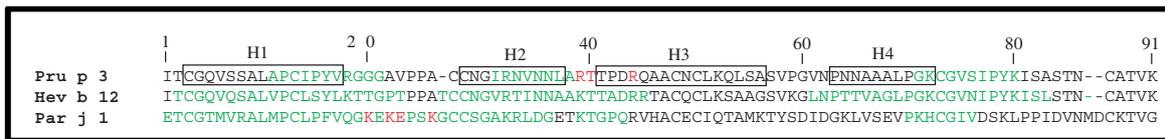


Figura 17. Se muestra en verde la presunta secuencia de epítomos para IgE. Marcado sobre rectángulo las 4 alfa-hélices.

Pueden actuar como verdaderos alérgenos gracias a su capacidad para sensibilizar de forma primaria vía gastrointestinal (127, 228, 246), siendo Pru p 3, el alérgeno mayor del melocotón, el responsable (216). Este transporte transcelular parece seguir una cinética de Michaelis-Menten, lo que implica la existencia de un receptor específico en los desmosomas para Pru p 3 con papel en la promoción de una respuesta Th2, aumento de IL-25, IL-33 y TSLP (del inglés, *Thymic stromal lymphopoietin*) (247-249). Adicionalmente se ha descrito la posibilidad de sensibilizar vía inhalada (250), o por contacto cutáneo (234, 251), en pacientes sin polinosis asociada (128).

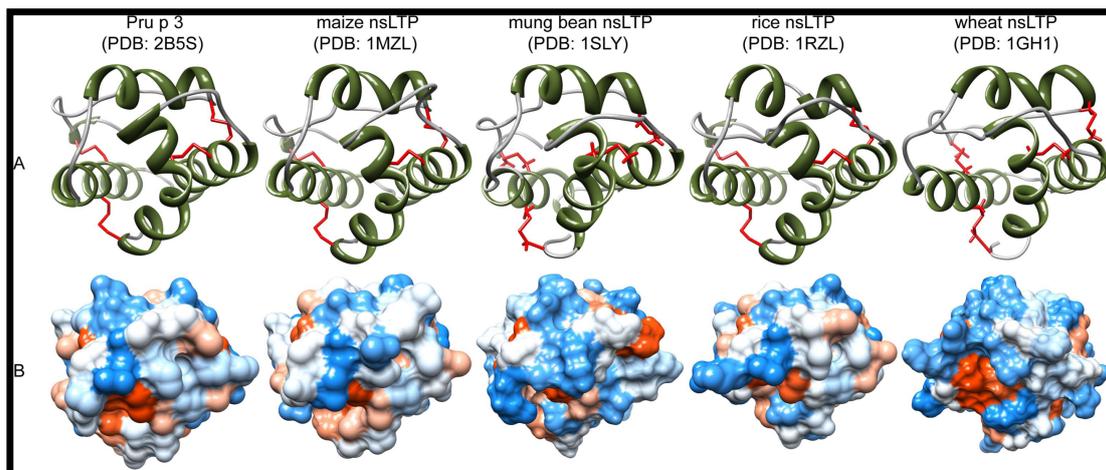


Figura 18. Alfa-hélices en verde. Puentes disulfuro en rojo. Zonas lipofóbicas en azul y lipofílicas en rojo. Modelos obtenidos de la Base de Datos de la estructura de las proteínas ([http:// www.pdb.org/pdb/home/home.do](http://www.pdb.org/pdb/home/home.do)).

2.3. Epidemiología de alérgenos de origen vegetal

La implicación de los vegetales en alergia a alimentos está relacionada con su presencia habitual en la dieta, donde el consumo de frutas, hortalizas, cereales, legumbres, frutos secos, y especias, constituye la dieta básica, y habitual, en la mayoría de países y culturas. Sin embargo, una ingesta regular de fruta, calculada alrededor de 160 gramos al día, se ha demostrado como un factor protector frente al desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes o de riesgo cardiovascular (252).

Según el estudio epidemiológico, transversal prospectivo, realizado en España Alergológica 2005 (44), sobre 4991 pacientes que acuden a una consulta de alergia, el 7,4% presentan alergia alimentos, siendo las frutas frescas la causa más frecuente en pacientes mayores de 5 años, en el 33,3% de los casos, seguido de los frutos secos en el 26%. Analizando otros estudios publicados hasta la fecha, hay que tener en cuenta no sólo el tipo de estudio diseñado, la localización, la edad de la población, sino también qué se entiende por alimentos de origen vegetal. Resultan así, muy escasas las publicaciones de calidad por lo que actualmente se desconoce la epidemiología e historia natural de gran cantidad de alimentos de origen vegetal. Así, en el estudio realizado por Kanny sobre la población general de Francia, la prevalencia del 33% de alergia alimentos se refiere fundamentalmente a frutas, hortalizas, y legumbres (253).

2.3.1. Frutas:

Muchas son las frutas implicadas en procesos alérgicos, y los alérgenos descritos en ellas pertenecen en su mayoría al grupo de proteínas de defensa y a las profilinas (ver anexo 1, Tabla) (254). Zuidmeer y cols. realizaron una búsqueda de los estudios sobre alergia alimentos publicados desde 1990 hasta 2008, encontrando sólo 4 estudios donde la prevalencia fue estimada tras la realización de pruebas de provocación. Esta varía entre un 0,1-4,3% de forma general y de hasta un 3,5% en referencia a alergia a cualquier fruta, siendo del 8,5% a manzana, y del 6,8% a cítricos (29). Según Venter y cols., tras su estudio de una cohorte de niños nacidos entre 2001 y 2002 en Reino Unido seguidos de forma prospectiva, las frutas más comúnmente referidas fueron las fresas y los cítricos (30). En el área de España y Portugal, la mayor prevalencia de sensibilización a profilinas se encuentra entre los pacientes sensibilizados a pólenes de gramíneas (hasta un 75%) (254) con alrededor de un 13% de pacientes sensibilizados a la profilina de cereza en Alemania e

Italia, con valores rondando el 50% en pacientes alérgicos al melocotón (161), y de hasta un 42% para sensibilización a la profilina del plátano o piña (255).

En contra del escenario anterior, la sensibilización a LTP, o a proteínas de defensa vegetal PR-14, es particularmente importante en el área Mediterránea y Portugal (256, 257). Aunque su prevalencia no ha sido establecida en población general, se ha detectado sensibilización en el 47-100% de los pacientes que consultaban por alergia a frutas (254), mientras que la incidencia en Centro y Norte Europa hasta la fecha parece ser muy limitada (258). Respecto a los pólenes, se ha descrito un aumento de la sensibilización a polen de parietaria (*Par j 2*), *platanus*, y *artemisía*, ambos de la familia LTP nativos de la zona mediterránea (259), sin embargo, no se ha encontrado asociación con la alergia a alimentos (128, 234, 260). Esto junto con el dato de que en hasta un 58,69% de los casos es responsable de síntomas sistémicos (129), reafirma la hipótesis de la LTP como sensibilizador primario (236). De entre las frutas, la familia *Rosacea*, es la que con mayor frecuencia se ha descrito como responsable de alergia a alimentos de origen vegetal en mayores de 5 años, induciendo hasta 70,7% según lo publicado en *Alergológica* 2005 (44). Estos datos han sido confirmados en otros estudios tanto de España como de la cuenca Mediterránea (28, 125, 261, 262). El melocotón es la principal fruta rosácea implicada en dichas áreas, siendo Pru p 3 el alérgeno mayor (100% positivo en el síndrome LTP) (44), con un 75,6% de los pacientes que referían alergia a dicha fruta en el estudio llevado a cabo por Pascal y cols en 2012 (139), e IgE específica frente a él en hasta un 17% de 785 participantes del estudio español llevado a cabo por Barber y cols (263). La alergia a melocotón ha sido la más frecuentemente asociada a manzana (89,9%), mostrando como factor de riesgo para reacciones graves el estar sensibilizado a Mal d 3, con hasta un 35% de reacciones sistémicas descritas tras la ingesta de manzana (205), y menos de un 10% de sensibilización a Bet v 1 (234).

2.3.2. Hortalizas:

De entre los pacientes sensibilizados a algún tipo de hortaliza (7%) como el tomate o la lechuga (264), las frutas frescas estaban implicadas en hasta el 30% de los casos de los sujetos españoles estudiados en *Alergológica* 2005 (44). Se asocia generalmente a su ingesta no cocinada, y respondiendo al patrón de reactividad cruzada según la existencia o no de polinosis asociada, por familias alérgicas muy distintas (Ver anexo 3, Tabla). En países del Norte y Centro Europa es mucho más frecuente, pero en ese caso va asociada al síndrome apio-zanahoria-artemisía, con hasta un 40% de sensibilización a apio y un 25% a

la zanahoria, y al síndrome abedul-especias (125, 225). En niños, la prevalencia se estima que está por debajo del 0,5%, aunque en un estudio sobre niños suecos de hasta el año y medio de edad se ha obtenido una prevalencia del 13,7%, y del 3% en adolescentes tras testar la IgE específica (29).

2.3.3. Frutos secos:

Los frutos secos (Ver anexo 2, Tabla), destacan como una de las principales causas de reacciones graves (265), llegándose a considerar como verdaderos factores de riesgo para un desenlace fatal (266). Su clínica es frecuente tanto en población pediátrica como adulta, pudiendo ser monosensibilizados (sensibilización a un solo fruto) o polisensibilizados, siendo el órgano más frecuentemente implicado la piel en forma de urticaria. Existen variaciones sobre la posibilidad de manifestar un tipo u otro de reacción en base a las características del alérgeno principal implicado y a las diferencias regionales de la población (265). La mayoría de los alérgenos pertenecen a unas pocas familias (Figura 19).

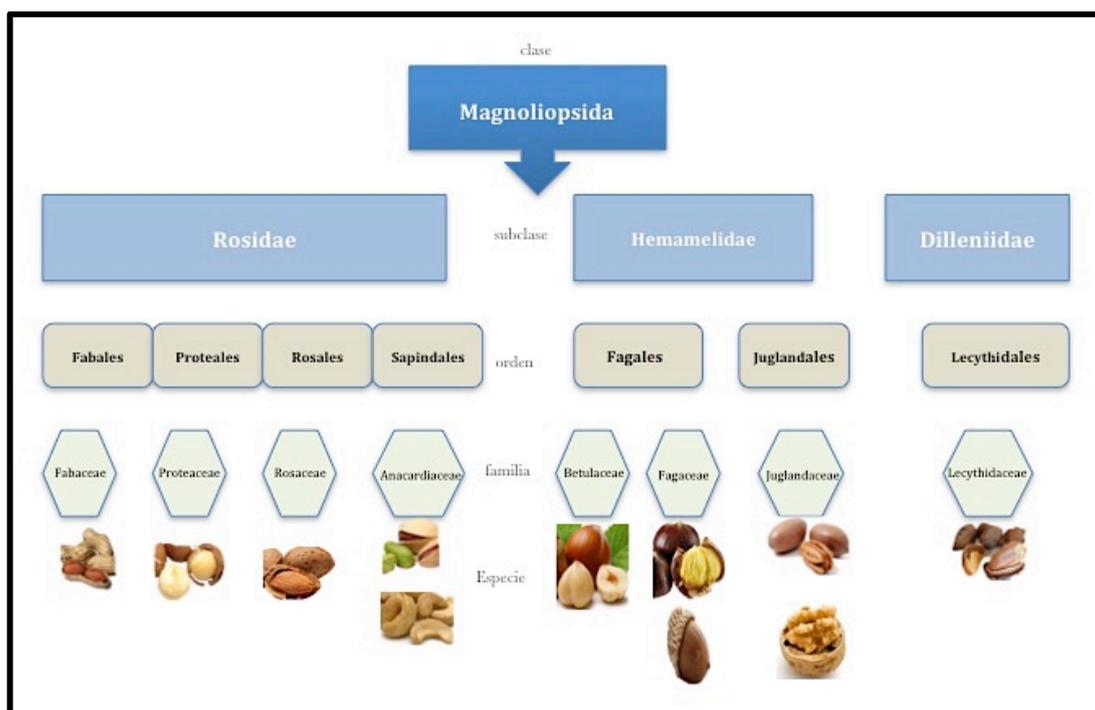


Figura 19. Representación orden taxonómico familias de frutos secos.

Aunque el cacahuete pertenece a la familia de las leguminosas, del orden botánico Fabales, en los estudios se suele englobar dentro del amplio “frutos secos”, ocupando el segundo puesto como causa de alergia alimentaria en adultos (44). Así, a pesar de que la reactividad cruzada *in vitro* es alta (86%) (267), la coexistencia de alergia entre el cacahuete y el resto de frutos secos es sólo del 20-59% (268), siendo aún menor si se consideran los datos tras

pruebas de provocación (7,4%) (269). La prevalencia de alergia al cacahuete se ha duplicado entre la población infantil occidental en la última década, alcanzando cifras del 1,4-3% (30, 270, 271). Raramente es superada en la edad adulta, siendo causa de reacciones anafilácticas y con un gran impacto psicosocial y económico tanto en los pacientes como en su familia (24). La sensibilización a Ara h 2 considerada como predictora de alergia al cacahuete (272), está presente en la población española en menos del 5% de los pacientes, siendo Ara h 9 la identificada en el 42% de la población (273). Las diferencias geográficas se ponen también de manifiesto con la sensibilización a Ara h 9 y Cor a 8 en los países del sur de Europa, y la sensibilización a Ara h 8 y Cor a 1 en Suecia y Dinamarca, tan importante por resultar en reacciones graves sistémicas en las primeras debido al síndrome LTP, con una co-sensibilización a Pru p 3 entorno al 38,1% y 16,7% respectivamente (273), y leves en las segundas, en las que predomina la sensibilización por homólogos del Bet v 1 (274). Del mismo modo encontramos síntomas periorales casi de forma exclusiva en los sensibilizados por profilinas (156), como para la avellana.

Tras el cacahuete, en niños se ha encontrado que los frutos secos más frecuentes son la nuez, nuez pecana, y la almendra (275). En Europa, la avellana se considera la principal responsable (125), sobre todo debido a la reactividad cruzada descrita por el polen de abedul y su alérgeno Cor a 1, aunque en población española y del norte de Italia se deba al llamado síndrome LTP por el alérgeno Cor a 8 (276). En nuestro país e Italia, la almendra y la nuez (Jug r 3) se señalan como la principal causa de alergia (277, 278) y la sensibilización a las frutas de la familia Rosacea (261, 279) debida al síndrome LTP (280), aunque no se ha establecido su prevalencia en población general.

2.3.4. Legumbres:

Las leguminosas son plantas ricas en proteínas de alto valor biológico, que se caracterizan porque su fruto está dentro de vainas, y por su alta proporción de reacciones severas a pesar de la posibilidad de co-sensibilización por pólenes (281). En un estudio español de base pediátrica se encontró que el 82% presentaban co-sensibilización por polen de gramíneas, olivo y *Bétula* entre los alérgicos a guisante y judía (282). En los niños además, la proteína de soja es el primer alimento de origen vegetal causante de enterocolitis (283). La alergenicidad viene definida en casi su totalidad por globulinas y albúminas (ver Anexo 4, Tabla), donde el cacahuete, la soja, y la lenteja son los principales responsables, seguidos del garbanzo (284), guisante, y judía verde (285).

Con cierta frecuencia se asume en la práctica clínica que se deben evitar todas las legumbres (lenteja, garbanzo, guisante, judía, soja, almorta, altramuza, y haba) cuando se

diagnostica de alergia a cacahuete, no obstante, la proporción de pacientes que también reaccionarán a otras leguminosas, aunque elevada, es variable (286-288) atendiendo a diferencias geográficas, con una prevalencia de co-sensibilización del 17% en los países del área Mediterránea, principalmente para la asociación lenteja-garbanzo-guisante, y alubia pinta-blanca (287). Ocupando la alergia a leguminosas en la edad adulta en España el séptimo lugar en prevalencia con un 7% (44), por reacciones clínicas graves tras la ingesta de la LTP de las lentejas (289), incluso tras hervirlas (Len c 2) (290) con homología con la proteína biotinilada del guisante, o como resultado de su alérgeno mayor Len c 1 (291).

Una alta probabilidad de reacciones anafilácticas viene de la mano de la alergia a soja, en función del material que provoque la exposición (extracto, semilla intacta, o harina), y de la vía de sensibilización. Se han descrito incluso reacciones por lecitina de soja usada como excipiente de algunos inhaladores o medicamentos para nutrición parenteral, así como de forma inadvertida en pizzas y embutidos (292, 293). Concretamente se tienen datos de reactividad con Ara h 1 del cacahuete, y guisante (294), con una prevalencia del 1,5% en un metaanálisis realizado en población europea (270), del 1,8-4,4% en estudios realizados en niños con dermatitis atópica, del 1,2% en casos basados en historia sugestiva de alergia, del 3,2% en base a sensibilización por IgE sérica, y del 0,3% en base a provocación oral, pero no existen publicaciones específicas sobre su prevalencia. Y sobre harina de altramuz, usada sobre todo en repostería por su sabor dulce, con una proporción de sensibilización que varía del 4 al 35% (295).

2.3.5. Semillas:

Las semillas cobran gran interés por sus reacciones tras la ingesta como alérgenos ocultos, ya que se usan tanto en fresco como en ingredientes de salsas y aceites, o en la industria cosmética y farmacéutica como vehículo de administración intramuscular. En un 50% producen síntomas leves de SAO (296), mientras que en hasta un 79% se describen como reacciones anafilácticas (297) tras su ingesta, inhalación de su harina, o por contacto; y muy graves, tanto para mostaza, sésamo, semilla de girasol, lino y amapola (298-306).

No existen datos exactos ya que la mayoría de los estudios no están diseñados para analizar la prevalencia de alergia a semillas. Estas son agrupadas en una única categoría por su alta frecuencia de sensibilización debida a albúmina 2S como alérgeno principal aún cuando pertenecen a familias botánicas diferentes. La prevalencia más alta estimada de alergia al sésamo alcanza el 0,8%, siendo la tercera causa más frecuente en Israel (307). Es en Francia, donde la producción y consumo de mostaza es mayor, donde se encuentran datos de prevalencia entre 1,1 al 8,9% en niños y de menos del 1% en pacientes adultos

(296), por Sin a 1 (marcador de sensibilización) (170). A pesar de que la sensibilización se considera sobre todo en la edad adulta, con una tendencia a la persistencia (308), se han descrito casos de sólo dermatitis atópica como la manifestación más frecuente (309). En España, hasta el 52% de los pacientes alérgicos a la mostaza presentan también clínica con otros alimentos de origen vegetal como las rosáceas, legumbres, y frutos secos (310), predominando en población adulta (298). Sin a 3 se muestra como predictor de reacción grave (311), así como a la semilla de girasol (Hel a 3), un alimento muy frecuentemente consumido en nuestra zona, además de un consumo emergente de sésamo con una prevalencia estimada de <1%, además de con reactividad cruzada con semillas de amapola (312, 313). Se relacionan tanto con reacciones anafilácticas a pesar de pruebas cutáneas negativas (314), como con dermatitis de contacto.

2.3.6. Cereales:

La alergia a cereales se puede presentar como una gran variedad de síntomas clínicos, no sólo por sus proteínas alergénicas implicadas, sino por su empleo en cocina tan diverso, desde agentes espesantes, productos cárnicos procesados, bebidas, harinas, hasta su fruto en grano en panes y ensaladas. Además, resulta interesante y a veces complejo el diagnóstico diferencial con la celiaquía y la sensibilidad al gluten no celíaca (315). Son escasas las publicaciones que no sean sobre enfermedad respiratoria ocupacional, a pesar de ser considerada en Estados Unidos como una de las causas más frecuentes de alergia alimentaria en la infancia, principalmente para el trigo. Es una de las sensibilizaciones que tiende a desaparecer con la edad, hallándose una prevalencia en la población española del 3,3% (44) y >3% en varios estudios sobre pacientes adultos de Alemania y Reino Unido (29).

El trigo es uno de los diez alimentos que más frecuentemente produce alergia en la infancia (29). Es el principal cereal de la familia de las gramíneas (*Poaceae*), con relación taxonómica con el resto de sus miembros, y patrón variable de reactividad cruzada, que les hace generalmente ser excluidos todos de la dieta ante el diagnóstico con uno de ellos (166), sobre todo con centeno y cebada, pero también con avena (316). Su perfil alergénico es complejo, y aunque lo más probable parece ser por una sensibilización a varios más que a uno solo, se describen cuadros de hipersensibilidad según el implicado (317). Los **inhibidores de alfa-amilasa/tripsina** se asocian con cuadros por inhalación, ingestión, o dermatitis atópica en niños y adultos (318). Las **gliadinas y gluteninas** de alto y bajo peso molecular como Tri a 36 (165), se han descrito como desencadenantes de dermatitis atópica (319, 320), y reacciones anafilácticas (321). Mención especial merece ω -5gliadina

(Tri a 19), descrita como marcador de anafilaxia por ingesta de trigo en niños, y como el mayor responsable de anafilaxia inducida por ejercicio físico (45, 166, 322), aunque también es posible la implicación de otros cofactores como la ingesta de alcohol y la toma de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), pues ambos facilitan la absorción de gliadina (323). La **LTP** del trigo (Tri a 14) contribuye como el alérgeno mayor del síndrome del panadero por inhalación (251), así como alérgeno alimentario con clínica anafiláctica, y en anafilaxia inducida por cofactores (324), con la peculiaridad de que estos pacientes presentan pruebas cutáneas e *in vitro* positivas para Pru p 3, pero baja reactividad entre las LTPs de otras familias (325). Se han descrito además otras LTPs responsables de clínica inhalatoria y sistémica tras su ingestión en cereales como maíz, arroz, y cebada (326, 327). Y aunque bioquímicamente se recoge a Tri a 12 como profilina, la aparición de síntomas es infrecuente (328). Respecto a otros pólenes, se ha descrito reactividad cruzada entre el platanero de sombra y maíz (329); y entre otros alimentos como soja, cacahuete y arroz (330).

2.4. Síndromes de reactividad cruzada.

Podría resultar comprensible la existencia de trascendencia clínica en la alergia alimentaria asociada entre antígenos de especies filogenéticamente relacionadas, por la mayor probabilidad de que los aminoácidos que constituyen el epítipo de unión a IgE sean idénticos, y no una mera sensibilización cruzada *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, debido a los panalérgenos, como ha sido comentado anteriormente, también se da entre alérgenos de especies distantes, como por ejemplo entre pólenes y frutas, hortalizas y frutos secos entre otros. Dichos panalérgenos pueden ser la principal causa de los síndromes de reactividad cruzada:

2.4.1. Síndrome LTP:

Conocido así por el perfil no homogéneo que presentan los pacientes sensibilizados a LTP, en base a su amplia distribución en el reino vegetal y a la estrecha relación estructural y de secuencia conformacional, dado que no sólo reconocen LTPs de la familia *Rosácea*, sino también de otros alimentos e incluso pólenes (331-333). Hasta ahora el Subcomité de Nomenclatura del Alérgeno de la Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas ha

registrado 39 LTPs alergénicas de las cuales 18 proceden de frutas, 9 de polen de árboles y malezas, 7 de verduras, 4 de frutos secos y semillas, y 1 de látex (228, 334-338).

En la población mediterránea, desde los años 90 se viene detectando las LTPs como el principal alérgeno, no sólo en frutas como melocotón, manzana, o cerezas, y otros alimentos de origen vegetal (264, 339-341), sino en el resto de frutas de la familia Rosácea (albaricoque, cereza, ciruela, fresa, manzana, melocotón, nectarina y pera) (128), publicándose los primeros artículos sobre población Italiana y Española en 1999 tras aislar la proteína en melocotón (*Prunus pérsica*) (234, 342), y manzana (*Malus domestica*) (205, 343), con una identidad de secuencia de hasta el 84%, la más elevada de su familia. Además se han caracterizado en numerosas frutas: albaricoque (Pru ar 3) (340), cerezas (Pru av 3) (335, 344, 345), ciruela (Pru d 3) (346), fresa (Fra a 3) (347), pera (Pyr c 3) (348), uva (Vit v 1) (241, 349), kiwi (Act d 10) (350, 351), plátano (Mus a 3), granada (Pun g 1) (352, 353), mora (Mor n 3) (354), naranja (Cit s 3) (355), mandarina (Cit r 3), y el limón (Cit l 3).

Se ha demostrado una elevada reactividad cruzada tanto *in vitro* como *in vivo* para varios de estos alérgenos, en especial con Pru p 3, el cual se ha usado como modelo de esta familia (325). También se ha identificado reactividad cruzada con otras fuentes vegetales como cereales, semillas, frutos secos y hortalizas, para espárrago (Asp o 1) (339), lechuga (Lac s 1) (264), tomate (Sola l 3) (341) o su semilla (Sola l 6 y 7) (356), apio (Api g 2 y 6) (357, 358), ajo, bayas Goji (359), col (260, 264, 338, 339, 357, 360, 361), hinojo (Foe v) (362), repollo (Bra o 3) (363), mostaza amarilla (Sin a 3) (169, 311, 333), semilla de girasol (Hel a 3) (305), trigo (Tri a 14) (321, 364, 365), cebada (Hor v) (244, 316), maíz (Zea m 14) (326), arroz (Ory s) (327), látex (Hev b 12) (366) con una secuencia de en torno al 65% (Figura 13), judías verdes (Pha v 3) (367), cebolla (*Allium cepa*) (332), lenteja (Len c 3) (289), garbanzo (Cic a), cacahuete (Ara h 9) (273, 368), castaña (Cas s 8) (369), avellana (Cor a 8) (274, 370, 371), nuez (Jug r 3) (372), almendra (Pru du 3) (373), Gly m 5 y 6 (374) de soja, y su cáscara (Gly m 2) por vía inhalada.

En pólenes se han descrito también proteínas alergénicas de la familia LTP (375). Se pueden establecer tres subconjuntos, y curiosamente ninguno atribuido a polen de gramíneas. Uno que incluye al polen de artemisa (Art v 3) (369, 376-378) y platanero de sombra (Pla a 3) (329), que comparten hasta un 46% de secuencia con Pru p 3; otro para parietaria (Par j 1 y 2) (379, 380) y polen de olivo (Ole e 7) (381, 382), con una correspondencia por debajo del 35%; y otro para ambrosía (Amb a 6) y ciprés (375).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Los pacientes que son diagnosticados de síndrome LTP presentan un fenotipo especial con predominancia de reacciones sistémicas (383). Además, existe la dificultad añadida de no poder prever cuál es la ingesta mínima capaz de desarrollar reacción de hipersensibilidad en un determinado paciente, ni si estarán sensibilizados a todo el grupo de *Rosáceas* o además a otros alimentos. También hay que tener en consideración que con cierta frecuencia las reacciones anafilácticas comienzan con síntomas gastrointestinales o en orofaringe (139, 384, 385), e incluso la posibilidad de que la reacción sea desencadenada sólo en presencia de un cofactor, como puede ser el ejercicio o la toma de AINE (386). Además, existen casos de dermatitis o urticaria de contacto con tomate, lechuga, apio, y zanahoria, y por su uso como aromatizante de fármacos o aceites (387), o incluso por asma ocupacional del ama de casa, así como por pimienta (388-390).

La edad de inicio de este síndrome suele ser más tardía (en torno a 19 años) que el origen de alergia por sensibilización a Ara h 2 (44), a pesar de estar expuestos en alta cantidad de forma estacional a edades muy tempranas, y con una historia natural hacia la permanencia. El perfil geográfico se asocia a países del sur y del área Mediterránea, donde la presencia de vegetación del orden Fagales es muy escasa (391).

2.4.2. Síndrome abedul-alimentos vegetales:

Principal causa de polinosis primaveral en la población del norte-centro Europa, y en algunas zonas de Norte América y Australia, con sensibilización vía respiratoria y síntomas fundamentalmente locales y leves de alergia oral en más del 90% de los casos (392, 393), como responsable el alérgeno mayoritario del polen de abedul (Bet v 1), avellano, aliso, o carpe. El 70% de los pacientes polínicos a abedul refieren además síntomas con alimentos de origen vegetal (224), en particular la manzana, zanahoria, apio, y avellana (394). Las frutas pertenecientes a la familia de las rosáceas tienen significativamente más reactividad cruzada entre ellas que para otras familias botánicas de frutas (279), sobre todo manzana, pera, albaricoque y cerezas. Según el estudio de Fernández-Rivas y cols. (205), los pacientes de Austria, norte de Italia, y los Países Bajos referían significativamente menos reacciones a melocotón, siendo la avellana la que más se asociaba a manzana (73,3%). No se han encontrado datos en la bibliografía sobre reacciones tras el consumo de alimentos procesados o en conserva. Otros vegetales relacionados incluyen la familia apiáceas como apio, zanahoria, hinojo, anís, cilantro, y comino; variados como soja, patata, pimiento, y pimienta; y frutos secos como la avellana y el cacahuete (219). A pesar de que son proteínas termolábiles, sus epítomos T permanecen activos tras la digestión, por ello

también se han descrito casos de clínica cutánea por empeoramiento de dermatitis atópica (395).

Se ha identificado también profilinas (Bet v 2) como origen de sensibilización, aunque con escasa prevalencia (396).

2.4.3. Síndrome apio-artemisa-especias:

Parece que este síndrome se debe a homólogos de Api g 5, fosfogliceromutasa del apio, presentes en gran variedad de alimentos, tanto crudos como cocinados, de la familia de las umbelíferas tales como zanahoria, anís, hinojo, perejil, comino, y cilantro, además de en pimienta, mango, cebolla, ajo y pimienta (397).

La monosensibilización al polen de artemisa en centro y norte Europa permite distinguir este síndrome del anterior por sensibilización a Bet v 1. Esto es importante porque sus manifestaciones clínicas esperadas raramente son leves, originando reacciones de angioedema y edema de glotis, urticaria generalizada, e incluso shock anafiláctico (398).

2.4.4. Síndrome profilinas-frutas-tomate:

Se da de forma más frecuente en los países del área mediterránea (en torno al 40%) sobre pacientes polínicos por gramíneas (399), sin sensibilización asociada a LTP ni alergia a látex (400). Dado que los alérgenos implicados son muy poco resistentes a los tratamientos térmicos y enzimáticos (396), es de esperar que sus manifestaciones clínicas se relacionen con SAO (153, 401), quedando los pacientes asintomáticos tras la ingesta de alimentos cocinados. Los alimentos asociados con mayor frecuencia son las frutas de la familia rosácea como manzana (Mal d 4), fresa, cereza, pera (157, 159), y melocotón (161), así como el melón (160), la sandía, la naranja, el plátano, piña y el tomate (396).

2.4.5. Síndrome látex-frutas:

El primer caso clínico de alergia tras la ingesta de plátano en un paciente alérgico al látex se publicó en 1991 (402), coincidiendo con la universalización del uso del látex como medida de prevención primaria en enfermedades de transmisión sexual. Desde entonces, se han asociado un número creciente de frutas a este síndrome látex-frutas, principalmente plátano, aguacate, castaña, kiwi, patata, mango, y piña, y otras como papaya, tomate, yuca,

azufaífo, fruta de la pasión, y baya de Goji (199, 403-405), principalmente de las consideradas exóticas (406, 407). Aunque existe un alto grado de reactividad inmunológica (del 50-80% aproximadamente), la significación clínica parece mucho menor, en torno al 30% (408). La trascendencia de su estudio se basa en su alta prevalencia, en su presentación como potencial enfermedad ocupacional, y en la posible gravedad de las reacciones clínicas (193, 409). Mientras unos pacientes experimentan sólo SAO, cerca del 50% sufren reacciones sistémicas (410, 411). La sensibilización primaria al látex se cree que se produce en la mayor parte de los casos por vía inhalada. Varios alérgenos se han visto implicados como productores de este síndrome, Hev b 2 (β -1,3-glucanasa) (412), Hev b 8 (profilina) (255), y principalmente las quitinasas de clase I, Hev b 11, debido a su homología de hasta el 58% con el dominio heveína N-terminal, o Hev b 6.02 (413). Se ha demostrado que estas quitinasas se inactivan por el calor, pero resisten a la digestión, y curiosamente aumentan su alergenicidad ante tratamientos químicos usados en agricultura para potenciar la maduración de las frutas, como el etileno (201). Por ello, se entiende porqué inducen reacciones anafilácticas en hasta 42% de los casos (406) tras la ingestión de los alimentos en fresco. Además, se han identificado asociaciones genéticas con diferentes haplotipos del antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés *Human leukocyte Antigen*) según el paciente sea alérgico sólo al látex, o en combinación con alimentos vegetales (414).

2.4.7. Otros síndromes que requieren estudios adicionales:

.- Síndrome ficus-frutas. Suele manifestarse con anafilaxia tras la ingesta de higo (415), en alrededor de un tercio de pacientes, y también de kiwi y otras frutas como plátano, piña, aguacate y papaya (416). Se produce por la reactividad por tiol-proteasas del polen de *Ficus benjamina*. Esta especie, aunque originaria del sur de Asia y Australia, tiene una amplia distribución y se encuentra en el interior y exterior de los hogares como planta ornamental, con una polinización perenne.

.- Síndrome ambrosía-melón-plátano (398). Este síndrome se produce por profilinas, incluso en zonas libres de polen de ambrosía. Los síntomas suelen ser limitados a la zona de la orofaringe tras la ingesta de dichas frutas, y en hasta un 50% también de otras pertenecientes a la familia cucurbitáceas (417).

.- Y otras asociaciones de alergia alimentos debidas a polinosis por malezas, como el síndrome *plantago*-melón; síndrome parietaria-pistacho; o el síndrome *chenopodium*-frutas por melocotón, plátano y melón.

2.5. Diagnóstico

Para llevar a cabo el diagnóstico de alergia alimentos es necesario comprobar que éstos sean la causa de los síntomas referidos por el paciente debido a un mecanismo inmunológico. De hecho, es frecuente que los pacientes achaquen síntomas inespecíficos, como puede ser cefalea o hinchazón abdominal, a los alimentos dentro de “su búsqueda” de una causa que los explique (28). La realización de un diagnóstico correcto es el primer paso y fundamental para la aplicación de un tratamiento adecuado, mas si tenemos en cuenta que aunque en adultos, la eliminación de la dieta de alimentos de forma aislada no suele resultar en consecuencias nutricionales o modificaciones del estilo de vida relevantes, en niños esta restricción puede tener mayores consecuencias. Los pilares en los que se fundamenta el diagnóstico se focalizan en identificar el alimento sospechado y determinar cuál y si es probable la implicación de un mecanismo inmunológico mediante una buena historia clínica y examen físico. Esto dirigirá la necesidad de prescripción de posteriores pruebas complementarias (cutáneas e *in vitro*) para demostrar la presencia de sensibilización (IgE específica frente a un alimento) y de pruebas de provocación oral para evidenciar la relevancia clínica de la sensibilización detectada (Figura 20) (418).

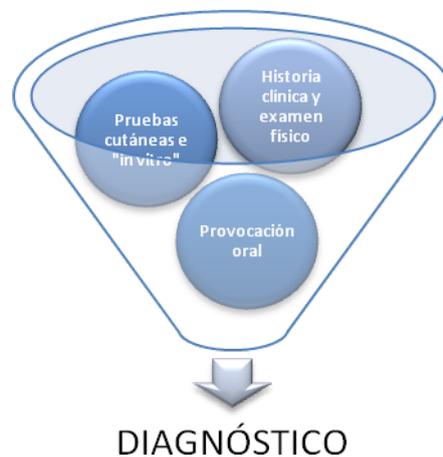


Figura 20. Esquema elementos para el diagnóstico alergia alimentos.

2.5.1. Historia clínica:

La anamnesis es el elemento diagnóstico más valioso. Lo principal es identificar la secuencia de ingestión del alimento con la aparición de una clínica compatible dentro de un intervalo de tiempo inmediato, generalmente de cinco a diez minutos, aunque según las guías, una reacción anafiláctica puede darse hasta dentro de las dos primeras horas tras la exposición al alimento, o incluso algunas más si se precisa la presencia de un cofactor. Los síntomas desaparecen aproximadamente una hora después, aunque existe la posibilidad de reacciones bifásicas y de anafilaxia resistente a tratamiento. Así por ejemplo, una reacción urticarial que persista durante más de 5 días no sugiere causa alérgica. Los síntomas deben ser los típicos de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, que deben recogerse de manera rigurosa, pues no existe ningún signo patognomónico y es necesario establecer un diagnóstico diferencial con toxicidad, intolerancia, u otras manifestaciones de patologías que simulen una respuesta alérgica tal y como se han mencionado en capítulos previos de esta tesis.

Dado que una reacción alérgica alimentaria puede darse a cualquier edad, es interesante conocer los alimentos, y la clínica que con más frecuencia están relacionados a las diferentes edades, así como la epidemiología y prevalencia en las diferentes áreas geográficas y sus asociaciones. El identificar el alimento/s responsable es otro punto destacado. Su buena tolerancia previa no descarta su implicación, sin embargo, su ingesta sin reacción con posterioridad sí. La hipótesis de la sensibilización al alimento sospechado se refuerza con la existencia de clínica anterior con otros alimentos relacionados, la frecuencia de los episodios sufridos, y su distribución en el tiempo, como en el caso de un alimento de presencia en el mercado sólo estacional. La vía de exposición, la cantidad, y la manera en la que el alimento iba procesado, también orienta al diagnóstico. Así por ejemplo, una reacción anafiláctica tras la ingesta de una mermelada, de una salsa de tomate frito, o de un surtido de frutos secos tostados, pueden descartar la implicación de alérgenos lábiles, aunque el umbral para desarrollar una reacción y su tipo, dependerá en parte también del grado de sensibilización del paciente (26). Una labor más meticulosa será necesaria para conocer el causante ante comidas con muchos ingredientes o productos manufacturados, que pueden contener alérgenos ocultos en forma de espesantes o contaminantes durante la cadena de fabricación. Para ello, pueden ser de utilidad la elaboración de diarios dietéticos prospectivos, pues en muchas ocasiones al diagnóstico se llega tras la reproducibilidad de los síntomas con la exposición (con el riesgo que esto conlleva en un entorno no controlado), que pueden ser semejantes, pero no necesariamente idénticos, y la resolución cuando se elimina de la dieta, siendo el primer

alimento a considerar el que el paciente ya se conozca como alérgico. Por ello, se resalta la importancia de una legislación de protección alimentaria en la que se realice un correcto etiquetado de los alimentos así como de sus componentes alergénicos tanto envasados, como consumidos fuera de casa (419-421). En España, las exigencias actuales se recogen por el Reglamento de la Unión Europea número 1169/2011 y el Real Decreto 1245/2008, con los denominados 14 “alérgenos alimentarios principales”:

1. Cereales que contengan gluten, a saber: trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas y productos derivados, salvo: a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa; b) maltodextrinas a base de trigo; c) jarabes de glucosa a base de cebada; d) cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevo.
4. Pescado y productos a base de pescado, salvo: a) gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides; b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja, salvo: a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados; b) tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja; c) fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja; d) ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), salvo: a) lactosuero utilizado para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola; b) lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir: almendras, avellanas, anacardos, nuez pecana, nuez de Brasil, nuez de macadamia o de Australia, y productos derivados, salvo los frutos de cáscara utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
9. Apio y productos derivados.
10. Mostaza y productos derivados
11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
12. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro en términos de SO₂ total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.

13. Altramuces y productos a base de altramuces.

14. Moluscos y productos a base de moluscos.

Especificando la información que los contiene, no su cantidad que en ocasiones parece ser imposible de conocer. De hecho, existen distintos trabajos en los que se ha investigado la presencia del alérgeno avisado en el etiquetado como “puede contener”, detectándose la presencia de avellana en el 25%, y de cacahuete (>1mg) en hasta el 75% de chocolatinas (422).

Otros datos que complementan la historia clínica son los antecedentes familiares de primer grado (como por ejemplo de angioedema hereditario), y personales del paciente así como el estado de salud mental, su ocupación, el consumo de tóxicos, la existencia de tratamientos farmacológicos concomitantes, la presencia de asma y su grado de control, o de rinitis, dermatitis atópica, o de alergias medicamentosas o al látex conocidas. Además, son datos a valorar el conocer las circunstancias en las que se desarrolló la reacción, como por ejemplo estando en un restaurante, en casa cocinando, o durante la realización de ejercicio físico, (423) (ver anexo 6, Figura).

No hay que olvidar apoyarse en una exploración física del paciente. El examen debe contemplar el peso, talla, una auscultación cardiopulmonar y de la oro-faringe, además de la piel, en la que se pueden buscar estigmas de estado atópico (conjuntivitis, queratosis pilar, pliegue de Dennie Morgan, dermatografismo...) o de nutrición deficitaria.

Todo ello lleva a abordar el balance de la probabilidad de la reacción, que determinará las posteriores pruebas complementarias a realizar (Figura 21).



Figura 21. Posibles factores influyen en el desarrollo de la reacción.

2.5.2. Pruebas cutáneas:

Las pruebas cutáneas intraepidérmicas o tipo prick se usan para demostrar la existencia de un mecanismo inmunológico mediado por IgE. Se trata de una técnica fácil, barata, reproducible, fiable, con resultados rápidos y una buena rentabilidad diagnóstica. En general, tienen una excelente sensibilidad (mayor del 80%) con un valor predictivo negativo (VPN) mayor del 90%, por lo que un resultado negativo en la prueba, generalmente descarta la posibilidad de una sensibilización mediada por IgE (424). No obstante, estos valores de sensibilidad y VPN solo se cumplen para alimentos que contengan proteínas estables que estén bien representadas en el extracto, y para una buena probabilidad pretest con una anamnesis compatible con una reacción de tipo alérgico (425), de ahí la importancia de la historia clínica.

Los principales inconvenientes y desventajas son consecuencia de las propiedades intrínsecas de la prueba (metodología, producción, interpretación, y mecanismo de acción), de la calidad del extracto usado, así como de las características de la población sobre la que se aplica, por ello se han realizado intentos de marcar unos puntos de corte que definan la reactividad clínica para cada alimento, aunque en la actualidad están lejos de tener rendimiento (426).

Típicamente se han considerado como un procedimiento seguro, pues el riesgo de exposición es ínfimo (427), siendo escasos, aunque existen, los casos de anafilaxia descritos en la literatura tras su práctica (428), sobre todo con el extracto en fresco. Por ello no hay que menoscabar el cuidado en su realización, y basarnos en una correcta solicitud.

La técnica (Figura 22), altamente reproducible cuando se realiza de forma regular por el mismo personal (coeficiente de variabilidad interensayo máximo del 20%), consiste en aplicar una gota para cada extracto que se quiera testar, manteniendo una distancia entre ambas de al menos 3 cm. Generalmente, se realiza en la cara volar del antebrazo, a unos 5cm de la muñeca y 3 cm de la fosa antecubital. Hay que tener en cuenta que otras localizaciones necesarias en el caso de los niños cuando se desean testar un gran número de alérgenos, o por ejemplo ante dermatitis atópica severa en los brazos, pueden variar la lectura posterior de su resultado, como es el caso de la espalda, la cuál es alrededor de un 20% más reactiva. Sobre dichas gotas se debe aplicar una presión moderada durante 3 segundos de hasta una profundidad que ronde el 1 mm con una lanceta estéril de forma perpendicular a la piel. Sin olvidar que se trata de una prueba intraepidérmica, capa histológica sin vascularización, por lo que no debe sangrar. Con cuidado se retira el líquido en la piel con un papel absorbente y se realiza una lectura a los 15 minutos. El mismo

protocolo se sigue para cada fuente, al igual que para un control negativo, suero salino, y uno positivo, histamina a 10 mg/mL (6, 429).

El resultado se interpreta según el tamaño del habón y se considera sensibilización cuando la pápula es mayor a 3 mm del obtenido con el control negativo (punto en el que la sensibilidad y especificidad alcanzan su máximo en la curva ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*). No se debe olvidar que el habón debe picar y ser eritematoso, pues se está valorando la activación del mastocito cutáneo. El tamaño del habón no se correlaciona con la gravedad de la reacción, aunque sí con la probabilidad de presentar una reacción alérgica tras la exposición a dicho alimento (430, 431), de hecho, algunos investigadores han demostrado en habones mayores a 8 mm para algunos frutos secos como cacahuete o anacardo, un valor predictivo positivo (VPP), cercano al 100% tras compararlo con la provocación oral. Sin embargo, pueden producirse resultados falsos positivos en piel con dermatografismo positivo o dermatitis atópica, y falsos negativos en los niños menores de dos años, pues su piel tiene menor reactividad cutánea (432), y ante tratamientos concomitantes, tanto vía oral (antihistamínicos, corticoides, antidepresivos tricíclicos) como tópicos (426). Por ello siempre deben ser comparados con los controles.

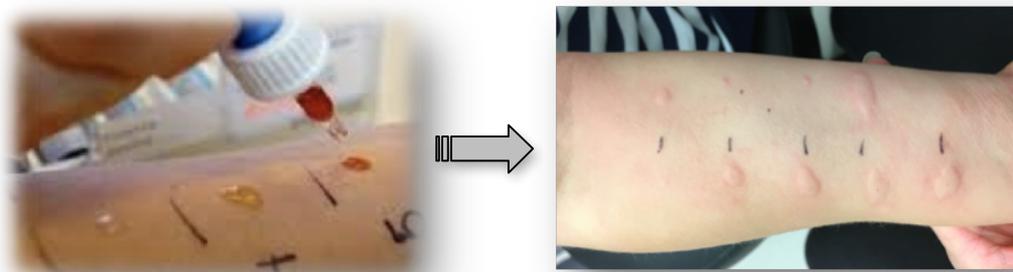


Figura 22. Técnica de realización de prueba intraepidérmica y lectura del habón posterior.

Los resultados de los test cutáneos pueden verse afectados principalmente por el producto utilizado. Los extractos alérgicos son productos biológicos heterogéneos extraídos de las materias originales que existen en la naturaleza, y que contienen moléculas alérgicas (principalmente proteínas) y no alérgicas. Aunque desde la agencia europea del medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) se está haciendo un intento por estandarizar su calidad, el proceso es dificultoso, pues está influenciado por múltiples factores (433, 434). Comenzando por la materia prima, que tiene que ser abundante para

un suministro permanente. Se observan diferencias en los alérgenos según la variedad, el tipo y condiciones de cultivo, como el uso de plaguicidas, y almacenamiento tras la recolección, o la maduración del fruto, como se ha estudiado por ejemplo para el tomate o la manzana (435-437). En el método de extracción de las proteínas también se puede alterar la calidad. El disolvente es acuoso a un pH dado, por lo que proteínas liposolubles como las oleosinas, o solubles a diferentes pHs, no se verán representadas (242, 314), así como las que se vean afectadas por los conservantes de la solución, que generalmente son glicerizados. Finalmente, existe una gran heterogeneidad de los métodos empleados para medir la potencia alérgica entre extractos de distintas casas comerciales haciendo que estos no sean comparables. Todos se refieren a la concentración del extracto necesaria que produce una prueba cutánea media establecida tras curvas dosis-respuesta de su tamaño en una población seleccionada, pero las unidades de medida son diferentes (438, 439).

Para intentar subsanar estas limitaciones, sobre todo en alimentos vegetales, ante resultados negativos pero con alta sospecha clínica, o cuando no se disponga del extracto comercial, se puede indicar la técnica conocida como prick-prick (Figura 23). Se trata de una modificación de la intraepidérmica en la que se usan extractos naturales. En estos casos se punciona con la lanceta el alimento, diferenciando piel y pulpa, y a continuación sobre la piel del paciente (6, 426, 440). De esta forma se puede llegar a mostrar una concordancia con el diagnóstico final, y según alimento, de hasta el 80% en el síndrome látex-frutas (378, 441, 442). Sin embargo, este procedimiento tiene también limitaciones ya que no es posible su estandarización puesto que no se puede controlar la dosis testada, se precisa disponer del alimento en fresco y algunos alimentos son irritantes o incluso pueden dar falsos positivos por su alta concentración natural de histamina (443). Por ello es importante la realización de la prueba en sujetos controles no alérgicos, para descartar la existencia de falsos positivos por efecto irritante o histaminérgico.

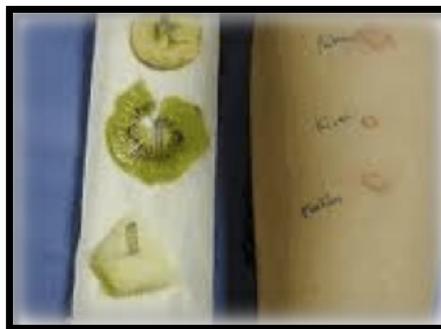


Figura 23. Técnica Prick by Prick.

Por otra parte, para intentar aumentar la precisión diagnóstica, se han creado extractos parcialmente purificados, es decir, modificados para que contengan sólo la parte de la fuente biológica que nos interesa, como puede ser la piel de melocotón rica en LTP. Para ello, es esencial conocer la distribución de los componentes alergénicos en la materia prima.

Otra alternativa serían los alérgenos recombinantes los cuales son claramente las herramientas diagnósticas más adecuadas para aumentar la especificidad e intentar averiguar el sensibilizante primario en casos de reactividad cruzada (444-446), además se encuentran presentes todo el año de forma estandarizada y ofrecen una alta reproducibilidad. Sin embargo, su uso actualmente se reserva para estudios *in vitro*, ya que para su producción se necesita unir una hebra del material genético del alérgeno con otra del organismo huésped encargado de producirlo. Comúnmente se usan organismos eucarióticos como plantas o levaduras como huéspedes a pesar del riesgo de producir glucosilaciones no presentes en la proteína natural, sin embargo, su expresión sobre bacterias puede dar lugar a plegamientos con baja representación de los epítomos conformacionales. En el caso de Pru p 3, la obtención del alérgeno recombinante (rPru p 3) se ha resuelto sin problema en *Pichia pastoris* (447).

2.5.3. Determinación IgE específica:

Los tests *in vitro* intentan certificar la sensibilización frente al alérgeno por la determinación de IgE específica circulante en el torrente sanguíneo del paciente, por lo que la interpretación de los resultados depende del clínico. Pueden ser útiles en distintas condiciones, con una alta sensibilidad (valor predictivo positivo (VPP) que varía según alérgeno y punto de corte del 61-100%), pero sólo en combinación con otras pruebas. De hecho, la determinación de IgE específica de forma aislada no tiene valor predictivo en relación al diagnóstico de alergia alimentaria (448), incluso puede arrojar resultados distintos al efecto biológico que se valora con los *in vivo* (449). Desde el punto de vista de costes, se consideran de segundo nivel, por ello, sólo se deberían solicitar si existen dudas al realizar las pruebas cutáneas, o bien de primera línea cuando éstas no puedan realizarse, como por ejemplo cuando el paciente toma antihistamínicos en su tratamiento habitual, padece de una enfermedad dermatológica grave, o exista riesgo de desencadenar anafilaxia. Las pruebas *in vitro* tienen la desventaja añadida de que los resultados no están disponibles en el momento.

Existen distintas técnicas para la determinación de IgE específica sérica, todas derivadas de la original descrita en 1967 por Wide (450) o RAST (del inglés, Radio-Allergo-Sorbent Test). En esa técnica se usa como fase sólida discos de celulosa a los que se unen de forma covalente hasta su saturación una fuente/s alergénicas, que se incuban con el suero del paciente, y posteriormente con anticuerpos secundarios anti-IgE marcados radioactivamente con yodo (I^{125}). Este método proporciona un resultado semicuantitativo en el que la capacidad de emitir radiación de la muestra problema es directamente proporcional a la cantidad de IgE específica unida al alérgeno del disco. Los inmunoensayos desarrollados a partir de éste han mejorado la capacidad de unión del alérgeno a la fase sólida en esponjas de celulosa, prolongando la vida media de los reactivos y aumentado la seguridad al no usar radioactividad sino un marcador fluorescente, además de mejorar la rentabilidad y calidad automatizando el proceso, precisando menor muestra de sangre del paciente, y permitiendo realizar múltiples determinaciones de un mismo suero. Los métodos diagnósticos validados principales pertenecen a Thermo Fisher Scientific® (ImmunoCAP System, el mayoritario en los centros hospitalarios), y Siemens Healthcare® (Immulite System) (451). Tienen una fiabilidad elevada para medir cuantitativamente IgE, siendo generalmente más baja para las frutas frescas y vegetales (442). Muestran resultados aptos en un rango de 0,10 a 100 kU/L, según la referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde una Unidad Internacional (UI) corresponde aproximadamente a 2,4 ng de IgE (452). Usualmente se considera un resultado positivo cuando es mayor a 0,35 kU/L, pero valores inferiores no excluyen la posibilidad de sensibilización. Se han intentado igualmente validar unos “puntos de corte” que predigan la relevancia clínica de la sensibilización, en alergia a vegetales sobre todo para cacahuete (453-455) y melocotón, aunque por el momento no se ha demostrado la existencia de relación entre el nivel de IgE específica frente a LTP y la severidad de los síntomas (139, 456). Además llama la atención la variabilidad entre los estudios a pesar de valores predictivos de hasta el 95%, pues hay que tener en cuenta la técnica usada, la población a la que se aplica, y dentro de ella las distintas variables que pueden influir en los resultados, como la edad, el tiempo entre el test y la evitación del alimento en la dieta, y otras enfermedades añadidas, como las discrasias sanguíneas o la IgE elevada del estado atópico (457). De hecho, este último dato ha sido objeto de debate en la interpretación de los resultados, y aunque se cree que no aporta ninguna ventaja, podría ser conveniente la normalización del valor de la IgE específica por los niveles de IgE total utilizando el cociente IgE específica/IgE total (458, 459).

En la actualidad, el diagnóstico fundamentado en la identificación de las proteínas alergénicas de los alérgenos completos, o diagnóstico por componentes, también ha demostrado ser de utilidad *in vitro* (460). De hecho, en la alergia a leguminosas con reactividad cruzada por pólenes, se podría reducir la necesidad de realizar pruebas de exposición (374), evitar dietas de exclusión tras testar MUXF3 ante sospecha de sensibilización por CCD, o predecir la severidad del perfil clínico de reactividad cruzada del paciente (461). Están disponibles en formato individual (ImmunoCAP), y en una plataforma que utiliza una micromatriz de hasta 112 alérgenos de 51 fuentes distintas, llamada ISAC® (del inglés, Immuno Solid-phase Allergen Chip) o ADVIA Centaur® (del inglés, *Immunoessays system chemiluminescent with ADVanced Acridinium ester technology*) (Figura 24) (139, 462). Sus ventajas estriban en la disminución del volumen de suero requerido ya que se pueden testar de forma simultánea una amplia batería de alérgenos, cuya fase sólida es un porta de cristal modificado sobre un microchip de sílice que cuantifica en un escáner la intensidad de emisión de fluorescencia (463, 464). Sin embargo se trata de una prueba no definitiva, sino informativa, aún no estandarizada, en la que se testan un panel fijo de alérgenos y de la que no se conoce la eficacia diagnóstica real para cada uno de los componentes, por lo que el clínico debe interpretarlos con cautela (325). Esta técnica aumenta los costes diagnósticos y esto junto con las preocupaciones añadidas debido a su potencial interferencia con otros anticuerpos de otros isotipos, no IgE, por el factor limitante de sus micropocillos (coeficiente de variación entre lotes alrededor del 30%), o el aumento artificial de su señal debido a defectos del cristal, deshumidificación o contaminación por polvo hacen que su utilización no sea muy amplia.

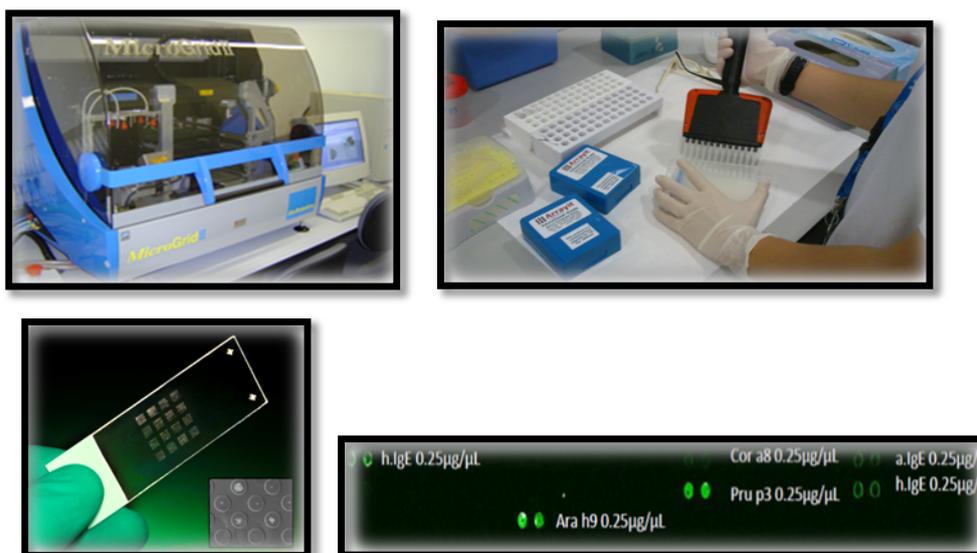


Figura 24. Equipamiento, procedimiento, y ejemplo de lectura de técnica Microarray.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Otros métodos utilizados es el enzimoimmunoensayo (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) en los que el antígeno se inmoviliza en una placa de poliestireno, tras su unión al IgE específico del suero se incuba con un anticuerpo secundario anti-IgE que lleva unido el enzima que reaccionará dando color.

Por último, existen otras pruebas de inhibiciones cruzadas cualitativas (Inmunotransferencia), y cuantitativas (inhibición del ELISA tipo sándwich), en las que se analiza la mayor afinidad de diferentes alérgenos por los epítomos de la IgE. En este tipo de pruebas el alérgeno o componente alergénico que produzca mayor inhibición, proporciona información necesaria para poder llegar a establecer cuál es el alérgeno al que primariamente se sensibilizó el paciente.

2.5.4. Test de activación de basófilos:

El test de activación de basófilos (BAT, del inglés *Basophil Activation Test*) es un ensayo funcional que simula *in vitro*, lo que ocurre *in vivo* de una manera segura (465, 466). Se trata de analizar, en la población de basófilos circulantes, la activación inducida por el alérgeno por un mecanismo mediado por IgE. Para analizar los basófilos activados generalmente se determina la expresión de dos glicoproteínas, CD63 y CD203c mediante citometría de flujo. La primera se encuentra en el interior de sus gránulos citoplasmáticos, y sólo se transportan y quedan expuestas por un fenómeno de fusión en la superficie de la membrana celular, en el momento de la activación celular. El CD203c es en cambio un marcador constitutivo y específico de basófilos que incrementa su expresión durante la activación del mismo. Para valorar la positividad de la prueba se usan el porcentaje de activación expresado en CD63, y el índice de estimulación (SI, del inglés *Stimulation Index*), que se calcula como el cociente entre el porcentaje de basófilos activados con los diferentes alérgenos y el porcentaje de basófilos activados sin estímulos. El punto de corte a partir del cual se considera un SI como positivo se calcula a través de curvas ROC para cada antígeno, y suele ser superior a 2 (467-469) (Figura 25).

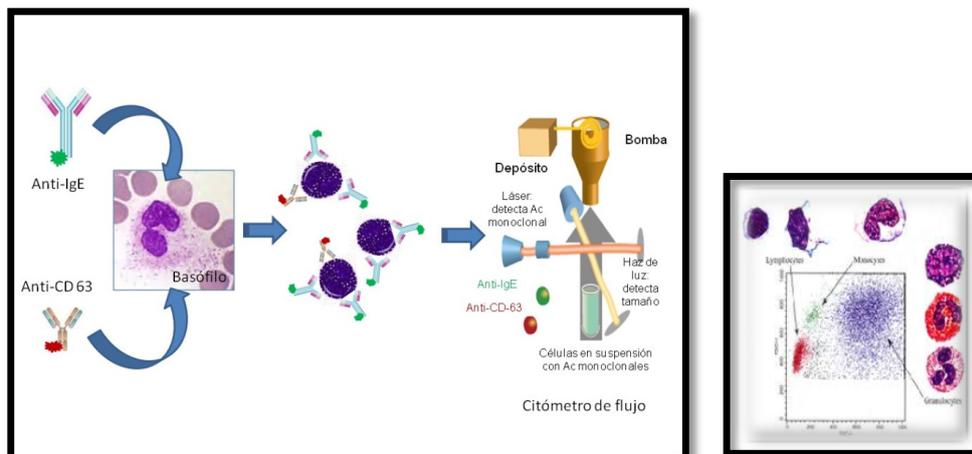


Figura 25. Representación técnica BAT.

Esta metodología requiere un manejo y una infraestructura especial, ya que implica trabajar con células vivas con especial atención a los tiempos, tanto de las 4 horas desde su extracción en fresco, como desde que ocurrió la reacción, pues la reactividad del basófilo disminuye con el tiempo. Sin embargo sí se ha demostrado que no se ve afectado por la toma de medicación antihistamínica (470).

El BAT se ha usado principalmente desde su inicio para el diagnóstico de alergia alimentaria en niños (471), demostrando buenos valores de sensibilidad y especificidad para los alimentos testados (avellana, leche, trigo, huevo, sésamo) (472-475) y por componentes, de hecho, superiores a los valores dados para IgE específica (ImmunoCAP). Se han realizado diferentes estudios sobre todo para cacahuete. Así en un estudio de Rentzos y cols., muestran que no existe correlación entre el BAT y los niveles de IgE específica por componentes para el cacahuete, sugiriendo que el BAT puede ser útil para identificar a los pacientes alérgicos con resultados falsos negativos por otros tests convencionales (476). Lo más interesante de esta prueba es su utilidad para distinguir la sensibilización de la verdadera clínica alérgica, por ejemplo en pacientes alérgicos a polen de abedul con y sin síndrome de alergia oral, BAT fue el mejor predictor de la respuesta clínica (477). Además, parece que demuestra una buena correlación entre la verdadera alergia a cacahuete en niños, de la tolerancia, particularmente en los casos difíciles, reduciendo la necesidad de realizar pruebas de provocación (478). Por ello, se ha propuesto la realización del BAT previo a la realización de una prueba de provocación para valorar la tolerancia natural a leche en los niños (479). La reactividad del basófilo se ha asociado con la gravedad de la reacción, y una verdadera reacción alérgica, pudiendo distinguir con una sensibilidad del 97,6% y una especificidad del 96%, entre niños con

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

alergia grave al cacahuete y niños sensibilizados pero tolerantes (480). Y aunque la información disponible es aún limitada (481), repetidamente se demuestra una mayor reactividad del basófilo en pacientes que reaccionan con mayor gravedad en las pruebas de provocación (482, 483), por lo que está incrementando el interés del BAT como prueba estándar predictora de un diagnóstico correcto sin necesidad de recurrir al actual patrón de oro diagnóstico de la prueba de provocación (484).

2.5.5. Pruebas de provocación a doble ciego controlada con placebo (PPDCCP):

Debido a las limitaciones de la capacidad diagnóstica de las pruebas anteriores para determinar tolerancia o alergia alimentaria el diagnóstico definitivo solamente se realiza por pruebas de provocación (6, 112, 426, 430, 457).

La necesidad de una prueba diagnóstica que determinara la veracidad de los síntomas abdominales, lejos de dietas de eliminación sin confirmación, se viene apuntando desde 1949, cuando Ingelfinger propuso un método reproducible en el que dar al paciente y sujetos sanos de una forma inadvertida el alimento al que se atribuían los síntomas. Un año más tarde, la Dra. Loveless mejoró la técnica y la denominó como PDCCP. Sin embargo, no fue hasta al menos 10 años después, cuando Goldman y posteriormente Charles May, publicaron el artículo y la comunidad científica lo aceptara como patrón de oro (485).

La prueba de provocación se puede realizar de tres maneras diferentes (486):

- a) como **prueba de provocación oral abierta**. Para reacciones inmediatas sugestivas en las que el riesgo es reducido; en niños menores de tres años; o bien como primera aproximación de un muy probable resultado negativo. Además, es necesaria para confirmar la tolerancia tras una provocación doble ciego negativa, dado que el uso de formas no habituales de preparación del ingrediente, como polvos deshidratados, en porciones acumuladas demasiado abundantes para que un niño las complete (487), o en pasos muy espaciados de tiempo, podría conllevar a un falso negativo por cambio de las propiedades alergénicas del alimento, o bien por la producción de una “rápida desensibilización transitoria” (488). Las pruebas de provocación abiertas se pueden realizar con un protocolo más simplificado y rápido, sin embargo nos exponemos a factores de confusión y al comportamiento psicológico del paciente.
- b) **Provocación oral simple ciego controlada con placebo**. Ayuda a enmascarar la influencia que el componente psicológico del paciente pueda tener, pero es una

prueba que precisa un mayor tiempo para su realización, ya que obliga a planificar dos sesiones, una para el activo y otra para el placebo.

- c) **PPDCCP**. Como ya se ha dicho, es el patrón de oro diagnóstico. Es la recomendada en general, pero sobre todo para proyectos de investigación o en casos de síntomas subjetivos. Sirve para reevaluar la posible aparición de tolerancia dentro de la historia natural de la enfermedad, y para establecer o excluir el diagnóstico de forma definitiva de alergia alimentaria antes de establecer una dieta de exclusión mantenida, como en el caso de sensibilizaciones por reactividad cruzada en las que el paciente no los ha ingerido con posterioridad a la reacción. Por ejemplo, se indica en pacientes del área mediterránea que han tenido reacción tras la toma de albaricoque y muestran sensibilización a otras frutas rosáceas, sobre todo para manzana, ciruela y melocotón (279).

Son procedimientos con riesgos, pues se basan en la inducción de una reacción alérgica cuya intensidad no es predecible, pero que razonablemente son necesarios asumir (489). Por tanto hay que realizarlos en un centro hospitalario con los medios y el personal adecuado para ser capaz de manejar un procedimiento de emergencia, en el caso de que ocurra. No se deben hacer sin un consentimiento informado oral y escrito del paciente, ni ante una clínica sugestiva, repetida y reciente con diagnóstico complementario concordante en menores de 12-18 años, o adultos con reacción sistémica grave, o tras la realización de la prueba cutánea. El alimento a provocar debe haberse evitado durante al menos dos semanas antes, pero también hay que tener cuidado con los alimentos sugerentes de verdadera reacción IgE mediada que llevan evitándose durante mucho tiempo, pues la probabilidad de una reacción grave con menor dosis a su reintroducción, es posible (490). Otras contraindicaciones para su realización, aunque a veces transitorias, son:

- Los pacientes con enfermedad atópica no controlada, como rinitis, conjuntivitis, urticaria, dermatitis atópica severa, o afectación bronquial obstructiva inestable y FEV1<80% del teórico; o con una infección aguda.
- Enfermedades o condiciones que pongan en riesgo la vida del paciente, como angina inestable, arritmias, o embarazo.
- Medicaciones que puedan influir en la reacción, atenuando sus resultados, como antihistamínicos, que deben evitarse durante un período de tiempo superior a 5 veces su vida media; corticoides sistémicos de 7-14 días antes, sin retirar si están en uso corticoides tópicos o inhalados; AINE, inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (IECAs),

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

alcohol, y antiácidos, por su potencial efecto cofactor, así como inhibidores de la monoaminooxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos, e inmunosupresores; o agonistas beta, que se recomienda mantener la mínima dosis posible para evitar efecto rebote. O bien amplificando la respuesta e interfiriendo en la acción de la medicación de rescate, como los betabloqueantes (491).

Es conveniente canalizar un acceso venoso periférico, sobre todo en pacientes adultos de riesgo, y que el paciente permanezca en observación al menos durante 2 horas tras la finalización de la provocación con resultado negativo, pudiendo ampliarse en el caso de que la reacción inicial hubiera ocurrido con mayor latencia. Si la prueba de provocación resulta positiva, y los síntomas importantes, deberían guardarse un mínimo de 4 horas, o ingreso hospitalario durante la noche (418).

La provocación debe iniciarse preferiblemente en un estómago vacío (aunque se permiten comidas ligeras de bajo contenido en grasa y líquidos), y por el alimento implicado. En el caso de reacciones con más de uno, se comenzará con el sospechoso de causar reacciones más leves, o ante igualdad, con el de menor sensibilización. La dosis de inicio varía ampliamente en la literatura, a pesar de los intentos de estandarizar y encontrar el nivel mínimo observable a partir del cuál se desencadena una reacción (LOAEL, del inglés *Low Observable Adverse Event Level*), o a partir del cuál no se encuentra reacción (NOAEL, del inglés, *Non Observable Adverse Event Level*), que va desde microgramos a gramos (6, 492). Y esto es debido no sólo al alimento, sino a las características de cada paciente, por lo que se recomienda comenzar con la cantidad inferior a la que se cree originó la reacción, y además, por debajo de las dosis LOAEL/NOAEL descritas (26). Por razones de seguridad además, los incrementos de dosis pueden realizarse con distintas escalas, desde por 10 o por 5, doblando dosis, o hasta semilogarítmica (3, 10, 30, 100, 300, 1000, y 3000) (493), en general la más usada (486, 492, 494). Y con un intervalo de tiempo superior al periodo de latencia con el que apareció la reacción en el paciente, típicamente 20-30 minutos (488). La provocación con el activo y el placebo deben realizarse en días separados, pero si no fuese posible, podría realizarse en el mismo día dejando al menos 3 horas de intervalo, teniendo en cuenta que se perdería el diagnóstico de las que ocurrieran tras ese período. La dosis máxima a alcanzar también es objeto de estudio. Se acepta que al menos deba ser de 2 g de proteína, para tener un porcentaje de resultados falsos negativos menor al 5%. Así se conoce que una pieza de manzana fresca triturada tipo batido, contendría alrededor de 0,9% de proteína (423), o que para un volumen de 173 g de magdalena de avellana se necesitan 20 gramos de avellanas no tostadas para conseguir 2,7 gramos de proteína (495).

El material para las pruebas de provocación debería estar estandarizado, pues la forma y la fuente deben preservar la máxima alergenicidad. El alimento puede administrarse en su forma natural, deshidratado, o liofilizado, en forma de puré, bebida, galleta, magdalena, o en fresco, pero debe evitarse encapsularlo, ya que impide su contacto con la mucosa orofaríngea y retrasa la posible aparición de sintomatología hasta que se disuelva la cápsula, así como evitarse los vehículos grasos, pues aumentan la gravedad de la reacción al generar una absorción intestinal más lenta (42). Según la Real Academia de la lengua Española, placebo es una “sustancia que careciendo por sí misma de acción terapéutica, produce algún efecto favorable en el enfermo, si éste la recibe convencido de que esa sustancia posee realmente tal acción”, así pues, las recetas deben ser capaces de enmascarar las cualidades sensoriales del activo, tanto en apariencia, olor, sabor, y consistencia, dentro del menor volumen posible (496). Por ello, el material debería estar validado por test sensitivos apropiados para evitar los falsos positivos de una inadecuada muestra (Figura 26).



Figura 26. Ejemplo de validación receta para provocación doble ciego (izquierda). Y de aumento de dosis enmascaradas progresivas (derecha).

Antes de cada dosis, al paciente se le debe realizar una completa exploración física en busca de signos o síntomas objetivos de alergia, para poder parar de forma precoz la prueba y tratar al paciente, sin esperar a que éste desarrolle el cuadro clínico completo. Sin embargo, es frecuente la presencia de síntomas leves que nos hagan repetir dosis o alargar el intervalo hasta la siguiente, y sobre todo de síntomas subjetivos, como por ejemplo un vómito en un niño con ansiedad por la prueba, o la sensación no objetivable de prurito oral. Para intentar solucionarlo, se podrían usar otros parámetros validados de medida secundarios, como la escala visual analógica (EVA) (Figura 27; y ver Anexo 7, Figura) o el cuestionario de calidad de vida (Q-50). Además, la AAAAI, en colaboración con la EAACI, ha creado una guía de puntuación en base a lo que varios autores habían propuesto como

maneras de actuación (ver anexo 5, Figura), como parar y esperar para administrar la siguiente dosis hasta que se hubieran resuelto los síntomas completamente, o bien dar por positiva la provocación cuando éstos duran más de 45-60 minutos, ocurren en tres sucesivas dosis, o se incrementan con las siguientes porciones (457).

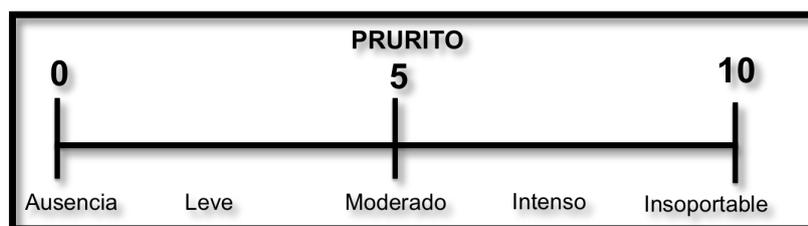


Figura 27. Escala visual analógica para el prurito.

2.6. Historia natural

La historia natural de alergia alimentaria se refiere tanto a la adquisición de sensibilización, como al origen de tolerancia (497). Frecuentemente comienza entre los primeros 1-2 años de vida, siendo común el desarrollo espontáneo de tolerancia, o como una sensibilización asintomática que se manifiesta posteriormente. Cuando su origen recae en la edad adulta o adolescencia, ya sea o no como una sensibilización “*de novo*”, datos empíricos sugieren que apunte hacia la persistencia (430). La proporción de niños que superarán la alergia alimentaria varía mucho según los estudios, tipo de alimento, tipo de reacción, edad de la población y pertenencia geográfica, así como del resultado de las distintas pruebas complementarias, siendo común en alergias a leche, huevo, trigo, soja, mientras que en las que suelen debutar más tardíamente como cacahuete, resto de frutos secos, pescados, mariscos, frutas y hortalizas, se consideran persistentes (44). Sin embargo, no sólo no existen aún estudios suficientes de seguimiento longitudinal que lo demuestren, sino que entre ellos la definición de lo que consideran alergia, tolerancia, o reactividad cruzada no son consistentes.

Aunque hay cierta evidencia que implica factores genéticos e historia familiar, como el asociado en otras enfermedades atópicas, en el aumento de susceptibilidad para alergia alimentaria, no existen estudios poblacionales de calidad que lo confirmen. En cuanto a los

factores genéticos, se ha propuesto la pérdida o mutación del gen de la filagrina, como vía de sensibilización cutánea, en el aumento de riesgo de alergia a cacahuete en población sin dermatitis atópica (426). O el riesgo de alergia a la leche de vaca, frutos secos, o sensibilización alimentaria en general, en los que presentan el polimorfismo del gen STAT6 (498). Los factores de influencia prenatal también han sido objeto de investigación. Así se han analizado los efectos sobre restricciones en la dieta materna, el déficit o exceso de vitamina D, el suplemento con probióticos, o la edad de introducción de los alimentos más alergénicos, si bien los resultados son aún inconclusos (499, 500). De hecho, estudios realizados en población española y canadiense afirman un aumento de riesgo de sensibilización a cacahuete y otros frutos secos, aunque el niño evite su ingesta, si estos están presentes en el ambiente familiar. De hecho se ha hallado gran cantidad de proteínas de cacahuete en la cocina donde se había manipulado su mantequilla, pudiendo entrar en contacto sus alérgenos con el sistema inmune, vía inhalada o cutánea, y actuar como pauta sensibilizante, sobre todo en niños con dermatitis atópica, por lo que aunque lo introduzcan en la dieta de forma tardía, han estado en contacto (501). A favor de lo que sugieren los primeros resultados del estudio LEAP (del inglés, *Learning Early About Peanut allergy*), donde el riesgo de desarrollar alergia al cacahuete es mayor en niños que evitan su introducción “temprana”, y aún más si añaden dermatitis atópica severa o alergia a huevo de gallina (43, 502).

No obstante, lo más frecuente es alcanzar la tolerancia con la edad, disminuyendo ésta si se asocian más sensibilizaciones, tanto a otros alimentos, como aeroalérgenos. En un estudio de Sampson y Scanlon en el que siguieron a pacientes entre 3 y 18 años de edad, diagnosticados por prueba cutánea y test de provocación doble ciego, encontraron que en su reevaluación al año, aproximadamente el 25% habían perdido todas las alergias, y tras dos años, el 24% de pacientes alérgicos al huevo habían dejado de serlo, así como el 19% de los alérgicos a la leche de vaca (503). Como factores predictores de resolución se han descrito un menor tamaño de pruebas cutáneas en el momento de la reevaluación, aunque éstas pueden persistir positivas tiempo después de que la tolerancia se haya alcanzado (504). Así como la media del nivel de IgE específica al diagnóstico, o a la reevaluación, o la proporción entre IgE e IgG4 específicas (505), demostrándose ser significativamente menores para los pacientes que superan la alergia a proteínas de leche de vaca y huevo (506). Aunque el nivel de IgE específica está aún por determinar, se cree que un nivel mayor a 5 kU/L desaconsejaría la provocación (507), al igual que el haber sufrido alguna reacción inesperada en el tiempo de evolución, o no haber superado la alergia aún al llegar a la adolescencia lo que sugiere una alta probabilidad de tener una alergia permanente

(497). Por ello, se recomienda reevaluar a los pacientes con alergia alimentaria al menos una vez al año. Los individuos verdaderamente alérgicos, con alta frecuencia de evolución clínica hacia la persistencia, son los que reconocen un mayor número de epítomos lineales, a diferencia de los sujetos que están sólo sensibilizados, o que han superado la alergia (508-510). Los alérgenos específicos que dentro de un extracto desarrollan la sensibilización clínica, pueden también predecir la probabilidad de evolución (511).

Los alimentos vegetales más estudiados en cuanto a su historia natural han sido:

Cacahuete. Su prevalencia de sensibilización en la infancia se estima alrededor del 2% (446), siendo la edad más frecuente para su diagnóstico los 18 meses de edad, aunque puede presentarse también más tardíamente, sobre todo en relación a polisensibilización por pólenes. Clásicamente la alergia a cacahuete se ha considerado como persistente, sin embargo, desde 1998 Hourihane, y Spergel y cols. (512, 513), demuestran que aproximadamente el 20% de los pacientes perderán la reactividad clínica entre los 4-20 años (514), sugiriendo el beneficio que aporta seguir a los pacientes también durante la edad adulta (40). Estos autores encontraron que los pacientes que toleraban el alimento, no sólo no tenían antecedentes de reacción anafiláctica, y menor polisensibilización, sino que la prueba cutánea y el nivel de IgE específica eran menores (515). La forma en la que la reintroducción posterior se realiza, también influye en el mantenimiento de tolerancia, pues se han registrado casos de nuevas reacciones en pacientes que habían superado la prueba de provocación debido a una ingesta habitual sensibilizante, es decir, escasa y de baja frecuencia (516).

Respecto al resto de frutos secos, se conoce relativamente poco en cuanto a su evolución. Se puede iniciar desde la infancia o en la edad adulta, encontrando también, que aquellos que están sensibilizados a más de dos frutos secos, tienen una menor probabilidad de conseguir una tolerancia espontánea (507). En Reino Unido, EEUU, Canadá, y Australia el principal es el cacahuete, pero en los países del sur de Europa, los principales responsables son la avellana, almendra, y la nuez. Generalmente se considera persistente, encontrando distintos fenotipos según las características regionales, como el SAO típico en adultos, por homólogos de Bet v 1, o reacciones sistémicas persistentes desde la infancia por la LTP de la avellana Cor a 8 en los países mediterráneos (517).

La alergia a la **soja** es otra de las alergias frecuentes en la edad pediátrica, sobre todo concomitante con cacahuete. Típicamente se considera que desaparece también en dicha edad, siendo útiles como predictores los niveles de IgE. De hecho, la tolerancia se adquiere a los 4 años de edad en un 25% de los niños, y a los 10 años en un 69% (518). Existe

además un fenotipo tardío con inicio de los síntomas pasada la edad pediátrica, y persistencia de ellos en la edad adulta, debido a la probable relación con reactividad cruzada con pólenes (519).

Para el **trigo**, otro de los alérgenos presentes desde la infancia que con frecuencia desaparecen de manera espontánea, los índices de resolución encontrados son del 29% a los 4 años de edad, y el 65% a los 12 años (520).

Las reacciones adversas a **frutas frescas y vegetales**, generalmente son duraderas (497). Aunque pueden estar presentes desde la infancia, la probabilidad de mantenerse es mayor cuando se originan en la infancia tardía o adultez, sobre todo cuando se deben a reacciones por su asociación al síndrome polen-alimentos, o al síndrome LTP, con una edad media para debutar que ronda los 15 años en hasta un 60% de los pacientes, comenzando por el melocotón y la manzana (44, 129), y habitualmente aumentando el número de alimentos implicados con el tiempo.

2.7. Tratamiento

2.7.1. Evitación:

La primera línea de tratamiento cuando se diagnostica a un paciente de alergia a un alimento, es su evitación de manera estricta. La intervención en materia nutricional, ha sido durante años, la única opción terapéutica (521). Como norma, sólo los alimentos a los que verdaderamente el paciente es alérgico son los que se deben evitar. Como se ha explicado antes, en el pasado, las recomendaciones se podían basar por datos de pruebas cutáneas o IgE específica sin confirmación, o por similitud taxonómica de los alimentos. Así, era frecuente que un paciente alérgico al cacahuete, evitara también, la exposición al resto de frutos secos. Sin embargo, parece que dado que la adquisición de tolerancia oral es un proceso inmunológicamente activo, se requiere la exposición a los alimentos a los que no sean alérgicos, para ayudar a alcanzarla (43, 522).

Los estudios sobre la historia natural de alergia a alimentos de origen vegetal, como hemos visto, son aún muy limitados, por lo que se asume que su evitación en la dieta ha de ser de por vida. Aunque existe escasa bibliografía sobre el efecto a nivel inmunológico que pueden producir las restricciones dietéticas, debido entre otros, a la dificultad de aleatorizar con

controles placebo por los aspectos éticos que representan, ésta se muestra actualmente como la estrategia más segura. No obstante, no se escatiman los avisos sobre el riesgo que suponen nutricionalmente, sobre todo en niños y adultos con síndromes de reactividad cruzada clínicamente demostrados en los que la dieta se ve restringida ampliamente, además de las consecuencias sobre el efecto que esto produce en la calidad de vida.

Manteniendo siempre la percepción de ser un riesgo permanente que afecta la calidad de vida del paciente y su entorno familiar (393, 523, 524). No hay que olvidar, que a no ser que el paciente presente una reacción aguda por su exposición, estamos ante un sujeto sano, con lo que el cumplimiento terapéutico, en este caso la evitación, a veces puede fallar ante la no conciencia de enfermedad. La educación, por tanto, como un añadido, es fundamental en el paciente y sus cuidadores. Deben aprender a identificar las fuentes de origen de todos los alimentos a los que son alérgicos, reconocer los síntomas que derivarán en una reacción alérgica y su gravedad, así como su tratamiento. Cuanto más grave haya sido la reacción, más probable es que se produzcan implicaciones sociales. Durante los primeros años de vida, la carga psicológica recae sobre todo en los padres y cuidadores; en la edad escolar, pueden ser obstáculo para actividades educativas, sociales, y la creación de su personalidad; en la adolescencia, la época de mayor riesgo (525), se han descrito incluso casos de acoso, el paciente reniega de su enfermedad, se hace independiente, hace vida social sin supervisión, desea pertenecer a un grupo, y comienzan el consumo de tóxicos; y en la edad adulta puede condicionar su actividad laboral, a la vez que se suma el origen de nuevas patologías concomitantes (140). Por todo ello, se hace muy complicado mantenerse sin sufrir reacciones, sobre todo tras la ingesta inadvertida en alimentos procesados, fiestas o comidas fuera de casa, con datos que demuestran que en 10 años de evitación, hasta el 75% de los niños experimentarán una reacción accidental tras la ingestión del alérgeno (430), un 22% de las cuales ocurrirán en la escuela (526), y que cerca del total de las muertes por anafilaxia debidas a alergia alimentaria, se producían por alimentos preparados fuera del hogar (24).

2.7.2. Tratamiento sintomático:

La anafilaxia es una emergencia médica que pone en peligro la vida del paciente, por ello, los principios de su tratamiento deben estar muy claros, y aunque los centros escolares no tengan un reglamento que los obligue, según el *artículo 195 del Código Penal*, pueden incurrir en delito de omisión del deber de socorro con su no actuación. Las guías internacionales ratifican que la adrenalina es la medicación de primera elección en la

anafilaxia, y además, la única, que reduce las tasas de hospitalización y muerte. Su mecanismo de acción actúa a tres niveles: alfa-agonista sobre la hipotensión, y el edema de la vía respiratoria; agonista- β 1 cronotrópico e ionotrópico aumenta la frecuencia cardíaca forzando la contractilidad cardíaca; y su efecto agonista- β 2 conduce a la broncodilatación y a la disminución de liberación de mediadores inflamatorios (418, 527, 528).

Tan pronto como el paciente reconozca el inicio de síntomas, debe colocarse en reposo en decúbito supino con las extremidades inferiores elevadas, y administrarse la inyección de adrenalina 1/1000 intramuscular en la cara externa del muslo, a una dosis según peso de 0,3-0,5 mg en adultos y 0,01 mg/Kg en niños, que podrá volver a realizar pasados 5 minutos si no existe mejoría. Posteriormente, deberá trasladarse en ambulancia para observación hospitalaria durante un mínimo de 4 a 6 horas. Se recomienda el uso de metilprednisolona intravenosa a dosis de 1-2 mg/Kg en bolo y hasta 4 dosis en 24 horas tanto en niños como adultos de forma profiláctica para prevenir el 20% de casos que sufren una anafilaxia bifásica, aunque la evidencia para esto es escasa. Como medicación complementaria de segunda línea también se recomienda la administración intravenosa de antihistamínicos-H2 o ranitidina (50 mg/8horas en adultos y 1 mg/Kg/8horas en niños), y antihistamínicos-H1 como dexclorfeniramina (5 mg en adultos y 0,05 mg/Kg en niños), aunque nunca de forma inicial, pues podrían enmascarar los primeros síntomas de una reacción anafiláctica y conducir a un tratamiento tardío (528). Y el resto del tratamiento de soporte necesario según las guías de prescripción de urgencias y emergencias, como la infusión de cristaloides o coloides, nebulizadores con salbutamol, drogas vasoactivas como dopamina, noradrenalina o atropina si asocia bradicardia, o glucagón en el caso de que el paciente se encuentre de forma habitual en tratamiento con betabloqueantes, reevaluando al paciente cada 5 minutos en monitorización constante. Se ha demostrado que la vía intramuscular para la administración de adrenalina es la más segura, presentando efectos adversos secundarios sólo un 1% de los pacientes que la recibieron frente al 10% de los que se le administró vía intravenosa (529). Existen distintos dispositivos de autoadministración en el mercado, de uso único, y con propiedades similares en cuanto a conservación y mantenimiento, que deben conocer tanto el paciente, como sus familiares, amigos, y centro escolar o de trabajo. Sólo existen contraindicaciones relativas (Tabla 3) para su uso, derivadas de su mecanismo de acción, por lo que ante la duda, siempre se debe aplicar (530).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

CONTRAINDICACIONES RELATIVAS AL USO DE ADRENALINA
Intoxicación por cocaína, anfetaminas
Ancianos o pacientes con patologías asociadas: <ul style="list-style-type: none">• Cardiopatía isquémica• Arteriopatía periférica• HTA• Hipertiroidismo• Cirugía intracraneal reciente• Aneurisma aórtico
Tratamiento concomitante con: <ul style="list-style-type: none">• IMAO (bloquean el metabolismo de la adrenalina)• Antidepresivos tricíclicos (prolongan la vida media de la adrenalina)• Beta-bloqueantes (respuesta parcial de la adrenalina)• Aminofilina, salbutamol iv, u otros fármacos vasoconstrictores o arritmogénicos.

Tabla 3. Contraindicaciones relativas al uso de adrenalina en el tratamiento de una reacción alérgica sistémica.

La decisión de prescribir un autoinyector de adrenalina dependerá de la presencia de factores de riesgo para desarrollar una anafilaxia, como pacientes en la adolescencia, asma mal controlado, antecedentes de reacciones anafilácticas previas, alergia a proteínas con probabilidad de clínica grave, como LTP, o a alimentos como mariscos, pescados, cacahuetes, y frutos secos, así como vivir a más de 20 minutos de un centro sanitario. Sin embargo, la receta del autoinyector no es un tratamiento curativo y además no elimina completamente el riesgo de anafilaxia grave o muerte, con hasta un 14% de muertes por reacciones debidas a alergia alimentaria a pesar de su administración temprana (24).

2.7.3. Tratamiento inmunomodulador:

Las terapias que buscan el restablecimiento de la tolerancia inmunológica (531), son el único tratamiento que puede alterar el curso de la enfermedad alérgica, y han demostrado ser una herramienta clínica segura y efectiva. Aunque el mecanismo inmunológico no se conoce aún en profundidad, lo que se pretende con estos tratamientos es desviar el patrón

de la respuesta efectora de una reacción alérgica, Th2 hacia Th0/1, con la generación de células Treg específicas del alérgeno que suprimen las células T efectoras específicas (73, 532-536).

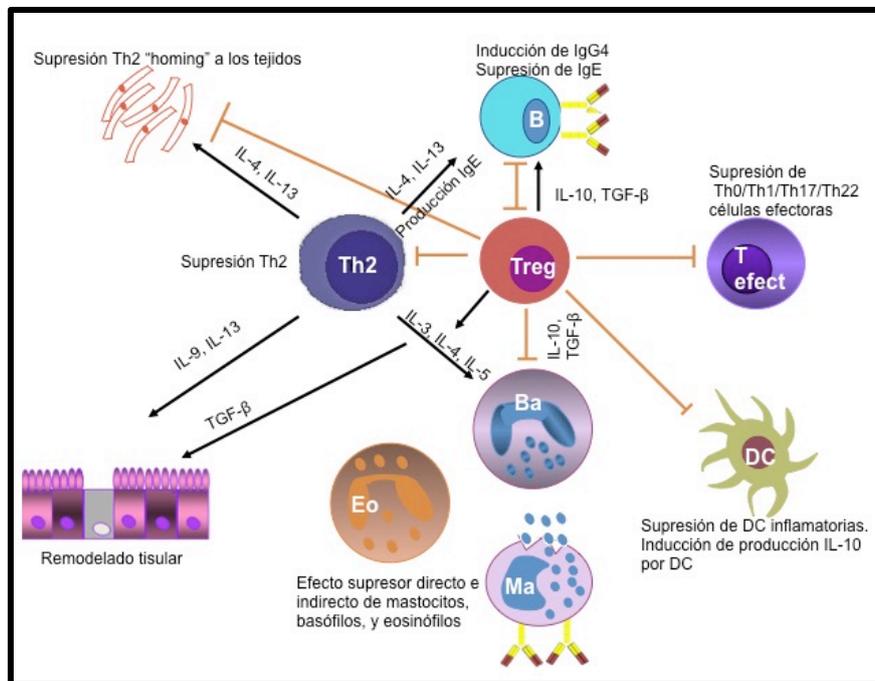


Figura 28. Representación del balance de células Th2 y Treg, y efectos por la IT (representado en naranja).

La búsqueda de la inducción de tolerancia en alergia alimentaria como estrategia preventiva y curativa se ha investigado desde que en 1829 se descubriera que en una tribu de nativos americanos ingerían hojas de hiedra venenosa para evitar las reacciones de hipersensibilidad frente al aceite de urushiol (de la familia *Anacardiaceae*) (94). Desde entonces se ha avanzado mucho en estos tipos de tratamientos utilizándose diferentes tipos de inmunoterapia (IT) dependiendo de la vía de administración:

2.7.3.1. Inmunoterapia subcutánea (ITSC):

Primeramente se investigó la vía subcutánea, dada su demostrada eficacia y seguridad desde hace más de 100 años, sobre todo en el tratamiento con aeroalérgenos y veneno de himenópteros (537, 538). De hecho, la idea de su uso con Noon (539) se basó en el concepto de la vacunación frente a agentes infecciosos, aunque el fundamento fuese diferente. La ITSC durante 4-5 años con extracto acuoso de cacahuete demostró una reducción en la puntuación de los síntomas y una menor reactividad en prueba cutánea, frente al grupo no tratado (540). Sin embargo, ésta fue abandonada en 1989 tras producirse varios casos de fallecimientos por su uso para alergia alimentaria que pusieron en

entredicho su relación riesgo-beneficio (14). La necesidad de encontrar una ruta alternativa se centró en la vía oral al hipotetizar las ventajas que se podrían derivar de la absorción directa desde la mucosa oral al torrente sanguíneo evitando el metabolismo de primer paso por el hígado, y posibilitando el acceso a las células con capacidad inmune de la mucosa oral, ricas en células de Langerhans, tolerogénicas por naturaleza y con baja presencia de eosinófilos, basófilos y mastocitos (541).

2.7.3.2. Inmunoterapia oral (ITO):

Consiste en la administración gradual de forma regular de cantidades escaladas del alérgeno contenido en el alimento hasta que se alcance una fase de mantenimiento en la que los pacientes deben continuar durante años tomando la misma cantidad, para lograr un estado de desensibilización en la que se posibilite la ingestión de la ración normal del alimento sin que produzca reacción. En este caso se habla de un estado de desensibilización, y no de tolerancia, por lo que la interrupción de la dosis diaria podría conducir a reacciones adversas. Existen autores que manifiestan que en su población de estudio tras la suspensión diaria permanece la tolerancia. Sin embargo estos resultados son de difícil interpretación, pues al tratarse de estudios de base pediátrica con un seguimiento menor a 5 años, la historia natural predice que lo más probable es que en muchos casos se produzca resolución espontánea. Hasta el momento actual se han identificado dos revisiones sistemáticas, ocho ensayos aleatorizados, y tres estudios comparativos, la mayoría realizados para leche de vaca, huevo, pescado, manzana, trigo, y cacahuete, siguiendo los protocolos que Patriarca inició hace 25 años (317, 542, 543), en los que se alcanza un porcentaje de desensibilización de hasta el 75%. En el caso del cacahuete, un estudio doble ciego controlado con placebo (DCCP) de una ingesta diaria de 5.000 mg de proteína de cacahuete (alrededor de 12 unidades) ha encontrado respuesta de tolerancia tras 5 años, con una disminución del tamaño de la pápula en prueba cutánea intraepidérmica, y del nivel de IgE específica respecto al basal (544). También se han observado otros cambios inmunológicos como el descenso de reactividad del basófilo a los 4-6 meses y un aumento de IgG e IgG4 (545, 546), y de IgA e IgG1 (547). Sin embargo, alrededor del 90% de los participantes refieren efectos adversos moderados, que aunque no fueron graves, precisaron en algunos casos del uso de adrenalina, además del alto porcentaje de pérdidas durante el tratamiento, o de reajuste de dosis por dolor abdominal (548, 549).

2.7.3.3. Inmunoterapia sublingual (ITSL):

La ruta sublingual se estudió por primera vez en 1986 para la IT a los ácaros del polvo (550). Desde entonces, aunque su primera indicación sigue siendo el tratamiento de la rinoconjuntivitis por aeroalérgenos tanto en adultos como en niños, desde 2003 ha demostrado también ser útil para el tratamiento de la alergia alimentaria (551). Cuatro ensayos aleatorizados con ITSL con alimentos (leche, kiwi, avellana, cacahuete y melocotón) (276, 552-555) han encontrado tolerancia con reducción de síntomas, en población infantil y adulta.

La ITSL consiste en la administración de gotas o tabletas que contienen el extracto alergénico debajo de la lengua por unos minutos, y posteriormente deglutirlo o expulsarlo, de forma generalmente diaria con una duración de 1 a 3 años.

Esta IT ha demostrado ser eficaz en cuanto a la inducción de tolerancia, aunque con la necesidad de una dosis efectiva mayor a la requerida para la vía subcutánea. Con extracto de avellana, Enrique y cols. (276) consiguieron alcanzar una dosis de mantenimiento de 188,15 μg de Cor a 1 y 121,9 μg para Cor a 8 y demostrar un aumento de IL-10 en sangre periférica en pacientes con clínica leve a moderada. Sin embargo, el 54,5% presentaron síntomas en la región oro-faríngea, lo que hace difícil interpretar correctamente los resultados. Para una paciente con manifestaciones graves de alergia tras la ingesta de kiwi, se realizó ITSL con 1cm³ de la fruta tres veces al día, demostrando su tolerancia tras 4 meses de haber parado el tratamiento (551).

Se han realizado varios trabajos de interés con cacahuete, el primero que demostró cambios clínicos e inmunológicos fue el llevado a cabo por Kim y cols. (554). Los pacientes, tras 12 meses de ITSL mostraron un descenso de reactividad cutánea y del basófilo, así como un aumento del nivel de IgG4, con una dosis tolerada de hasta 2500 μg , aunque no establecieron previamente al inicio del estudio la cantidad mínima de alérgeno desencadenante de la reacción.

Sin embargo, la reactividad del basófilo durante la ITSL no ha sido suficientemente estudiada, no pudiendo por el momento confirmarse su utilidad como biomarcador de mejoría clínica al haberse encontrado estudios con tabletas de gramíneas o en gotas para látex en los que su reactividad disminuye o bien no se modifica (556-558). Fleischer y cols., demostraron sólo un 10% de respuesta del basófilo a cacahuete tras 8 meses de parar el tratamiento, con el que el 70% de los pacientes habían llegado a tolerar una dosis de 5 g superior a la basal (555, 559). Varios estudios han comparado la eficacia y seguridad de los

tratamientos sublinguales frente a la inmunoterapia oral (549, 560), en los que parecen concluir que los segundos alcanzan mayor porcentaje de tolerancia inmunológica a costa de mayores efectos adversos y mayor dificultad para completar y mantener el tratamiento (561). Se ha descrito que con la ITSL se producen efectos secundarios en hasta un 29% de los casos, siendo en la mayoría de los casos locales de la zona oro-faríngea sin necesidad de uso de adrenalina de rescate (276, 553). Se han detectado marcadores de activación de mastocitos y basófilos en saliva, como triptasa y proteína catiónica del eosinófilo (ECP, del inglés, *Eosinophil Cationic Protein*), lo que podría explicar porqué ocurren estos síntomas a pesar de que la presencia en mucosa oral de estas células sea tan baja (562).

Si bien existen estudios de IT específica a diferentes alérgenos alimentarios, existen pocos sobre LTP y más concretamente sobre la alergia a melocotón, Pru p 3, la cual como se ha mencionado con anterioridad tiene una alta prevalencia en el área Mediterránea. El estudio de Fernández-Rivas y cols. en 2009 (553), a pesar de ser uno de los mejores trabajos con ITSL según la revisión de la Cochrane (563), es un ensayo de muy corta duración, con pocos pacientes, y en el que sólo se incluyeron pacientes con clínica leve-moderada. Se trató de un estudio DCCP realizado con ITSL con LTP de melocotón en pacientes con clínica de SAO hasta en el 63% de los casos. La fase de mantenimiento con 10 µg de la LTP del melocotón (Pru p 3), se alcanzó tras 5 días, que hubo que mantener tres veces por semana. Los resultados encontrados tras la reprovocación a los 6 meses de tratamiento, demostraron que el 89% de los pacientes toleraban una cantidad de melocotón nueve veces superior a la inicial. Sin embargo al no haber incluido pacientes con síntomas graves, ni parámetros de tolerancia a nivel inmunológico, el análisis de los resultados también es incierto.

Evaluando los cambios clínicos que presentan los pacientes sometidos a ITSL con extracto de piel de melocotón, se han encontrado descensos del tamaño del habón formado tras la prueba cutánea frente a otros alérgenos como Mal d 1 y Mal d 4, sin embargo, no se analizaron datos respecto a Mal d 3, una LTP (564). En concordancia, también se ha estudiado la IT para alergia oral por síndromes de reactividad cruzada por pólenes, en concreto, Kinaciyan y cols. (565), realizaron un trabajo longitudinal con 9 pacientes tratados con ITSL con extracto de polen de abedul por síntomas de rinitis por su alérgeno mayor Bet v 1 y con clínica de SAO tras la ingesta de manzana por Mal d 1, demostrando que tras un año de ITSL con mejoría clínica en los síntomas respiratorios, medida por provocaciones nasales, niveles de IgG4, y proliferación de linfocitos T, la IT fue ineficaz para los síntomas de alergia alimentaria por PR-10, comprobado tras pruebas DCCP con manzana, además

de *in vitro*, por ausencia de proliferación de células T en presencia de Mal d 1, así como ausencia de cambios en los niveles de IgE e IgG4 específicos.

2.7.4. Mecanismo inmunológico implicado en la inmunoterapia específica a alérgenos alimentarios:

El mecanismo inmune que subyace al éxito en la inducción de tolerancia con la IT específica a alimentos, aún se está investigando y va a depender de la vía de administración de la misma. En el caso de la ITSL, parece que recae sobre la alta proporción de células de Langerhans existentes en la mucosa oral, como células diana. En un estudio realizado con biopsias de la mucosas oral humana tras ITSL con el alérgeno de polen de gramíneas Phl p 5, se ha demostrado que (541, 566), tras finalizar la ITSL, las CD permanecerían inmaduras, no produciéndose una respuesta inmune tras el contacto con el alérgeno, y no migrando al nódulo linfático. Además, estas células de Langerhans producirían IL-10 y TGF- β (567), que junto al aumento demostrado de IFN- γ y descenso de IL-4 en la respuesta tardía, polarizaban la respuesta desde el fenotipo Th2 típico de reacciones mediadas por IgE hacia un fenotipo Th1 con implicación de los linfocitos Th1 y/o Treg (568). Los Treg usan múltiples factores para suprimir la actividad efectora de las células Th2, no sólo promoviendo la inducción IgG4 e IgA, y de IL-10 y TGF β como factores supresores de la liberación de IgE (569), sino directamente sobre las Th2, por lo que se dejarían de liberar las citoquinas requeridas para su proceso de alojamiento o “homing”, y para la diferenciación, supervivencia, y actividad de los eosinófilos, mastocitos y basófilos, como son IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, e IL-13 (64, 570-572). En concreto, se ha demostrado que los niños que alcanzan la tolerancia alimentaria espontánea presentan un mayor porcentaje de linfocitos FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ circulantes (94, 573).

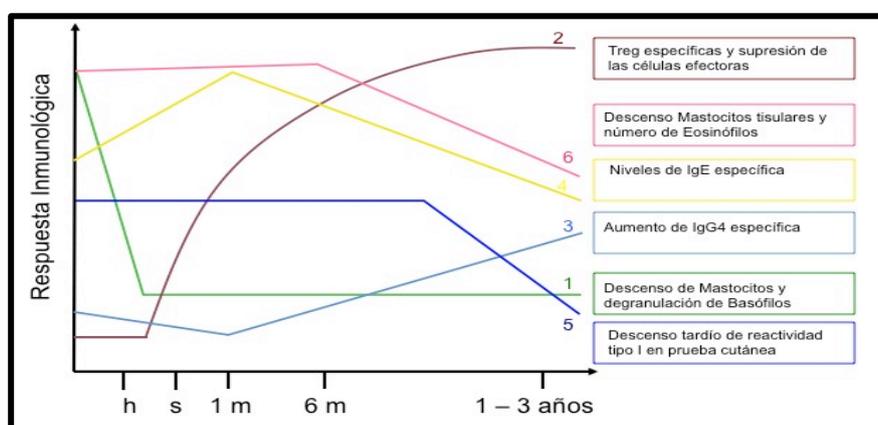


Figura 29. Regulación inmune durante la IT.

La IgG4, propuesta como un “factor bloqueante” y “competidor” de la producción y unión de IgE a través de su receptor de baja afinidad (66), se ve aumentada durante y tras la IT (549, 553, 574), y suele presentar buena correlación con la mejoría sintomática (559). Esta inmunoglobulina (Ig) es dentro de las IgG, la subclase menos abundante en el plasma, presenta además baja afinidad para C1q, e inhibe la liberación de histamina tras la activación del basófilo a través del receptor Fc3RI.

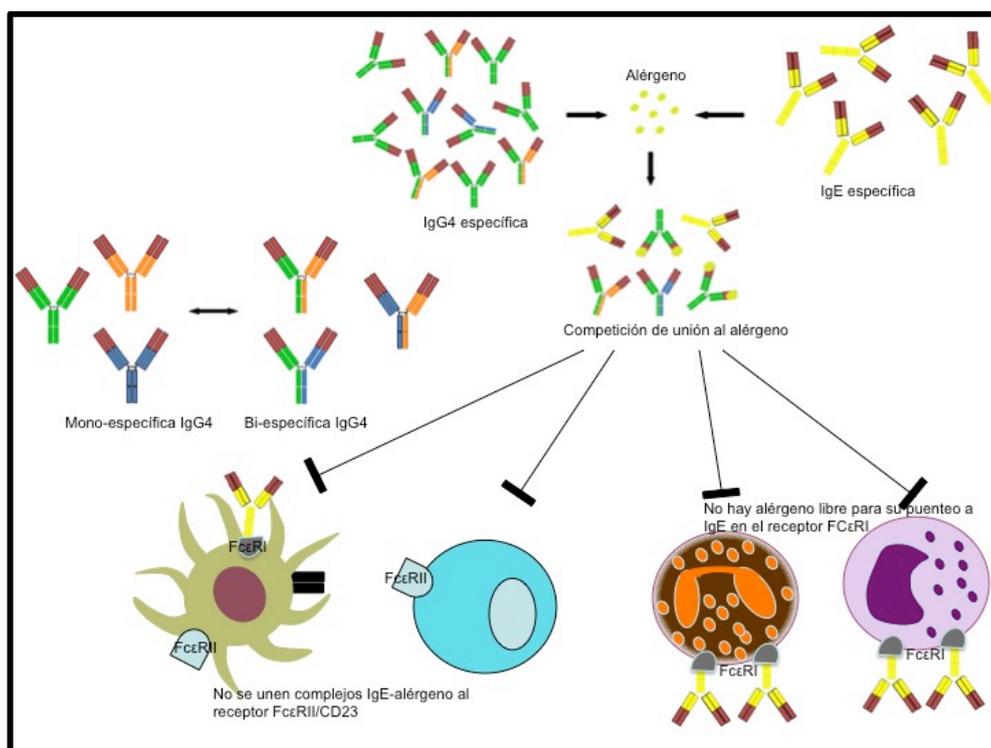


Figura 30. Representación adaptada de Nouri-Aria y cols. (1), del aumento de IgG4 en pacientes tratados con IT específica con polen de gramíneas.

Los estudios inmunológicos de IT con alimentos hasta la fecha actual en general son escasos, realizados principalmente en población pediátrica para leche, huevo, y cacahuete, aportando resultados a nivel humoral, sin profundizar en los cambios que se producen a nivel celular (Tabla 4). En particular para ITSL con cacahuete, existe evidencia de cambios en la respuesta del basófilo, sin embargo, no se han encontrado resultados estadísticamente significativos para las células Treg tras 12 meses de tratamiento, sólo además analizadas en el estudio de Kim y cols. (554). Todos los pacientes analizados muestran como criterio de exclusión el haber presentado reacciones graves tras la ingesta de cacahuete, valorando la tolerancia tras el tratamiento en un tiempo aún limitado, y sobre población pediátrica, por lo que se limita el diferencial entre tolerancia espontánea o

inducida, y sin analizar los resultados tras su incorporación a la dieta habitual, ni sobre otras sensibilizaciones.

Un efecto interesante de la IT que hasta el momento no ha sido suficientemente estudiado, es como la IT con un alérgeno determinado puede influir en la sensibilización y tolerancia a otros alérgenos relacionados. Según estudios realizados con veneno de himenópteros, en los que la ITSC con veneno de abeja (*Apis mellifera*) induce tolerancia para veneno de serpiente (*Naja mossambica*), debido a la reactividad cruzada por la proteína Fosfolipasa A2 (FLA2) que ambos presentan (575, 576). Respecto a aeroalérgenos, existen estudios que demuestran que la ITSC con ácaros del polvo pueden prevenir el desarrollo de nuevas sensibilizaciones en niños con alergia respiratoria (577), o la actividad inhibitoria demostrada *in vitro* de Der p 1, una proteasa, frente a la actividad proteolítica de Der p 6 (578). En el área de la IT con alimentos, se ha encontrado reactividad cruzada *in vitro* a nivel de las células T de ratones sensibilizados (579). Se ha investigado la eficacia de una IT con un fruto seco (anacardo) en la clínica a otros, mostrando tolerancia frente a alergia a pistacho, sin embargo, esta relación no ha podido ser demostrada para todas las combinaciones, como es el caso de la alergia a la nuez, probablemente debido a los distintos perfiles de sensibilización y el tipo de alérgenos implicados, pues los epítomos T de las albúminas 2S muestran muy baja homología.

Otras vías de tratamiento y fuentes alérgicas están siendo investigadas. Entre estas destacan la vía epicutánea (580, 581), y la IT con péptidos (582), o fórmulas recombinantes hipoalérgicas (583, 584), dentro del intento de desarrollar formas con mayor tolerancia y mejor perfil de seguridad al modificar la alergenidad de la molécula, sin embargo por el momento no han demostrado su utilidad clínica y están reservadas al ámbito de la investigación.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

ITSL	Alimento	Diseño	Nº ptes (edad)	Clínica inclusión	Dosis máx	Duración	Efectos adversos	Respuesta clínica	Respuesta humoral	Respuesta celular
Enrique, 2005	Avellana	Aleatorizado DCCP	23 (19-53)	54,5% SAO	66,25mg proteína	12s	0,2% sistémicas, 7,4% locales	↑ dosis umbral hasta 11,6g	↑ slgG4 e IL-10	----
Fernández-Rivas, 2009	Melocotón	Aleatorizado DCCP	56 (18-65)	63% SAO	50µg proteína	6m	0,4% sistémicas, 39% locales	↑Dosis umbral x9 ↓PC	↑ slgG4 e slgE	----
Garrido-Fernández, 2014		Aleatorizado DCCP	31 (18-65)	63,1% locales	30µg proteína	6m	----	↑Dosis umbral x3,	↑ slgE, sLT	↑TAB
García, 2010		Aleatorizado DCCP	56 (18-65)	75,8% locales	---	6m	---	↓PC	↑ slgE,	----
De Boissieu & Dupont, 2006		Leche	Abierto	8 (6-17)	Persistente >5años	1mL leche fresca	6m	----	↑dosis umbral hasta 143mL	↓slgE caseína
Keet, 2012	Abierto comparado con ITO		30 (6-17)	Persistente Leve-grave	7mg	60s	0,12% sistémicas	1/10 ITSL vs 14/20 ITO completaron ↓PC	↑ slgG4	↓expresión CD63 y CD203c
Kim, 2011	Cacahuetos	Aleatorizado DCCP	18 (1-11)		2g	12m	11,5% sistémicas. 9,3% orofaríngeas	↑Dosis umbralx20 respecto placebo ↓PC	↓slgE, IL-5 ↑IgG4	↓TAB, ↑CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 (p>0,05)
Fleischer, 2013		Aleatorizado DCCP	40 (12-37)	Leve-moderados	165-1386 µg proteína	44s	8,8% Orofaríngeas Adrenalina 5%	↑dosis umbral, 70% 5g o x10 basal ↓PC	↑slgG4, slgE	↓TAB
Burks, 2015		Seguimiento, Aleatorizado DCCP	37 (13-18)	Leve-moderados	1386µg proteína	3 años	>50%pérdidas, 4,8% síntomas graves	↑dosis umbral, 10,8% 5g o x10basal ↓PC	↑slgG4,	↓BAT
Kerzl, 2007	Kiwi	Abierto	1 (29)	anafilaxia	1cm ³ fruta fresca	5 años		Tolerancia tras 4 meses ↓PC	↓slgE ↑IgG4	----

Tabla 4. Tabla resumen estudios hasta la fecha de ITSL con alimentos. DCCP: doble ciego controlado con placebo. PC: prueba cutánea. S: semanas. M: meses. slgE: IgE específica. slgG4: IgG4 específica. TAB: Test de activación de basófilos.

JUSTIFICACIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Aproximadamente el 2% de la población adulta es alérgica a alimentos, fundamentalmente a vegetales, siendo la familia de las *Rosaceae* la más frecuentemente implicada (18, 28, 29, 234, 270, 343, 448). La alergia a alimentos tiene un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes, sufriendo un porcentaje significativo de las mismas reacciones inesperadas debido a la presencia de alérgenos ocultos. Si se considera que las reacciones alérgicas a *Rosaceae* y concretamente a LTP, pueden ser múltiples, graves y en algunas ocasiones fatales, ésto hace que el manejo de los pacientes sea difícil ya que no existe ningún tratamiento específico a excepción de la evitación de la ingestión del alimento, lo cual no siempre es posible por las razones anteriormente mencionadas (585). Además, datos recientes sugieren que la proporción de reacciones graves y fatales producidas por LTP puede incrementarse en los próximos años, especialmente en el área mediterránea (205, 263). Por otro lado, se ha observado que la prevalencia de alergia a LTP en la población pediátrica duplica la de adultos. De hecho, hasta un 22% de niños alérgicos están sensibilizados a LTP, desarrollándose en muchos de ellos una clínica de alergia grave a alimentos (44, 305, 418), y un riesgo permanente de reacción que afecta la calidad de vida del paciente y su entorno familiar (393, 523, 524). Todos estos datos indican que este tipo de alergia a alimentos se está incrementando tanto en prevalencia como en gravedad (586, 587), siendo especialmente relevante en el sur de Europa donde la proporción de sensibilización a LTP es muy alta (128, 234, 261, 308, 588).

El diagnóstico de la alergia a *Rosáceas* es complejo siendo la prueba diagnóstica “patrón de oro” la PPDCCP (6, 112, 426, 430, 457), procedimiento no siempre disponible, que entraña riesgos y consume tiempo y recursos (490). Por ello es muy relevante estudiar y conocer el perfil de sensibilización de estos pacientes en la historia clínica, así como obtener la máxima información posible a partir de pruebas complementarias poco invasivas, como las pruebas cutáneas intraepidérmicas, y el test de activación de basófilos (469, 476, 478, 482). Esto permitirá una caracterización fenotípica más precisa de los pacientes que ayudará a realizar estudios comparativos y evitar así restricciones innecesarias de alimentos nutricionalmente básicos de la dieta mediterránea (484).

Todo lo anteriormente expuesto indica la existencia de una necesidad, discutida en diferentes foros a nivel europeo, de realizar estudios que ayuden a mejorar el diagnóstico y sobre todo el tratamiento de los sujetos alérgicos a LTP, fundamentalmente en la población de la cuenca mediterránea. En este sentido, la IT es el tratamiento de elección debido a su demostrada capacidad para modificar la historia natural de la enfermedad alérgica (589, 590). La administración de la LTP del melocotón, Pru p 3, por vía sublingual en pacientes con alergia a alimentos sensibilizados a LTP parece segura, efectiva y bien tolerada (553,

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

563, 564). De hecho es un tratamiento que se ha comercializado recientemente en algunos países europeos. Sin embargo, los escasos estudios existentes se centran en pacientes con reacciones leves, no existiendo estudios en situación de vida real, que incluirían pacientes con reacciones graves. Por ello se hace necesaria la realización de estudios en este tipo de pacientes, que desarrollan reacciones sistémicas, que son los que se van a beneficiar más de los efectos de la IT.

Además es de destacar la posible influencia en la respuesta que la IT sobre un alérgeno puede tener en otros alimentos. Dado el amplio perfil de sensibilización de los pacientes con alergia por LTP, el estudio de la tolerancia a otros alimentos, como cacahuete, tras la IT con Pru p 3, resultaría de una gran importancia a nivel clínico.

El mecanismo inmunológico subyacente a los cambios clínicos que conducen a la eficacia de la IT con alimentos, no se han analizado en profundidad (564, 591). El estudio de los posibles cambios que se generen en las respuestas de células T efectoras y reguladoras así como la producción de anticuerpos específicos durante la IT nos ayudarán a comprender los mecanismos implicados. Además, la evaluación de estos mecanismos será crítica para comprender el funcionamiento de la IT y también las circunstancias que conllevan una falta de respuesta a la misma.

Dada la baja prevalencia de la enfermedad en población general, y la existencia de pacientes alérgicos con clínica grave en los que el efecto de la IT con melocotón no había sido suficientemente evaluado, el presente estudio se planteó en condiciones de práctica clínica habitual y no como ensayo clínico. Este diseño, más realista, nos permitirá alcanzar los objetivos que a continuación se detallan.

OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de la ITSL con un extracto de melocotón enriquecido en Pru p 3 (ITSL-Pru p 3) en pacientes alérgicos a melocotón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Evaluar la eficacia clínica de la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón mediante la evaluación de pruebas cutáneas a melocotón y pruebas de provocación a doble ciego controladas con placebo con melocotón.

2.- Evaluar el efecto de la ITSL-Pru p 3 en la eficacia clínica a cacahuete en pacientes alérgicos a melocotón con alergia concomitante a cacahuete mediante la evaluación de pruebas cutáneas a cacahuete y pruebas de provocación a doble ciego controladas con placebo con cacahuete.

3.- Evaluar la seguridad de la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos mediante el análisis de acontecimientos adversos.

4.- Analizar la evolución de la respuesta inmunológica humoral a melocotón durante la IT específica a melocotón enriquecida con Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón mediante determinación de anticuerpos IgE e IgG4 específicos a Pru p 3 y Ara h 9.

5.- Analizar la evolución de la respuesta inmunológica humoral a melocotón durante la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón con alergia concomitante a cacahuete mediante determinación de anticuerpos IgE e IgG4 específicos a Pru p 3, y Ara h 9.

6.- Analizar la evolución de la respuesta específica del basófilo frente a Pru p 3 durante la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón.

7.- Analizar la evolución de la respuesta específica del basófilo a Pru p 3, y Ara h 9 durante la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón con alergia concomitante a cacahuete.

8.- Evaluación de los cambios inmunológicos a nivel celular analizando los cambios fenotípicos de las CD, células T efectoras (Th2/Th9), reguladoras (Treg), Th1, células NK y células plasmáticas productoras de IgE, así como la respuesta proliferativa específica a Pru p 3 durante la ITSL-Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.- DISEÑO DEL ESTUDIO:

Se trata de un estudio prospectivo de 12 meses de duración realizado en pacientes con diagnóstico confirmado de alergia melocotón, tras una evaluación exhaustiva en condiciones de práctica clínica habitual. De ellos, un grupo acepta iniciar el tratamiento con ITSL-Pru p 3 (grupo tratados), y otros deciden no comenzarla (grupo no tratados), en condiciones de práctica clínica habitual. Se realizaron una serie de análisis tanto *in vivo* como *in vitro*, que permitieron desarrollar los objetivos y verificar las hipótesis planteadas.

Para garantizar la homogeneidad entre grupos, previo a la inclusión en el estudio, se analizaron los siguientes parámetros: severidad de la reacción al alimento, tiempo de evolución de la alergia alimentaria (\leq 1 año 1-3 años, 4-6 años, y más de 6 años), sexo (masculino, femenino), y edad (18-30, 31-40, 41-50, y más de 50 años).

Además, se realizaron estudios comparativos en el grupo de pacientes tratados en función de la existencia o no de alergia a otros alimentos vegetales relacionados con LTP (en concreto cacahuete). Los pacientes se clasificaron en tres grupos: alérgicos a cacahuete, sensibilizados a cacahuete, y no sensibilizados no alérgicos a cacahuete.

2.- ÁMBITO DE ESTUDIO:

Se seleccionaron de forma consecutiva los pacientes con alergia a melocotón y presencia de síntomas cutáneos y sistémicos (131), estudiados en la Unidad de Gestión Clínica (UGC)-Alergología del Hospital Regional Universitario de Málaga (HRUM), durante un período comprendido entre abril 2012 a septiembre 2012 y se analizaron los datos de los pacientes confirmados tratados o no, con ITSL-Pru p 3 durante un año. El HRUM es un hospital de tercer nivel y el único centro de referencia para el estudio de patologías alergológicas en toda la provincia de Málaga, Melilla, y Campo de Gibraltar. La UGC de Alergología atiende pacientes mayores de 14 años, y contiene una unidad de alergia alimentos donde se evalúan unos 125 pacientes al mes, de los cuáles 35 son pacientes nuevos.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Alérgicas perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

3.- GRUPOS DE ESTUDIO.

En este trabajo se evaluaron sujetos de 15 a 65 años de edad con diagnóstico confirmado de alergia mediada por IgE a melocotón con sensibilización a la LTP, Pru p 3.

Criterios de inclusión:

- Hombres o mujeres entre 15-65 años con diagnóstico confirmado de alergia a melocotón por sensibilización a Pru p 3.
- Pruebas cutáneas positivas a Pru p 3 (Diámetro de habón > 3 mm).
- IgE específica a Pru p 3 positiva (>0.35 kU/L).
- Reacción sistémica por ingesta de melocotón, confirmada por test de provocación oral controlada a doble ciego con placebo positiva a melocotón, o historia clínica de anafilaxia tras melocotón en más de una ocasión en los dos últimos años.
- No haber recibido tratamiento inmunoterápico en los 2 años anteriores al estudio y 5 años en caso de pólenes.
- Consentimiento informado para la participación en el estudio firmado (ver Anexo 8).

Criterios de exclusión:

- Embarazo y lactancia.
- Enfermedades inmunológicas.
- Inmunodeficiencias graves.
- Estar recibiendo tratamientos con inmunomoduladores, inmunosupresores y β -bloqueantes.
- Enfermedad mental.
- Dermatitis atópica grave.
- Sujetos con FEV1 < 70% o sujetos incapaces de realizar el tratamiento.
- Historia previa de choque anafiláctico por alergia a alimentos
- Historia clínica de alergia a coco.
- Inmunoterapia con pólenes en los 5 años anteriores.
- Inflamación en la cavidad oral con síntomas severos tales como liquen plano con ulceraciones o micosis oral.

- En caso de cirugía oral como extracción dental el tratamiento con ITSL debe interrumpirse durante 7 días para permitir la cicatrización de la cavidad oral.
- Cualquier condición clínica que contraindique la inmunoterapia según las directrices de la EAACI (592).

A todos los pacientes diagnosticados como alérgicos a melocotón se les oferta la posibilidad de comenzar tratamiento para su enfermedad con ITSL-Pru p 3, un porcentaje de pacientes no acepta dicho tratamiento por lo que los pacientes se clasifican en:

3.1. Grupo tratado con ITSL-Pru p 3

Pacientes que tras ser sometidos al estudio alergológico completo se diagnostican de alergia alimentaria mediada por IgE con sensibilización a LTP, y deciden comenzar con ITSL-Pru p 3.

Para posteriores análisis este grupo de pacientes, según su reactividad frente a alérgenos del cacahuete, se clasificaron en:

3.1.1. Alérgicos a cacahuete (Grupo A). Se trata de pacientes alérgicos a cacahuete por historia clínica compatible tras su ingesta, y estudio complementario positivo concordante con pruebas cutáneas intraepidérmicas, e IgE específica.

3.1.2. Sensibilizados a cacahuete (Grupo B). Este grupo lo componen pacientes que toleran la ingesta a cacahuete pero están sensibilizados por prueba cutánea positiva e IgE específica.

3.1.3. No sensibilizados no alérgicos a cacahuete (Grupo C). Son pacientes que toleran la ingesta de cacahuete y no están sensibilizados, ni por prueba cutánea ni por IgE específica.

3.2. Grupo no tratado con ITSL-Pru p 3

Pacientes que tras ser sometidos al estudio alergológico completo se diagnostican de alergia alimentaria IgE mediada por sensibilización a LTP, pero deciden no comenzar con inmunoterapia específica.

Además para algunos estudios inmunológicos se incluirá un **grupo control** formado por sujetos sanos que toleran la ingesta de alimentos incluido el melocotón.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

4.- NORMAS ÉTICAS:

El estudio se realizará respetando los principios de la Declaración de Helsinki (Brasil, 2013), de la Asociación Médica Mundial, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a derechos humanos y biomedicina, en la Declaración Universal de la Unesco sobre genoma humano y derechos humanos, y las directrices de la ICH sobre BPC CPMP/ICH/135/95.

El estudio fue evaluado y aprobado por el CEI provincial de Málaga (Ref 29/2012). Se obtuvo el Consentimiento Informado firmado de todos los sujetos participantes en el estudio tras la información sobre de la metodología, objetivos, y riesgos del estudio, que incluye la autorización a realizar el estudio alergológico, y a la toma de muestras biológicas. En el caso de pacientes menores de 16 años, se obtuvo además del consentimiento firmado de los padres/tutores legales, un asentimiento firmado por el paciente, una vez que se les explicó el mismo y tuvieron la oportunidad de realizar preguntas (ver anexo 9 y 10).

Las muestras obtenidas durante el estudio, y los datos clínicos fueron almacenados y custodiados con las garantías de calidad, trazabilidad, y confidencialidad que exige la legislación nacional (Ley de Investigación Biomédica 14/2007, RD 1716/2011, LOPD 15/1999) en el Biobanco de IBIMA, tras firma del consentimiento específico de biobanco.

Los pacientes que aún habiendo decidido no ser tratados, aceptan a participar en el estudio, al igual que los tratados, firmaron un consentimiento informado oral y escrito, de la metodología, objetivos, y riesgos del estudio, que incluye la autorización a realizar el estudio alergológico, y a la toma de muestras biológicas (Ver anexo 8).

5.- DESCRIPCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA.

El producto que se utiliza en la ITSL-Pru p 3 es un extracto de melocotón estandarizado en el contenido de Pru p 3 y formulado en tampón fosfato y 50% de glicerol (recientemente comercializada por laboratorios ALK-Abelló, S.A., Madrid, España). La estandarización del alérgeno se basa en el contenido del alérgeno mayor

(Pru p 3) a la concentración de 50 µg/mL. Dicho tratamiento se proporciona en viales de 2 mL.

5.1. Vía y forma de administración

El producto se administró por vía sublingual. Éste se mantiene en el área sublingual durante 2 minutos y posteriormente se traga la parte del producto no absorbida.

5.2. Calendarios de dosis

Se realiza en dos fases. La primera, de cuatro días de duración, y de ámbito hospitalario, consiste en una administración diaria con dosis creciente del extracto cada día, comenzando por una gota, en intervalo de cada 15 minutos según la tabla 5, hasta alcanzar una dosis cuatro veces mayor que la dosis de mantenimiento, para garantizar la seguridad de la administración posterior que el paciente realizó en su domicilio.

Fase	Día	Concentración de Pru p 3 (µg)	Gotas	Dosis total acumulada	Intervalo de tiempo entre dosis (min)	
INICIO	1	0,4	1	26,4	15	
		4	10			
		2	1			
	2	20	10	110	15	
		10	1			
	3	100	10	900	15	
		50	1			
		100	2			
	4	250	5	1000	Única	
		500	10			
	Mantenimiento	5*	1000	20	200	Única

Tabla 5. Tabla con la pauta de administración de dosis de ITSL-Pru p 3, y total de µg. * Dosis total que el paciente debe repetir cada día en domicilio.

6.- METODOLOGÍA DE TÉCNICAS Y PRUEBAS DE ESTUDIO

6.1. Estudio alergológico *in vivo*

El diagnóstico de certeza en los pacientes con sospecha de alergia a melocotón por sensibilización a LTP, se basa en una historia clínica compatible por reacciones cutáneas o sistémicas inmediatas (<1 hora) tras la ingesta de melocotón, junto a una prueba cutánea intraepidérmica al alérgeno mayor de melocotón Pru p 3, una LTP, e IgE específica frente al mismo con título mayor a 0,35 kUA/L. La confirmación del diagnóstico se realiza tras la prueba de tolerancia en medio hospitalario realizada a doble ciego controlada con placebo en todos los casos salvo en los pacientes que refieren episodios de anafilaxia tras su ingesta en más de una ocasión durante los dos años anteriores.

6.1.1. Historia clínica

Se realizó una historia clínica alergológica completa y un cuestionario recogiendo los siguientes datos demográficos y clínicos: edad, sexo, antecedentes personales, antecedentes familiares de atopia, hábito tabáquico, edad de comienzo de los síntomas, años de evolución, comorbilidad (conjuntivitis, asma, otitis, dermatitis atópica, alergia a medicamentos, hipersensibilidad a AINE), sensibilización a pólenes (gramíneas, olivo, *platanus*, *artemisia*, ciprés), sensibilización a otros alimentos de origen vegetal, evolución, factores desencadenantes (cuestionario general y de episodios) (ver anexos 11 y 12).

En la anamnesis dirigida se incluyen reacciones dentro de la primera hora tras la ingesta de melocotón y otros alimentos de origen vegetal compatibles con sensibilización por LTP, como otras frutas de la familia rosácea, principalmente manzana, albaricoque, cereza, ciruela, fresa, nectarina, y pera, y otras como uva, kiwi, plátano, así como cítricos, leguminosas como cacahuete, cucurbitáceas, espárrago, lechuga, tomate, semillas, especias, y resto de frutos secos. Las manifestaciones clínicas recogidas comprenden síntomas cutáneos y sistémicos:

.- **Urticaria:** lesión elemental maculo-papular tipo habonosa pruriginosa, evanescente en menos de 24 horas, única, o múltiple, en ocasiones confluyente de grandes

elementos, y benigna, que se resuelve sin lesión residual. Manifestación que puede presentarse aisladamente, o precediendo a una reacción generalizada.

.- **Angioedema:** se trata de edema por afectación de la dermis profunda o hipodermis. Clínicamente hay zonas subcutáneas, sobreelevadas, pastosas al tacto, cubiertas de una piel de aspecto normal o levemente eritematosa. El paciente aqueja de sensación de tirantez pruriginosa o tipo quemazón. Su aparición es brusca, pero su resolución es más lenta, de horas a 1-2 días. Puede darse en cualquier localización, pero la más frecuente es en cara, afectando párpados, labios, lengua, o úvula. Puede presentarse igualmente como manifestación aislada, o junto a otros síntomas que componen el denominado síndrome de alergia oral, o como primera manifestación de una reacción sistémica posterior.

.- **Síndrome de alergia oral (SAO):** cuadro clínico que comprende síntomas localizados a nivel de la mucosa oro-faríngea, que pueden resultar como expresión de una dermatitis de contacto local o bien como primera manifestación de una reacción mediada por IgE en la mucosa gastrointestinal. Su inicio es inmediato a la ingestión del alimento, de carácter local y leve, que desaparecen en menos de 3-4 horas con o sin tratamiento con antihistamínicos. Puede manifestarse aisladamente como prurito orofaríngeo, o acompañarse de otros síntomas como angioedema labial, lingual, de úvula, urticaria oral o peribucal, o sensación de bolo faríngeo o prurito en la piel del cuello.

.- **Anafilaxia:** afectación multiorgánica potencialmente fatal que ocurre generalmente de segundos a 60-180 minutos tras la ingestión del alimento. Se puede manifestar como prurito palmo-plantar-ótico-genital, y generalizado, junto a eritema generalizado urticariforme, angioedema, y/o manifestaciones a otro nivel como gastrointestinal con despeños diarreicos, dolor abdominal tipo cólico, vómitos, pirosis; neurológico con mareo o inconsciencia; respiratorio como broncoespasmo con tos repetitiva, disnea, sibilantes, o rinoconjuntivitis con estornudos en salva, hidrorrea, epífora, inyección conjuntival, y prurito nasooocular; o cardiovascular con hipotensión, angina, o arritmias cardíacas. Se clasifica según su potencial severidad en leve, moderada, o severa (131).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

6.1.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas con aeroalérgenos, y extractos de alimentos.

Se llevaron a cabo según el protocolo descrito por el grupo europeo (EAACI) (418, 427, 593), y en las diferentes visitas previo y durante la IT.

Material:

- Gel hidroalcohólico.
- Clorhexidina al 2%.
- Gasas.
- Bolígrafo dermatográfico.
- Lancetas de punta corta (1 mm), tipo puntura (Hollister-Stier y Miles, UK).
- Control negativo suero glicerosalino al 50% (diluyente presente en todos los extractos).
- Control positivo: clorhidrato de histamina a 10 mg/ml.
- Papel secante.
- Esparadrapo transparente microperforado (50mm x 10mm)
- Corticoides tópicos.

Procedimiento y criterio de evaluación:

Se utilizó la técnica intraepidérmica con diferentes concentraciones de extracto de melocotón estandarizado (ALK-Abelló, Madrid, España, S.A.) que contienen 0.4, 2, 10, y 50 µg/mL de Pru p 3, así como para polen de gramíneas (*phleum pratense*, *hierba timotea* y *lolium perenne*), olivo, *platanus acerifolia*, artemisia, *parietaria judaica*, y ciprés; ácaros del polvo (Dp); hongos (*alternaria*); látex; epitelios de perro y gato; y otros alimentos como manzana, avellana, nuez, almendra, kiwi, trigo, tomate, lechuga, y cacahuete (Tabla 6). Además, se realizaron pruebas cutáneas con histamina a 10mg/mL y solución salina como controles positivos y negativos, respectivamente. Estas pruebas se hicieron por duplicado en la cara interna de la superficie anterior del antebrazo. Se aplicaron unas gotas del alérgeno, previa limpieza de la piel, a continuación con una lanceta de 1 mm de punta (Hollister-Stier y Miles, UK), se realizó una pequeña punción superficial, para que de este modo el alérgeno penetre en la zona de unión dermoepidérmica. Se consideró la prueba positiva cuando se produjo un tamaño de pápula 3 mm mayor que el salino de control. Es una técnica muy sencilla, económica, con una alta sensibilidad para el estudio de alergia a alimentos.

Grupo	Nombre	Nombre común
Pólenes	<i>Phleum pratense</i>	Gramíneas (Hierba timotea)
	<i>Lolium perenne</i>	Gramíneas (Ballico)
	<i>Plátanus acerifolia</i>	Plátano de sombra
	<i>Olea europea</i>	Olivo
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Artemisia
	<i>Parietaria judaica</i>	Parietaria
Ácaros	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Ácaro del polvo doméstico
Hongos	<i>Alternaria alternata</i>	Alternaria
Látex	<i>Hevea Brasilensis</i>	Látex
Epitelios	<i>Canis familiaris</i>	Perro
	<i>Felis domesticus</i>	Gato
Alimentos	<i>Prunus pérsica</i>	Melocotón
	<i>Malus domestica</i>	Manzana
	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
	<i>Corylus avellana</i>	Avellana
	<i>Prunus dulcis</i>	Almendra
	<i>Actidinia deliciosa</i>	Kiwi
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga	

Tabla 6. Batería de alérgenos testados para prueba cutánea intraepidérmica.

Los pacientes y los padres/tutores legales en caso de menores fueron informados de la necesidad, para evitar resultados falsos negativos, de suspender el tratamiento con algunos fármacos al menos 10 días antes de realizar las pruebas. Además, en el momento de las pruebas, el paciente no debe sufrir ningún proceso infeccioso o inflamatorio, dado que podría aumentar la posibilidad de la inducción de una reacción sistémica. Además, los fármacos beta-bloqueantes se deben suspender de acuerdo con su vida media de eliminación (48 horas), debido a que podrían interferir en el tratamiento de una reacción sistémica en el momento del estudio.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

6.1.3. Provocación oral doble ciego controlada con placebo (PDCCP)

Material y equipamiento:

- Zumos de naranja (*Sunny Delight Beverages Co., Barcelona, España*).
- Pieza de melocotón completo de 150 g.
- Coco desecado.
- Café soluble descafeinado.
- Cereales infantiles sin gluten (Hero Baby, Suiza).
- Colorante rojo alimentario para aerógrafo (deKora Innova, Alicante, España, S.A.)
- Confitura de naranja amarga (Hero, Suiza, S.A.)
- Cacahuete
- Batidora y vaso (Braun Minipimer, DeLonghi, Barcelona, España, S.A.)
- Cuchara de plástico desechable
- Cuchillo de pelar

Procedimiento:

Se realizaron siempre en un medio hospitalario, y tras haber firmado el consentimiento informado, pues se somete al riesgo de confirmar o descartar el diagnóstico de alergia al alimento testado a través de la inducción controlada de una reacción alérgica IgE mediada, por lo que la intensidad de la futura reacción no es predecible de antemano. Siguiendo las normas actuales de la EAACI (430, 457). Para ello se administraron las dosis del alimento en una escala ascendente con intervalos de tiempo de 20 minutos, para ser capaz de identificar y tratar el inicio de síntomas a la menor dosis posible. Se administraron alimentos o placebo en días separados, y se prepararon inmediatamente antes de la prueba. Se ha de mantener un período de observación posterior a su finalización de hasta 2 horas.

Antes de realizarlas, el paciente debe seguir unas recomendaciones. Debe evitar el alimento que se va a provocar y se debe evaluar el estado basal del paciente y controlar los síntomas de alergia que el paciente tuviera (rinitis y/o asma o dermatitis atópica o urticaria), no pudiendo realizarse ese día en caso de brote. Se permite para el control de estas patologías de base el tratamiento con corticoides tópicos e inhalados, así como con inhibidores de la calcineurina, o antagonistas de los leucotrienos o beta-agonistas. La eliminación de los alimentos debe hacerse al menos

dos semanas previas a la prueba, aunque se evaluará cada paciente individualmente. Hay que tener en cuenta que las restricciones estrictas de alimentos a los que el paciente está sensibilizado pueden provocar que durante las pruebas el paciente sufra reacciones más graves (490). El paciente debe estar en ayunas, aunque la ingesta de líquidos si está recomendada. Otras causas por las que no se puede realizar la provocación son:

1. Infecciones agudas;
2. Enfermedades y condiciones que puedan alterar la seguridad para el paciente como una angina inestable, arritmias cardíacas, o embarazo.
3. Encontrarse en tratamiento con antihistamínicos o medicamentos con dichas propiedades, ya que pueden enmascarar los síntomas que pueda presentar el paciente. Deben evitarse al menos 5 días antes. Así como corticoides sistémicos si su suspensión no se ha realizado de 7-14 días previos, pues en este caso además se podría incurrir en un falso positivo por rebrote de una urticaria crónica ante su suspensión. O en tratamiento con AINE, IECA, antiácidos, o toma de alcohol horas previas, pues podrían actuar como factores agravantes o inductores de reacción (52). El tratamiento con beta-bloqueantes puede plantear problemas de seguridad si se requiere adrenalina (594).

Se realizaron a tiempo basal, fuera de la estación polínica, como criterio de inclusión su respuesta positiva, y a los 12 meses de tratamiento con ITSL-Pru p 3.

Uno de los pasos importantes es la preparación del alimento para la PPDCCP:

A: MELOCOTÓN:

En la preparación activa, la preparación con un melocotón completo con piel de unos 150 g, se enmascara con 80 mL de zumo de naranja (*Sunny Delight Beverages Co., Barcelona, España*), junto con una cucharadita de coco desecado y otra de café soluble descafeinado, y 20 g de cereales infantiles sin gluten. Para la preparación placebo el melocotón se reemplaza con una cantidad equivalente de coco desecado y se añaden hasta 120 mL de zumo de naranja, y hasta 40 g de cereales infantiles. Ambas enmascaradas en color por unas gotas de colorante alimentario de color rojo. Se administran hasta 7 dosis con un intervalo de 20 minutos y tras la última dosis el paciente permanece bajo observación durante 2 horas. Se comienza con una preparación que contiene 5 mL (2,5 gr de melocotón), incrementado las dosis cada 20

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

minutos hasta alcanzar una dosis total acumulada de 300 mL que equivale a un melocotón con piel de 150 g.

B: CACAHUETE:

En la preparación activa, la preparación con cacahuetes, se enmascara con mermelada de naranja amarga. Se prepara cada dosis justo antes de la administración del alimento para evitar la oxidación del fruto seco. Para el placebo se utiliza mermelada de naranja amarga y una cantidad equivalente de cereal sin gluten para darle textura. Se administran hasta 5 dosis con un intervalo de 20 minutos y tras la última dosis el paciente permanece bajo observación durante 2 horas. Se comienza con una preparación que contiene 0,5 gr de cacahuete equivalente a ½ cacahuete, las siguientes tienen un factor de incremento de 2 hasta alcanzar la dosis máxima de 14 gramos de cacahuete que equivalen a 15 unidades del mismo.

Criterios de evaluación:

La evaluación del resultado de la prueba es clínica y actualmente no existen criterios estandarizados. La decisión de cuando parar la prueba es del médico responsable de la prueba, y se hizo cuando el paciente tuvo síntomas objetivos. En algunas circunstancias hay que tener presente los síntomas subjetivos que pueden ser indicativos de una prueba positiva (Figura 31). Aunque hay que tener en cuenta que parar la prueba por estos síntomas puede llevarnos resultados falsos positivos.

Tras cada dosis administrada, se evaluó la presencia de SAO y su intensidad en una escala visual analógica (ver Figura Anexo 7). La provocación se paró ante la aparición de los primeros síntomas objetivos y se procedió al tratamiento de los pacientes, o tras tres dosis consecutivas con SAO con una EVA >2. Este último criterio se ha incluyó porque los pacientes que sólo presentaron SAO se excluyeron para este estudio. Para evaluar los síntomas se utiliza un score que no está validado pero viene de la experiencia clínica (ver Anexo 5, Figura).

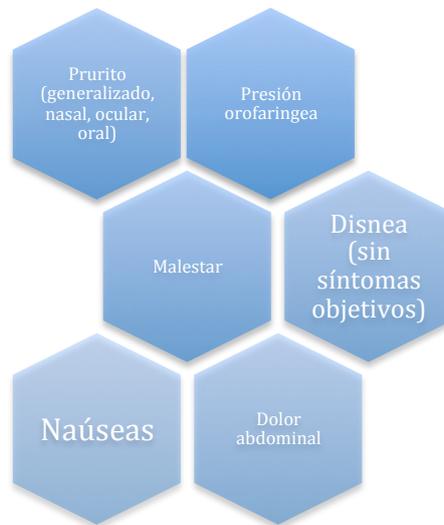


Figura 31. Esquema síntomas subjetivos.

6.2. Estudio *in vitro*

6.2.1. Obtención y procesamiento de muestras

Las muestras sanguíneas utilizadas en el estudio se obtuvieron por venopunción y se procesaron de forma específica según las determinaciones a realizar.

- Determinación de inmunoglobulinas para UniCap: Las muestras se recogieron en tubo con gelatina, manteniéndolas a temperatura ambiente y procesándolas durante la hora siguiente a la extracción mediante centrifugación durante 5 minutos a 2000 g. Una vez obtenido el **suero**, éste se congeló inmediatamente a -20°C para su conservación y en espera de su posterior uso.
- Test de activación de basófilos: Las muestras se recogieron en tubos de heparina lítica, y se mantuvieron a temperatura ambiente en agitación suave hasta la realización del test en un período no superior a 24 horas.
- Estudios celulares: Se recogieron 50 mL de sangre en tubos con heparina lítica. De aquí se obtuvo la fracción mononuclear (PBMC, del inglés, peripheral blood mononuclear cells) constituida por monocitos y linfocitos, mediante gradiente de densidad continuo (Figura 32) a través de Ficoll-Hypopaque. Y las células se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido hasta la realización de posteriores análisis.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

* Procedimiento Ficoll-Hypopaque: La muestra de sangre total se diluyó en una proporción 1:1 en solución salina fisiológica y se dispensó de una forma muy cuidadosa para no romper la barrera de densidad entre ambos líquidos, sobre una cantidad de Ficoll-Paque correspondiente a un tercio del volumen de muestra por tubo. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 1800 rpm y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se recogió con una pipeta *pasteur* el halo blanquecino en el que se encontraba la **fracción mononuclear**. Estas células recogidas (linfocitos y monocitos), se lavaron dos veces (10 minutos a 1800 rpm y a 800 rpm) en solución salina, y se diluyeron finalmente en 1 mL de medio completo (MC).

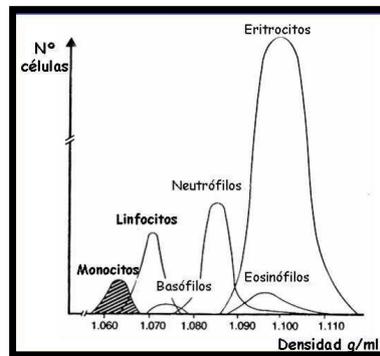


Figura 32. Distribución de las células sanguíneas en un gradiente de densidad continuo.

Todas las PBMC obtenidas se congelaron hasta su posterior uso, para después ser separadas en linfocitos y monocitos (Figura 33).

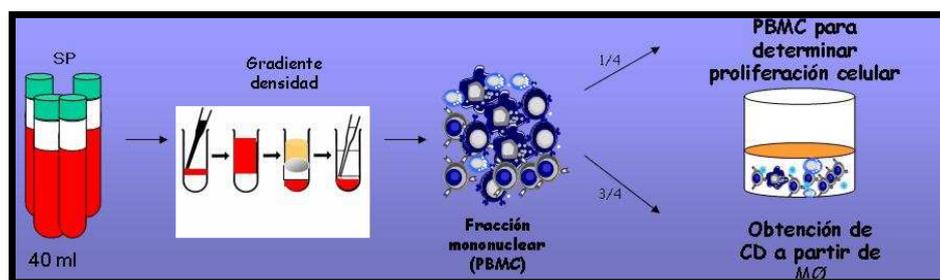


Figura 33. Procesamiento de las muestras. Obtención de la fracción mononuclear (PBMC).

* Procedimiento de congelación: Sobre las muestras se añadió 500 μ L de medio RP40 junto a DMSO 20%, gota a gota y en agitación sobre hielo, para posteriormente pasarlas a criotubos y congelarlas a -80°C rápidamente sobre cajas de isopropanol. Así se mantuvieron 24 horas hasta que fueron pasadas a nitrógeno líquido.

* Procedimiento de descongelación celular: Se precisaron dos lavados realizados rápidamente. El primero con MC, se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm y se decantó el sobrenadante. El segundo tras resuspenderlas en PBS. Se contaron las células y se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm.

* Procedimiento de aislamiento de monocitos: Los monocitos se aislaron de las PBMCs previamente congeladas mediante bolitas magnéticas con Ac anti-CD14 (marcador presente en monocitos únicamente) según el protocolo de Macs Miltenyi Biotec, realizado en condiciones de esterilidad y en frío, con el fin de evitar tanto la agregación celular, como las uniones inespecíficas:

Las PBMC se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 8 mL de tampón de columnas. Se contaron las células totales y se concentraron alrededor de 10^7 . Por cada 10^7 se añadieron 80 μ L de PBS columna y 20 μ L del Ac anti-CD14 Microbeads, homogeneizando bien las muestras. Se incubó durante 15 minutos a 4°C. Tras ese intervalo de tiempo, se añadió 1-2 mL de tampón de columnas nuevamente y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. A partir de aquí se resuspendieron las muestras a 10^8 células en 500 μ L de tampón de columnas. Para la separación magnética se precisó de las columnas MACS LS, y del separador magnético MACS. Para ello, tras acoplar la columna al campo magnético, se le añadió 3 mL de tampón de columnas con el fin de activarlas. Tras esto, se pasó la suspensión celular a través de la columna de forma que las células marcadas con el anti-CD14 monoclonal quedaron retenidas en la columna. Se fue lavando cada 3 veces con un volumen de 3 mL de tampón columnas, añadiendo finalmente 9 mL del mismo tampón con la que se obtuvo la fracción negativa ($CD14^-$) de la que se obtendrán posteriormente los linfocitos. Seguidamente se retiró la columna del imán y recogió la fracción positiva ($CD14^+$) en un volumen de 5 mL.

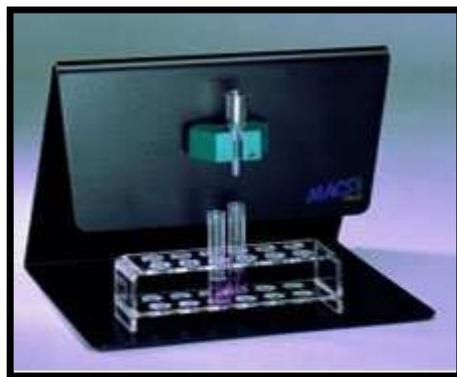


Figura 34. Columna magnética Miltenyi MACS para aislamiento de subpoblaciones celulares.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

6.2.2. Determinación humoral de IgE e IgG4 específica (IgEe e IgG4e) (ImmunoCAP)

Material y equipamiento

- Tubos con gelatina
- Calibradores IgE Total ImmunoCAP.
- Curva control IgE Total ImmunoCAP.
- IgE específica ImmunoCAP.
- Conjugado IgE específica ImmunoCAP.
- Calibradores IgE específica ImmunoCAP.
- Curva control IgE específica ImmunoCAP.
- Sistema de revelado ImmunoCAP.
- Solución de lavado (ImmunoCAP/Pharmacia CAP system).
- Calibrador del fluorímetro (ImmunoCAP FluoroC).
- Centrífuga Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments, Kendro laboratories)
- UniCAP Phadia 100

- Calibradores IgG4 Total ImmunoCAP.
- Curva control IgG4 Total ImmunoCAP.
- IgG4 específica ImmunoCAP.
- Muestra diluyente IgG4 ImmunoCAP
- Conjugado IgG4 específica ImmunoCAP.
- Calibradores IgG4 específica ImmunoCAP.
- Curva control IgG4 específica ImmunoCAP.

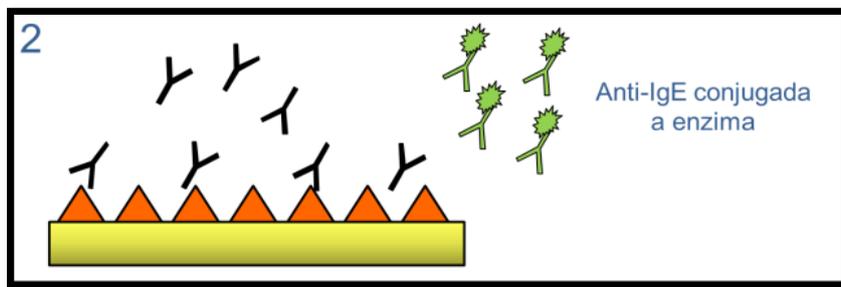
Procedimiento IgEe:

Para medir los niveles de IgEe frente a Pru p 3, y Ara h 9, circulantes en las muestras de suero, utilizamos la técnica ImmunoCAP siguiendo las recomendaciones del fabricante. En esta técnica los alérgenos testados se han unido covalentemente a un soporte polimérico de celulosa activado, denominado ImmunoCAP. El método consiste en un fluoroenzimoimmunoensayo en fase sólida donde

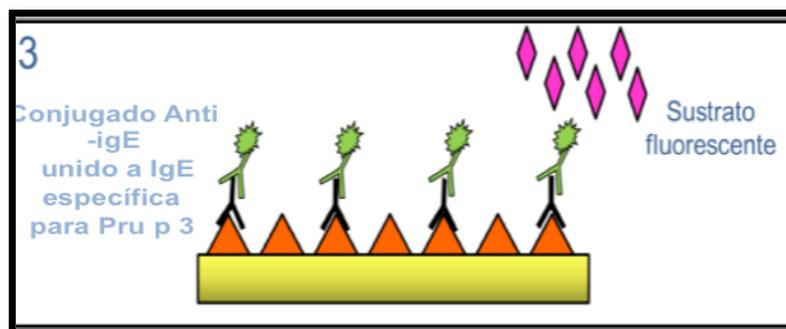
1. Los immunoCap se incuban con el suero del paciente, de manera que la IgE específica al alérgeno presente en el mismo se une a su antígeno específico y se forma un primer complejo.



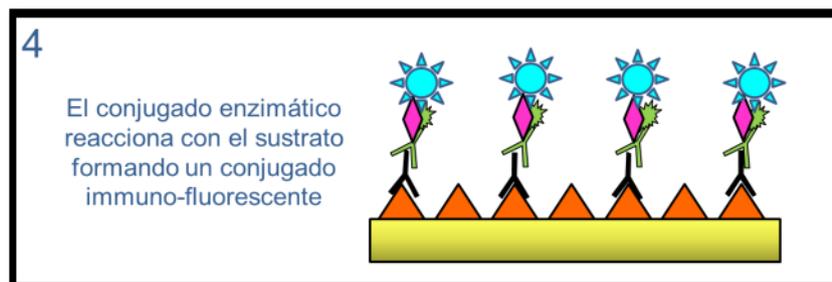
2. Después de un primer lavado en la que la IgE no específica es eliminada, añadimos un anticuerpo anti-IgE marcado con una enzima (β -galactosidasa) formando un complejo. Después de la incubación el enzima anti-IgE no unido es eliminado mediante otro lavado.



3. El complejo final es posteriormente incubado con la solución de desarrollo que contiene el sustrato de la β -galactosidasa.



4. Después de parar la reacción se mide la fluorescencia del fluido.



Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Procedimiento IgG4e:

El procedimiento es similar al descrito previamente para la determinación de IgEe. Se comienza por una dilución de IgG4 a 1/100 pues esta inmunoglobulina se encuentra en mayor concentración en suero respecto a la IgE. Dicha dilución se incuba con 40 μ L del suero del paciente, y posteriormente se lava para retirar el exceso no unido. A continuación se añaden 50 μ L de la solución conjugada de Ac monoclonal Anti-IgG4 con β -galactosidasa para que se una a los complejos de antígeno-IgG4 del paciente, y tras su incubación se adiciona la solución de revelado que contiene el sustrato frente al enzima beta-galactosidasa, y tras parar la reacción, se mide la fluorescencia del fluido.



Figura 35. Equipamiento UniCap.

Criterios de evaluación:

Para evaluar los resultados, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones kUA/L utilizando una curva de calibración. Se consideraron positivos los resultados > 0.35 kUA/L, y los valores superiores a 100 KU/L se consideran elevados. Para IgG4e en mg_A/L . Ambos para Pru p 3 y Ara h 9 (LTP). También se calculó la proporción IgG4e/IgEe, pasando ambas a la misma unidad en ng/L (595). Se realizaron determinaciones a tiempo cero, y tras 1, 6, y 12 meses de iniciar el tratamiento con ITSL-Pru p 3 en el grupo de tratados y no tratados.

6.2.3. Estudio celular por el test de activación de basófilos

Con este test se determina la presencia de IgEe a los diferentes alérgenos unida a la superficie de los basófilos. En este test tras la incubación de las células con los alérgenos se determina la activación de los basófilos mediante el aumento de la expresión de CD63, en caso de producirse la degranulación (60).

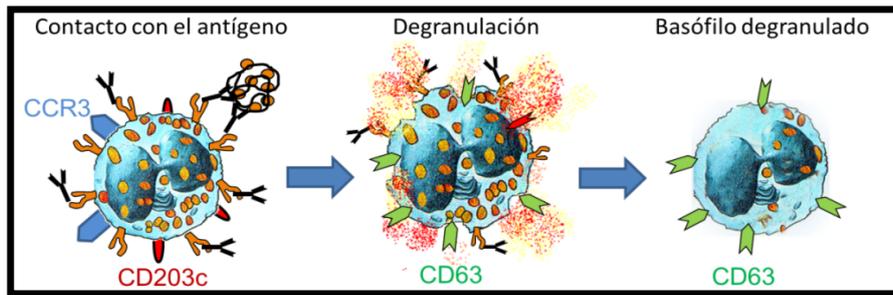


Figura 36. Fundamentos del Test de activación de basófilos.

Material y equipamiento:

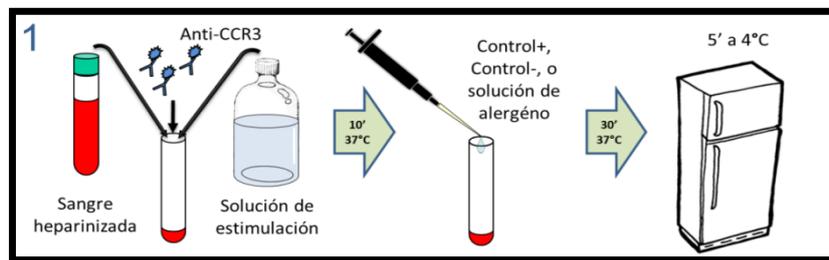
- Tubos poliestireno de 5 mL (BD Falcon TM; Becton Dickinson Erembodegem-Dorp 86, Erembodegem, Belgium).
- Solución de Estimulación complementada con rhIL-3 (R&D system, Minneapolis MN, EEUU).
- Solución de Lisis: BD FACS Lysing solution (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EEUU).
- Solución de lavado: Tampón fosfato salino (PBS 1X)–Tween 20 al 0.1% (p/v).
- Control positivo de Ac IgE (BD Pharmigon) y fMLP (péptido quimiotáctico N-Formil-Met-Leu-Phe) (OrpeGen Pharma, fMLP stock Solution).
- Control positivo de mecanismo IgE mediado: Anti human IgE (BD Pharmigen).
- Anticuerpo monoclonal Anti-Human CCR3-APC (APC=allophycocyanina) (Biolegend).
- Anticuerpo monoclonal Anti-Human CD123c-PE (PE=ficoeritrina) (Biolegend).
- Anticuerpo monoclonal CD63-FITC (FITC=fluoresceína) (Biolegend).
- Alérgenos Pru p 3 y Ara h 9 (ALK-Abelló, Dinamarca).
- Citómetro de Flujo, FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EEUU).
- Baño de agua para incubación a 37°C (P-Selecta Unitronic-OR).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

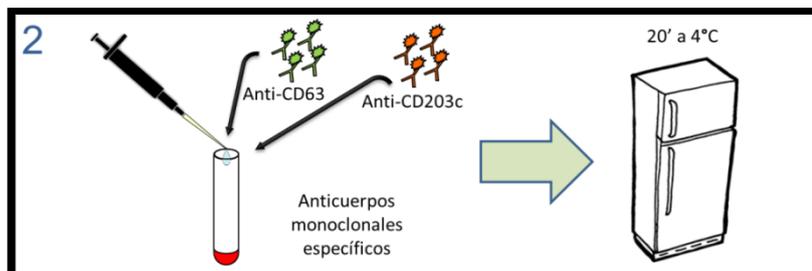
- Centrifuga.
- Refrigerador.
- Cámara oscura.

Procedimiento:

1. Degranulación: Se añadieron 100 μ l de sangre completa heparinizada y 20 μ l de solución de estimulación (1 M HEPES que contiene 0,78% de NaCl, 0,037% de KCl (p/v), 0,078% CaCl_2 (p/v), 0,033% MgCl_2 (p/v), 0,1% HSA (p/v), y 10 μ l/mL de IL-3) + 1 μ l de anticuerpo anti-CCR3-APC por muestra que se incubaron durante 10 minutos en agitación a 37°C en un baño de agua. Tras esto, se añadieron 100 μ l de solución de lavado (PBS-Tween) al tubo de control negativo, 100 μ l de anti IgE humana o fMLP (0,5 mg/mL) a los tubos de control positivo y 100 μ l del alérgeno (Pru p 3 y Ara h 9) a diferentes concentraciones (0.1-0.0001 μ g/ml). Estas concentraciones fueron elegidas mediante curvas dosis-respuesta y estudios de citotoxicidad. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C en agitación. La degranulación se detuvo mediante la incubación de las muestras a 4°C, durante 5 minutos.

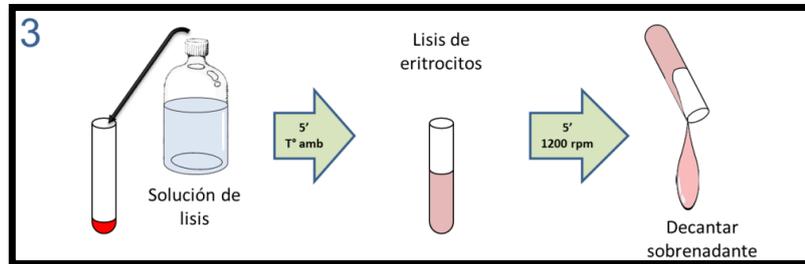


2. Marcaje: las células fueron marcadas con 1.5 μ l de anticuerpo monoclonal anti-CD203c PE y CD63 FITC para caracterizar los basófilos y su activación respectivamente incubando durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

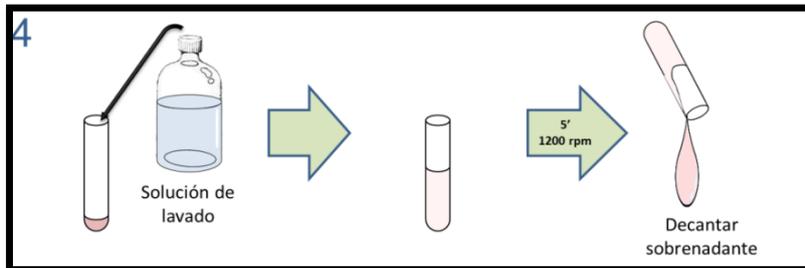


3. Lisis: posteriormente se lisaron los glóbulos rojos añadiendo 2 mL de solución de lisis e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se

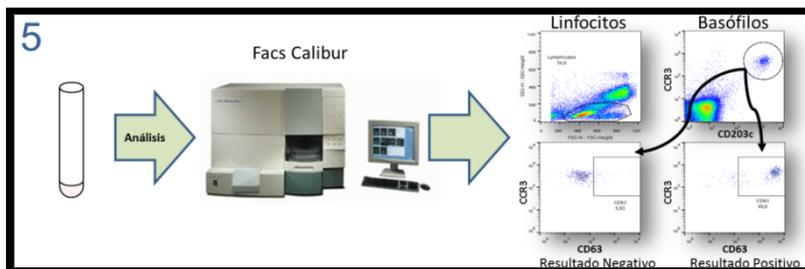
centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 1200 rpm y se eliminaron los sobrenadantes por decantación.



4. Lavado: Las muestras se lavaron con 3 mL de solución de lavado, se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y se eliminaron los sobrenadantes por decantación.



5. Análisis: Tras los lavados, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience), obteniéndose al menos 500 basófilos por muestra. Los resultados se analizaron mediante el programa CellQuest (BD Bioscience). Los basófilos fueron seleccionados como aquellas células CCR3⁺CD203c⁺ dentro de la nube de linfocitos. La activación se determinó mediante la expresión del marcador CD63⁺.



Los resultados fueron considerados positivos cuando el índice de estimulación (IE), calculado como la proporción entre el porcentaje de basófilos degranulados con el

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

alérgeno y el control negativo (muestras sin estímulo), fue superior a 2, en al menos una de las concentraciones de alérgeno.

6.2.4. Estudio celular a través de células dendríticas y subpoblaciones de linfocitos.

Se analizaron los cambios *in vitro* en la maduración de células dendríticas y el porcentaje de diferentes subpoblaciones de linfocitos, así como su proliferación entre la fase basal y las revisiones periódicas.

Material y equipamiento:

- MC, compuesto de RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, Gentamicina a 50 g/mL y suero, dependiendo del experimento, suero bovino fetal (SBF) de complementado mediante calentamiento, o suero autólogo de cada paciente, ambos al 10% (BioWhittaker, Pittsburgh, PA; EEUU).
- Tampón de columnas: PBS 1X; EDTA 1,6% v/v; BSA 0,5%.
- PBS 10x: NaCl 8% (p/v); KCl 0,2% (p/v); NH₄PO₄ 1,44% (p/v); KH₂PO₄ 0,24% (p/v); agua bidestilada. Ajustar pH a 7,4.
- Tampón de lisis: HEPES 50 mM, pH=7,5, NP-40 0,5%, NaCl 100mM, EGTA 2 mM, EDTA 2mM, y los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa que se añaden en fresco PMSF 1mM, Pepstatina 2,5 µg/mL, DTT 1mM, E64 10mM, Benzamidina 20 µg/mL y NaF 10mM.
- Tubos poliestireno de 5 mL (Kartell, Noviglio, Milán, Italia)
- Tubos heparinizados (Vacountainer GIBCO-BRL, Grand Island, NY, EEUU)
- Tubos cónicos de 10 y 20 mL (Nunc AS, Roskilde, Dinamarca)
- Ficoll-Hypopaque (GE Healthcare UK, Ltd, Little Chalfont Buckinghamshire, Gran Bretaña)
- Pipetas Pasteur (Sigma-ALdrich, Sant Louis MO, EEUU)
- Solución salina fisiológica 5%
- Azul tripán
- Criotubos (Nunc AS, Roskilde, Dinamarca)

- Columnas magnéticas Macs LS (Miltenyu Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- Jeringa de 5 y 10 mL (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose CA EEUU)
- Pipetas graduadas de 5, 10, 25, 50 mL (TPP, Trasadingen, Suiza)
- Placas de 12 pocillos (Nunc AS, Roskilde, Dinamarca)
- Placas de 96 pocillos con forma en U (Nunc AS, Roskilde, Dinamarca)
- Placas de 96 pocillos con forma plano sin tratar (Nunc AS, Roskilde, Dinamarca)
- Tampón de tinción: PBS Dulbecco sin magnesio ni calcio; 1% FCS inactivado por el calor; 0,09% sodio azida (p/v); ajustar el pH entre 7,4-7,6.
- Marcadores CD80, CD86, CD83 (Immunotech, Marseilles, Francia)
- CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidyl ester)
- Cytometric bead array (CBA) human soluble protein master buffer Kit.
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Microscopio invertido en contraste de fase Leica CME
- Citómetro de flujo FACSCanto II (Biosciences, Milpitas, California, EEUU)
- Cámara de Neubauer
- Estufa a 37°C y 5% de CO₂.

6.2.4.1. Obtención de células dendríticas inmaduras:

Las CDim (células dendríticas inmaduras) se obtuvieron siguiendo el protocolo de Sallusto en 1994 (596) a partir de monocitos periféricos (fracción CD14⁺) separados a través de campo magnético se cultivaron en placas de 12 pocillos (3 x 10⁶ monocitos/mL) en MC suplementado con IL-4 recombinante humana (100 ng/mL) y GM-CSF recombinante humana (200 ng/mL) a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ de 4-6 días. La mitad del medio se renovó en las primeras 24 horas y cada 48 horas, añadiendo la misma concentración de citoquinas, hasta finalizar el cultivo. A partir de los 4 días de cultivo, se obtuvo una población celular no adherente con características morfológicas, fenotípicas, y funcionales de CD en un estado de inmadurez (Figura 37). El número de células y sus propiedades morfológicas se comprobaron a través de la observación al microscopio en la placa del cultivo y con tinción celular azul tripán en dilución 1/10 en cámara de Neubauer (lo que permite contabilizar las células vivas y excluir las células muertas teñidas de azul).

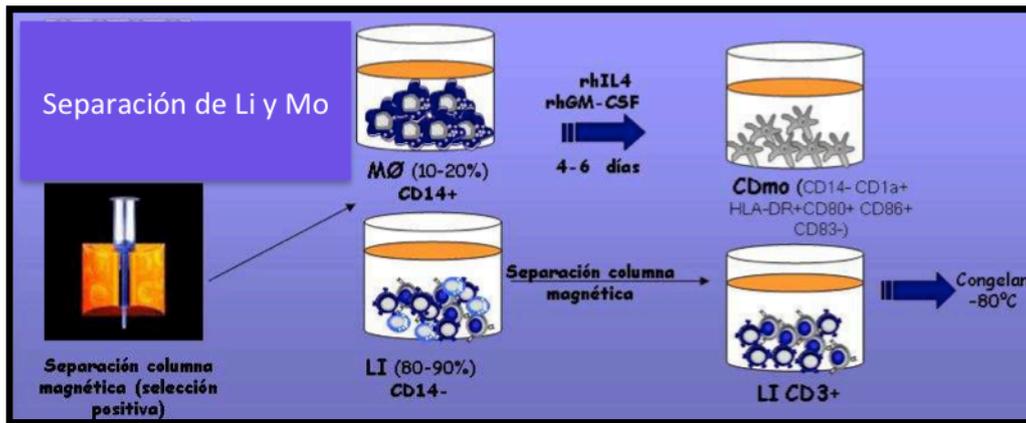


Figura 37. Separación de linfocitos (LI), monocitos (MØ), y obtención de CDmo a partir de las PBMC.

6.2.4.2. Fenotipado y maduración de CD:

Una vez obtenidas las CDim tanto de controles como de pacientes tratados con ITSL, se estudió el efecto directo del antígeno Pru p 3 sobre dichas células. Para ello se cultivaron 1×10^5 CDim en cultivo de 96 pocillos, en presencia de Pru p 3 a 25, y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 48 horas en un ambiente con 5% de CO_2 a 37°C . Como control positivo se usó $1 \text{mg}/\text{mL}$ de lipopolisacárido de Escherichia coli 0127:B8 (LPS) (Sigma). Como control negativo se mantuvieron las CDim en su medio de cultivo sin otro tipo de estímulo. Una vez pasadas las 48 horas, se recogieron las células y se fenotiparon para determinar su estado de maduración, considerado por el aumento de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, así como de los marcadores de activación CD83, CCR7, y CD40, a través del citómetro de flujo FACSCanto II. Los resultados se procesaron con el programa FACSDiva, atendiendo a los siguientes parámetros: tamaño celular (FSC), granularidad celular (SSC), e intensidad de fluorescencia para los fluorocromos utilizados. Brevemente, se estableció una primera ventana en función del tamaño y granularidad celular que integra a las CD dejando fuera de la selección los posibles linfocitos y restos celulares. A partir de aquí se analizaron en función de los marcadores ya descritos para observar que dichas células no eran monocitos ($\text{CD}14^-$), y el estado de madurez que presentaban tanto por porcentaje de células que expresan una o más moléculas de superficie (597). Los resultados se expresaron como índice de maduración (IM) en el caso de CD80 y CD86, y como índice de activación (IA) para CD40, CCR7 y CD83 obtenidos como la proporción entre el porcentaje de células que son positivas para un marcador tras la estimulación con Pru p 3 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respecto al control negativo o células no

estimuladas. El resultado se consideró positivo cuando se obtuvo un valor de expresión dos veces mayor que la condición sin estimular (IM o A>2) (598).

6.2.4.3. Fenotipado de subpoblaciones de linfocitos:

Los estudios fenotípicos se realizaron a través de citometría de flujo.

Las diferentes subpoblaciones de linfocitos se analizarán a partir de la fracción CD14⁻ obtenida en el apartado 6.2.4.2. Los linfocitos fueron marcados con diferentes anticuerpos (Ac) para poder caracterizar las diferentes subpoblaciones a estudiar:

.- **Th1:** CD4⁺IFN γ +CXCR3⁺

.- **Th2:** CD4⁺CRTH2⁺CCR4⁺

.- **Th9:** CD4⁺CRTH2⁺IL-9⁺

.- **Treg:** CD4⁺CD127_{LOW}CD25^{HIGH}FoxP3⁺

.- **NK:**

a) Subpoblación inflamatoria (Bright): CD16⁺CD56⁺IFN γ ^{High}Perf_{low}

b) Subpoblación citotóxica (Dim): CD16⁺CD56⁺IFN γ ^{low}Perf^{High}

.- **Células Plasmáticas productoras de IgE (CB):** CD19⁺CD20⁻CD138⁺CXCR3⁺IgE⁺

Para la tinción de las diferentes subpoblaciones celulares, se aplicaron dos protocolos diferentes:

- Mediante el Kit citoFix/citoperm para Th1, Th2, Th9, NK y cél plasmáticas. Se repartieron ~10⁶ células por pocillo y tras el primer lavado, se añadieron 50 μ L de tampón de tinción que contiene el mix de anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos de superficie que se querían marcar, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó dos veces con el tampón de tinción y se centrifugó a 250 xg. El pellet resultante de células se resuspendió en 100 μ L de la solución fijadora y permeabilizadora, y se incubó nuevamente a 4°C durante 20 minutos, para posteriormente lavar con 250 μ L, dos veces, en el tampón Perm/Wash. Para la tinción de las citoquinas intracelulares se añadieron 50 μ L del mix de Ac anticitoquinas

marcados con fluorocromos en tampón Perm/Wash que contiene suero bovino fetal y saponina, y se incubó 30 minutos en oscuridad a 4°C. Se lavaron las muestras dos veces con el tampón 1x de Perm/Wash, y finalmente se resuspendieron en tampón de tinción.

- Y con el protocolo Foxp3 para las células Treg. Se repartieron $\sim 10^5$ células por pocillo y se lavó. Se añadieron 50 μL del mix de anticuerpos monoclonales específicos frente los antígenos de superficie de membrana, y se incubó 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, se centrifugó a 250 xg durante 10 minutos, y se retiró el tampón de lavado. Para fijar las células, se resuspendieron en 200 μL de tampón A (preparado en el mismo día de uso tras la dilución 1:10 en agua destilada), y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó a 1630 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante con la pipeta de forma meticulosa para no arrastrar las células. Las muestras se permeabilizaron tras lavarlas con 200 μL de tampón FACS, y seguidamente se añadieron 50 μL del tampón C (a dilución 1:50 en el tampón 1xA), que se incubó durante 30 minutos, en oscuridad, y a temperatura ambiente. Para lavarlas, se añadieron 200 μL de tampón FACS. A continuación se adicionaron 50 μL del Ac frente FoxP3, y se repitió el paso anterior incubando a 30°C en oscuridad y a temperatura ambiente y lavando con 200 μL de Tampón FACS. Finalmente se agitaron y resuspendieron las muestras en tampón FACS inmediatamente antes de pasarlas por el citómetro de flujo.

6.2.4.4. Estudios de proliferación de linfocitos a través de marcaje con CFSE.

Fueron llevados a cabo mediante co-cultivos de linfocitos y CD, como CPA, previamente maduras en presencia de Pru p 3 (Test de transformación linfocitaria o TTL).

Las CD estuvieron en contacto con Pru p 3 a las dos concentraciones estudiadas (10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inducir la captación del alérgeno durante 48 horas. Tras ese período, las CD se lavaron para eliminar la presencia de Pru p 3 no procesada, y posteriormente se pusieron en contacto con los LT para favorecer la presentación del antígeno.

Los LT fueron previamente marcados con CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidyl ester), un colorante que emite en una longitud de onda de absorción similar a la del isotiocianato de fluoresceína (FITC), según las recomendaciones del fabricante. Al entrar en contacto con una célula, este marcador difunde hacia su citoplasma, y las esterasas intracelulares liberan los grupos acetatos, quedando sólo la molécula que posee el fluoróforo, de manera que las membranas celulares son impermeables a éste. Cuando una célula madre se divide por mitosis, cada una de las hijas llevará en su citoplasma la mitad de CFSE que la generación anterior, por lo que la determinación por citometría de flujo de células con cantidades menores de CFSE sugerirá la presencia de células que han proliferado a partir de un grupo inicial (Figura 38). Esta técnica permite detectar de 8-10 secuencias de divisiones celulares (599-601).

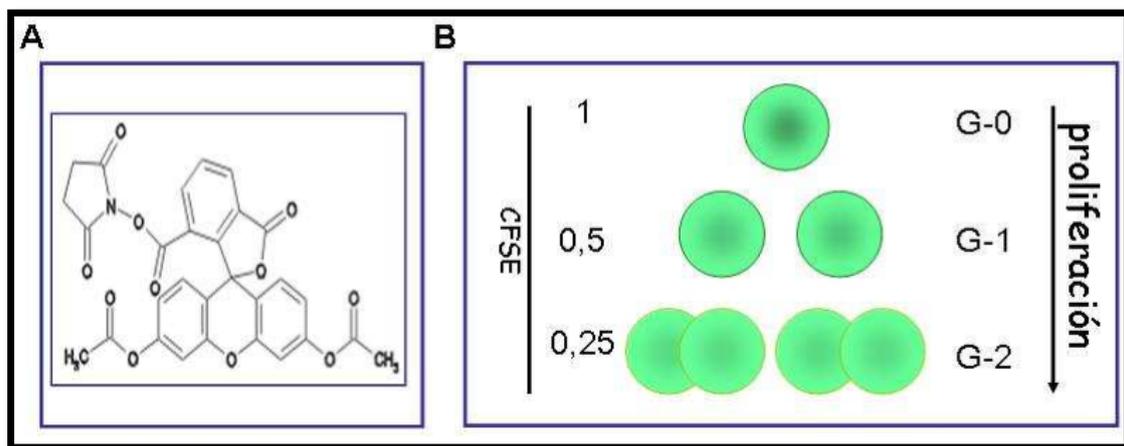


Figura 38. (A) Imagen de una molécula de CFSE. (B) División celular marcada con CFSE de forma que el colorante se distribuye en las células hijas (G-1), y así sucesivamente (G-2).

Brevemente, los LT se resuspendieron en PBS 1x, se les añadió CFSE 1 μ M, y posteriormente se tomaron 100 μ L a $1,5 \times 10^5$ /mL y se cultivaron en placas de 96 pocillos en una proporción 10:1 con las CD premaduradas, en un volumen final de 250 μ L, durante 7 días en un ambiente al 5% de dióxido de carbono a 37°C. Se usó como control positivo fitohemaglutinina (PHA) a la concentración de 10 μ g/mL (Sigma). La proliferación de los diferentes subtipos celulares (Th1, Th2, Th9, NK, Treg, y células Plasmáticas) fue analizada por citometría de flujo, obteniendo el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de LT, siendo considerados resultados positivos cuando el índice de proliferación (IP) fue mayor a 2, calculado como:

$$\% \text{ Linfocitos con CFSE} - (\% \text{ Linfocitos CFSE} + \text{CD}) / \% \text{ Linfocitos CFSE sin estímulo}$$

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

5.- VARIABLES DE ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas con distribución no normal se muestran como medianas y rangos intercuartílicos (IQR), mientras que las variables cualitativas se expresan como frecuencias.

El estudio comparativo entre grupos no relacionados se realiza comparando las medianas entre grupos usando los tests no paramétricos de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

El estudio comparativo de las variables cualitativas o categóricas se realiza mediante el análisis Chi-cuadrado para comparar las proporciones. Empleándose el test de Fisher en el caso de que el número de frecuencias observadas sea inferior a 5.

Las comparaciones estadísticas de muestras secuenciales se realizan por el test no paramétrico para muestras relacionadas (Wilcoxon o McNemar).

Se consideran resultados estadísticamente significativos las diferencias con una $p < 0,05$.

5.1. Variables relacionadas con el paciente:

Edad (variable cuantitativa), sexo (variable cualitativa), sujetos de estudio (con IT, sin IT), manifestación clínica (sistémica leve, moderada, grave), edad de inicio de clínica (años), última reacción alérgica por melocotón y cacahuete (años).

5.2. Relacionadas con cada uno de los episodios:

Eficacia clínica (variable categórica), que se clasificará en tolerancia o no, y que se medirá en términos de síntomas presentados por los pacientes, cantidad de melocotón y cantidad de cacahuete (medida en g) tolerada en el test de provocación oral.

5.3. Relacionadas con los métodos diagnósticos:

5.3.1. *In vivo*

Cambios en la sensibilización *in vivo* a Pru p 3, evaluados mediante pruebas cutáneas (medido por área de pápula por planimetría) y la diferencia entre el basal y tras 1 año de tratamiento.

5.3.2. *In vitro*

Cambios en la sensibilización *in vitro* a nivel humoral, evaluados mediante InmunoCAP (medido por IgEe e IgG4e frente a Pru p 3, Ara h 9) y la diferencia entre el basal y tras 1 mes, 6 meses, y 1 año de tratamiento.

Cambios en la sensibilización *in vitro* a nivel celular, evaluados mediante:

- Estudios de activación de basófilos (variable cuantitativa continua), medida por índice de estimulación (IE) frente a Pru p 3 y Ara h 9.
- Estudios de cambios de maduración de CD (variable cuantitativa continua), medida por índice de maduración (IM) frente a Pru p 3.
- Estudios de cambios fenotípicos de las diferentes subpoblaciones celulares (variable cuantitativa continua), medido por porcentaje de células (%) frente a Pru p 3.
- Estudios de proliferación celular (variable cuantitativa continua), medido por índice de proliferación (IP) frente a Pru p 3.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En el Servicio de Alergología del H.R.U. de Málaga, se evaluaron un total de 600 pacientes en un período de un año (2012), de los cuáles el 30% (N=180) consultaron por alergia alimentaria de origen vegetal.

Basándonos en un diagnóstico confirmado de alergia a melocotón por sensibilización a LTP, tras un estudio alergológico exhaustivo mediante historia clínica detallada, y realización de pruebas cutáneas, IgE específica positiva a LTP, y pruebas de provocación doble ciego controladas con placebo en todos los pacientes salvo los que referían reacción de anafilaxia en más de 2 ocasiones en los últimos 2 años, se incluyeron un total de 48 pacientes en el estudio.

El intervalo de tiempo transcurrido entre que sufrieron la reacción alérgica y el estudio alergológico fue menor a 10 años en el 70% de los casos (Figura 39).

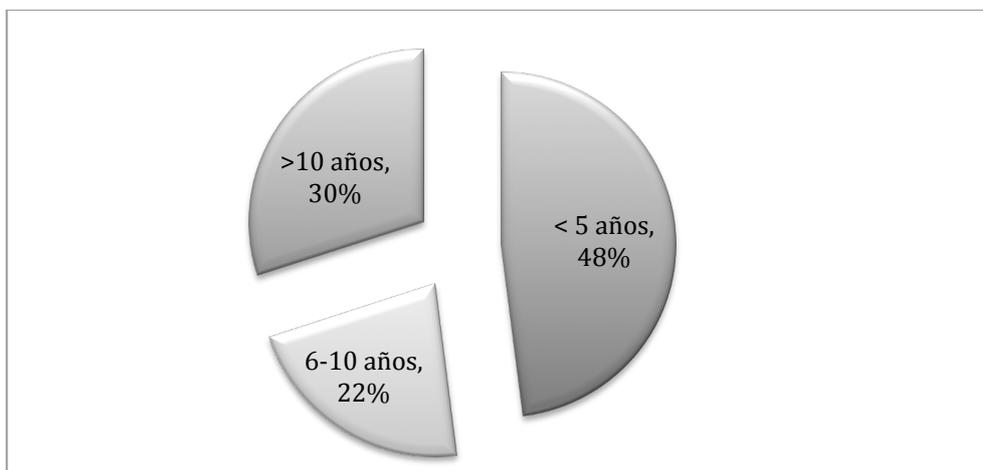


Figura 39. Pacientes estudiados (N%) según el tiempo entre la reacción y el estudio.

Del total de pacientes incluidos, 36 pacientes comenzaron tratamiento con ITSL-Pru p 3, y 12 se mantuvieron sin ITSL-Pru p 3, atendiendo a su propia decisión siguiendo práctica clínica habitual.



Figura 40. Total de pacientes que participan en el estudio. N tratados y no tratados.

1. Características clínicas y demográficas

1.1. Pacientes tratados con ITSL-Pru p 3.

Del total de los 36 pacientes que decidieron comenzar con ITSL-Pru p 3, tras ser diagnosticados de alergia alimentaria por sensibilización a LTP tras la ingestión de melocotón, la mayoría fueron mujeres (72,2%), con una mediana de edad de 30,8 años (25-35). Basándonos en la historia clínica, la mediana de edad de aparición del primer episodio tras la ingesta de melocotón, fue de 16,9 (13,2-22), y el último episodio con melocotón hace 8,56 años (2-15).

Relacionados con la atopia, de los 36 pacientes tratados, el 72,2% estaban sensibilizados a alguno de los neumoaérgenos estudiados. De ellos, el más prevalente fue el polen del olivo, con hasta un 65,4% de los pacientes sensibilizados (Figura 41).

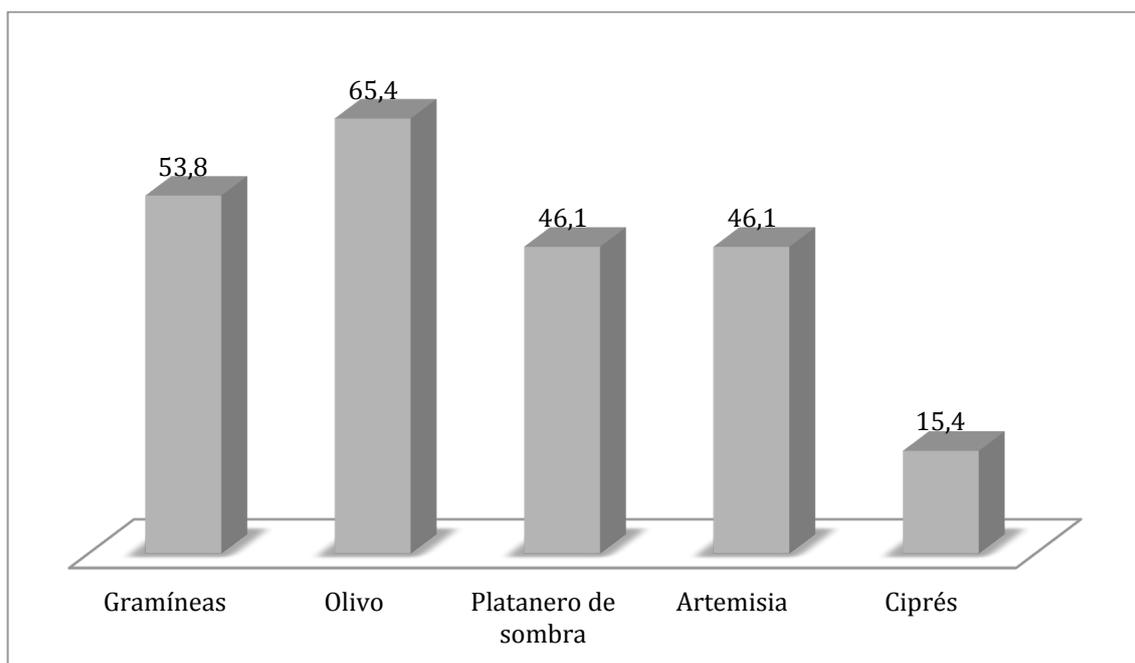


Figura 41. Perfil de sensibilización (N%) a pólenes en los pacientes que van a recibir ITSL-Pru p 3.

Tan sólo el 27,7% de los pacientes tratados presentaron clínica respiratoria asociada. El 70% por síntomas de rinitis, y el 30% restante junto a asma.

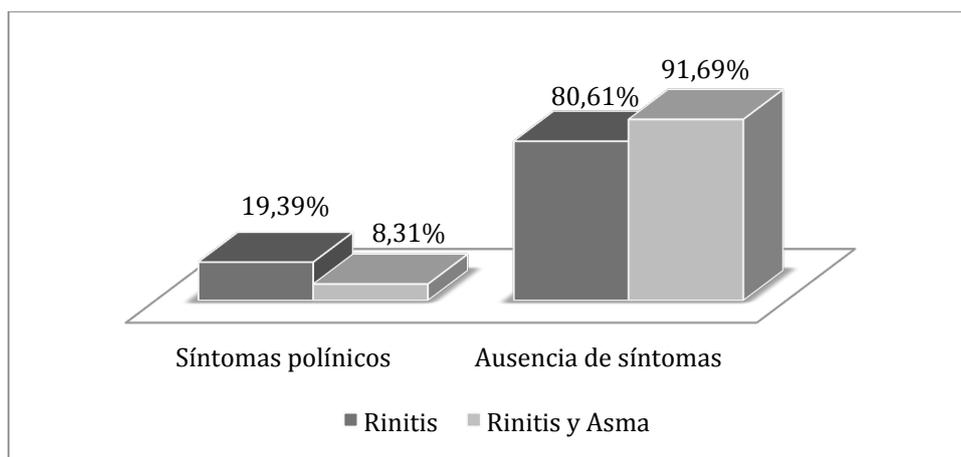


Figura 42. N(%) pacientes con síntomas por inhalación de polen.

A todos los pacientes se les realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas con una batería de alimentos más prevalentes en nuestro medio. Se analizó el perfil de sensibilización de estos pacientes a otros alimentos vegetales con los que referían síntomas, siendo del 83,33% (N=30). Se encontraron a la manzana, kiwi, fresa y plátano, así como al cacahuete, nuez, avellana y almendra, como los principales (Figura 43 y 44). Siendo la nuez y la manzana con piel los principales inductores de reacciones anafilácticas.

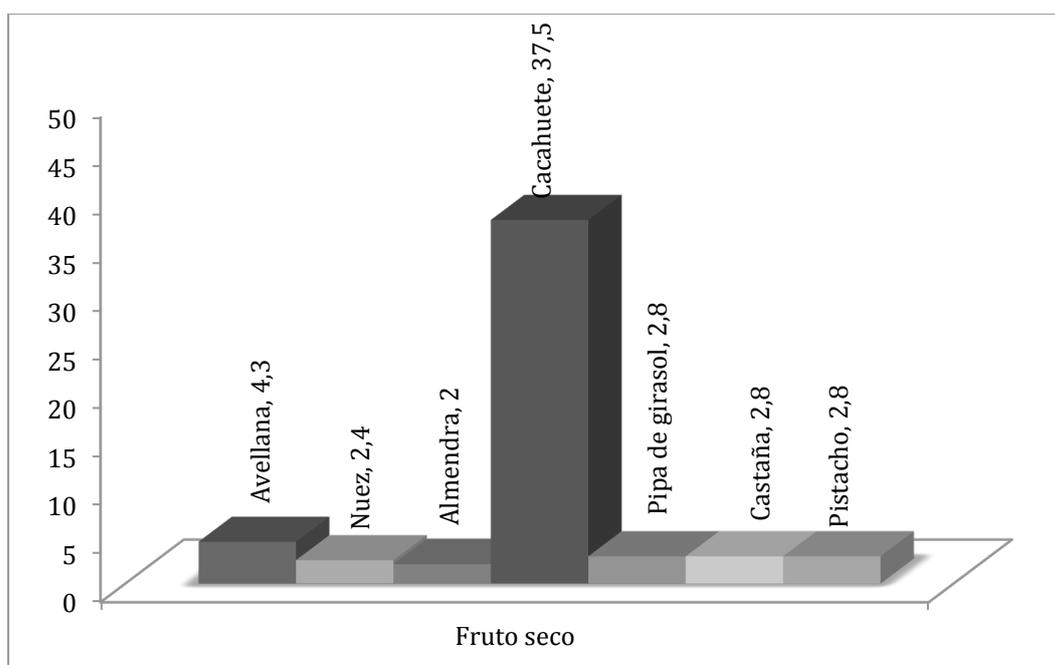


Figura 43. Perfiles de sensibilización (N(%) a otros alimentos vegetales (frutos secos) en los pacientes del grupo ITSL-Pru p 3.

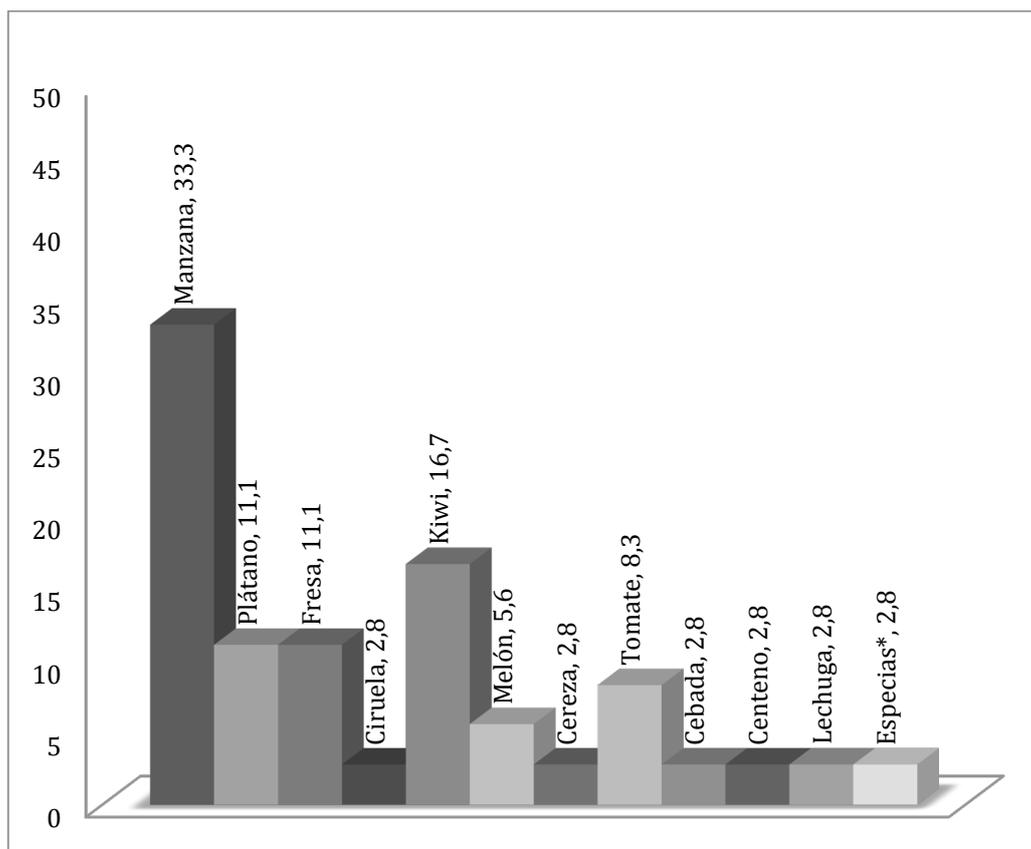


Figura 44. Perfiles de sensibilización (N%) a otros alimentos vegetales en los pacientes del grupo ITSL- Pru p 3.*ajo, pimienta y orégano.

El 100% de los pacientes de este grupo presentaron prueba cutánea intraepidérmica positiva con extracto de LTP, e IgE específica a Pru p 3 por InmunoCap positiva.

Con respecto a la clínica presentada tras la ingesta de melocotón, todos los pacientes seleccionados presentaron reacciones sistémicas. Se hizo prueba de provocación en un total de 27 pacientes (75%), de los cuales 16 (44,4%) presentaron un cuadro de anafilaxia leve durante la PPDCCP, con sólo afectación cutánea, y 11 tuvieron clínica de anafilaxia moderada, que incluyen síntomas de prurito palmo-plantar, ótico, generalizado, erupción eritematosa urticariforme, y/o angioedema, así como afectación cardiovascular, respiratoria como disnea, sibilantes, o tos repetitiva, o gastrointestinal, tales como hinchazón, dolor tipo cólico abdominal, o despeños diarreicos o vómitos. Los 8 pacientes restantes no se sometieron a una PPDCCP debido a que habían sufrido más de una reacción sistémica en los últimos dos años, uno de ellos con clínica de hipotensión grave.

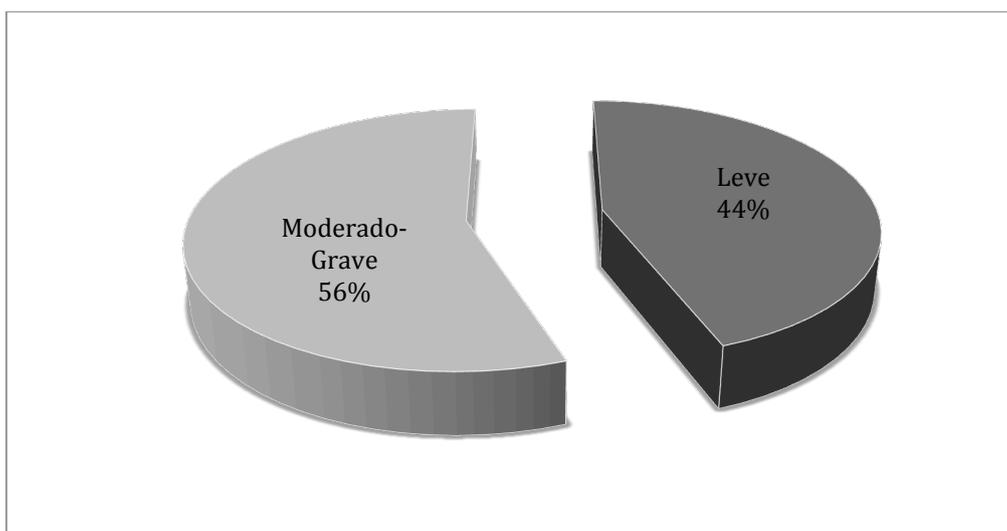


Figura 45. Clasificación de los pacientes grupo ITSL-Pru p 3 en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia T0, según Brown, en %.

En la siguiente tabla (Tabla 7) se describen las características clínicas, el tratamiento recibido, y la cantidad tolerada durante la PPDCCP en los pacientes evaluados a tiempo cero del grupo ITSL-Pru p 3.

Paciente	Cantidad media tolerada (g)	Clínica	Tratamiento
1	60	Eritema generalizada y angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
2	7,5	Eritema generalizado, inyección conjuntival, y dolor abdominal	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
3	100	Disfonía y angioedema de úvula	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina + Adrenalina nebulizada
4	7,5	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y vómitos	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
5	No provocado		
6	15	Prurito orofaríngeo, dolor abdominal, y urticaria facial y en cuello	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
7	30	Urticaria generalizada y inyección conjuntival y náuseas	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
8	15	Eritema facial y en escote, angioedema facial, y leve dolor abdominal	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
9	15	Prurito orofaríngeo, urticaria facial y angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
10	60	Prurito palmo-plantar, eritema facial, en escote y abdominal	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
11	No provocado		
12	30	Prurito palmo-plantar, genital, y urticaria en cuello	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
13	15	Urticaria en tronco y extremidades superiores	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

14	100	Prurito orofaríngeo, urticaria facial, angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
15	100	Urticaria en espalda y prurito generalizado	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
16	30	Angioedema facial y eritema en espalda	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
17	30	Prurito orofaríngeo, urticaria facial, angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
18	15	Urticaria en tronco y extremidades superiores	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
19	60	Eritema generalizada y angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
20	No provocado		
21	7,5	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y tos irritativa.	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina + 2,5 salbutamol y 500 budesonida nebulizada
22	No provocado		
23	100	Angioedema facial y eritema en espalda	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
24	60	Náuseas, prurito palmo-plantar, y eritema en cara	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
25	15	Urticaria en tronco, eritema en cara y cuello, y dolor abdominal	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
26	30	Urticaria generalizada, dolor abdominal, y vómitos	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
27	7,5	Náuseas, prurito palmo-plantar, y eritema en cara	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
28	7,5	Urticaria en tronco, eritema en cara y cuello, y dolor abdominal	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
29	15	Angioedema de úvula, prurito orofaríngeo, y disfonía	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina + 2,5mg Salbutamol, adrenalina, 500mcg budesonida nebulizada
30	15	Urticaria generalizada y dolor abdominal	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
31	60	Angioedema labio inferior, prurito orofaríngeo, y eritema en escote	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
32	100	Urticaria en tronco y prurito generalizado	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
33	No provocado		
34	No provocado		
35	No provocado		
36	No provocado		

Tabla 7. Tabla donde se describe la cantidad de melocotón tolerada tiempo 0, el tipo de reacción presentada y el tratamiento recibido de los pacientes incluidos a recibir ITSL-Pru p 3.

La mediana de cantidad tolerada de melocotón en los pacientes provocados, fue de 41,01 g (15-60). La manifestación clínica más frecuente fue el eritema cutáneo en tórax y escote, presentado en hasta 14 pacientes, seguido de la erupción eritematosa urticariforme (N=12), el angioedema (N=10) de predominio facial y de úvula, y el dolor abdominal (N=9). Durante la PPDCCP se requirió el uso de adrenalina en 12 pacientes, que evolucionaron satisfactoriamente sin requerir tratamiento de soporte ni nueva administración de adrenalina.

1.2. Pacientes no tratados con ITSL-Pru p 3

De los 12 pacientes diagnosticados de alergia a melocotón por sensibilización a LTP que decidieron no comenzar con ITSL-Pru p 3, el 58,3% eran mujeres con una mediana de edad de 29 años (21-38). La última reacción sufrida tras la ingesta de melocotón la habían presentado hace 9 años, siendo la mediana de la edad origen de la primera manifestación, según historia clínica, los 20,5 años (13-28).

Se realizaron en todos los pacientes pruebas cutáneas intraepidérmicas para neumoaérgenos. El 66,7% de estos pacientes presentaban positividad a alguno de los pólenes, siendo el polen del olivo el más prevalente (87,5%), y el menos prevalente el polen del platanero de sombra y ciprés (37,5%) (Figura 46).

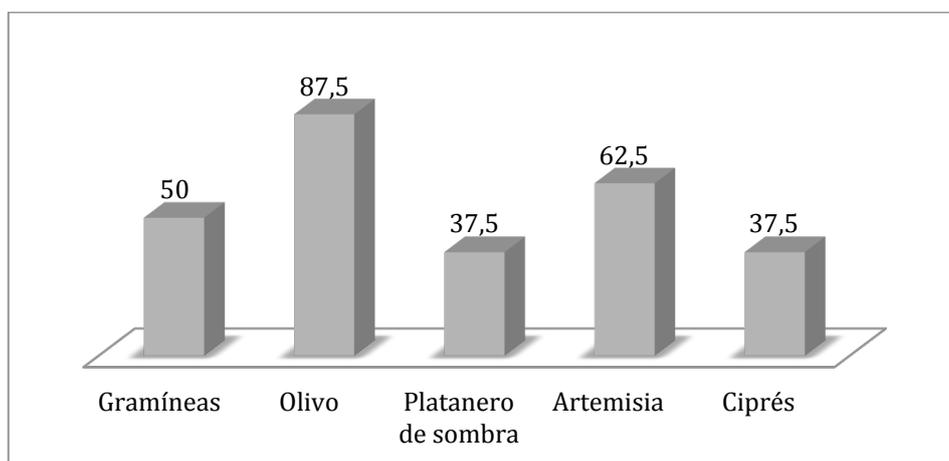


Figura 46. Perfil de sensibilización a pólenes en los pacientes que no van a recibir ITSL-Pru p 3.

De estos pacientes que no comenzaron con ITSL-Pru p 3, el 41,6% presentaban clínica asociada de rinitis o asma por inhalación de polen

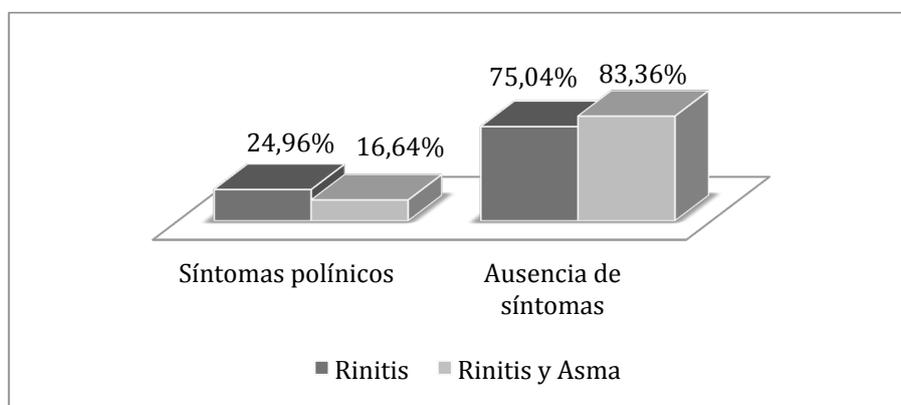


Figura 47. N(%) pacientes sin ITSL-Pru p 3 con síntomas por inhalación de polen.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Respecto a la sensibilización a otros alimentos vegetales en este grupo, se encontró clínica y pruebas cutáneas positivas en el 83,3% de ellos (N=10). Los alimentos más frecuentemente positivos fueron el cacahuete, la nuez, y la manzana con piel (Figura 48 y 49), presentando clínica de alergia más grave tras la ingesta de nueces, manzana y almendras.

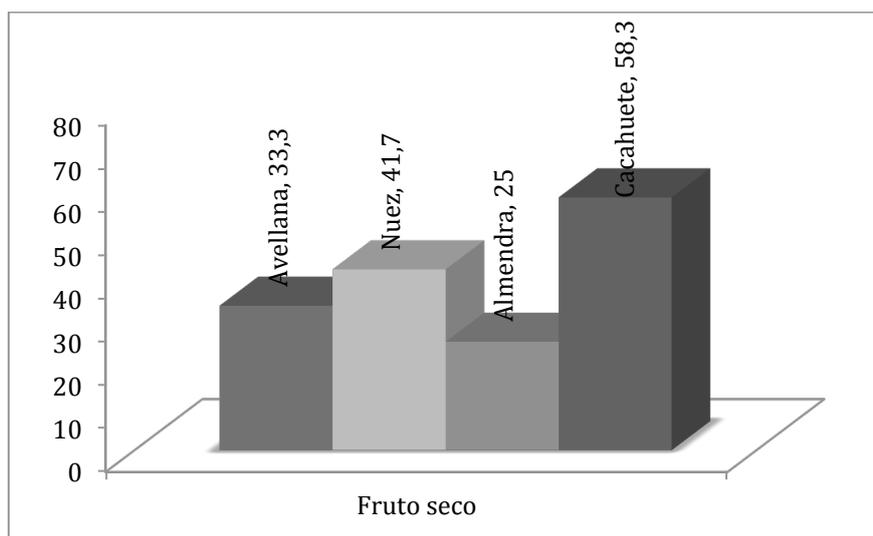


Figura 48. Perfiles de sensibilización (N%) a otros alimentos vegetales (frutos secos) en los pacientes del grupo no ITSL-Pru p 3.

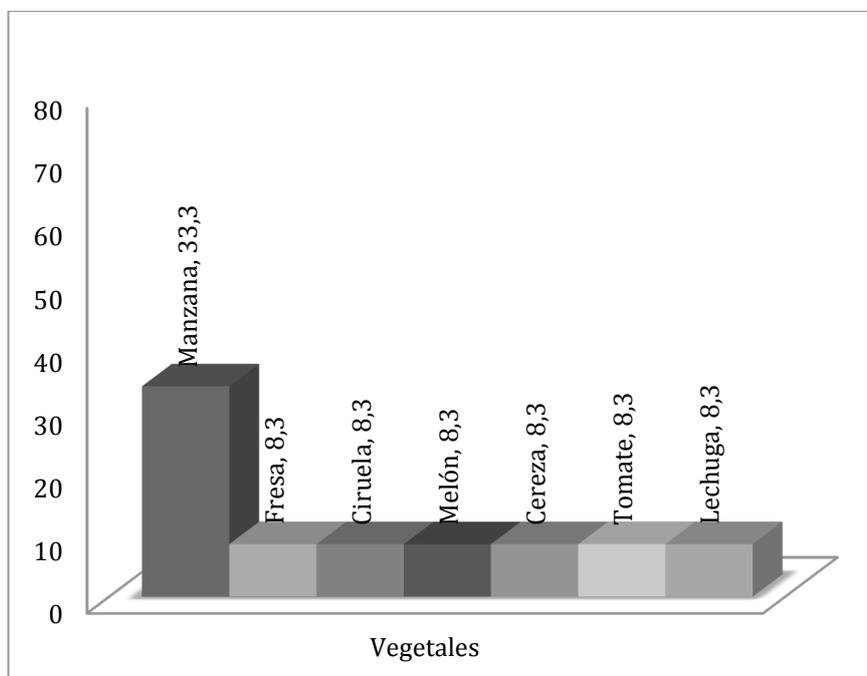


Figura 49. Perfiles de sensibilización a otros alimentos vegetales en los pacientes del grupo no ITSL-Pru p 3.

El 100% de los pacientes de este grupo presentaron también como criterio de inclusión, clínica sistémica tras la ingesta de melocotón, una prueba cutánea intraepidérmica positiva con extracto de LTP, e IgE específica a Pru p 3 por InmunoCAP positiva.

Se realizó PPDCCP en un total de 9 pacientes (75%). La cantidad máxima de melocotón tolerada fue de media 40,27 g. El 58,3% de ellos presentaron cuadros de anafilaxia moderada, siendo la manifestación clínica más frecuente. Ningún paciente presentó anafilaxia grave, y el 41,7% reaccionaron con clínica de anafilaxia leve. El síntoma más frecuentemente presentado en los pacientes durante la PPDCCP fue el eritema y la urticaria (44,4%), seguidos del dolor abdominal y angioedema, que aconteció en 3 pacientes de los 9 provocados. Hubo 3 pacientes no provocados dado que habían presentado en el momento de la inclusión al estudio más de 1 episodio de anafilaxia en los últimos dos años.

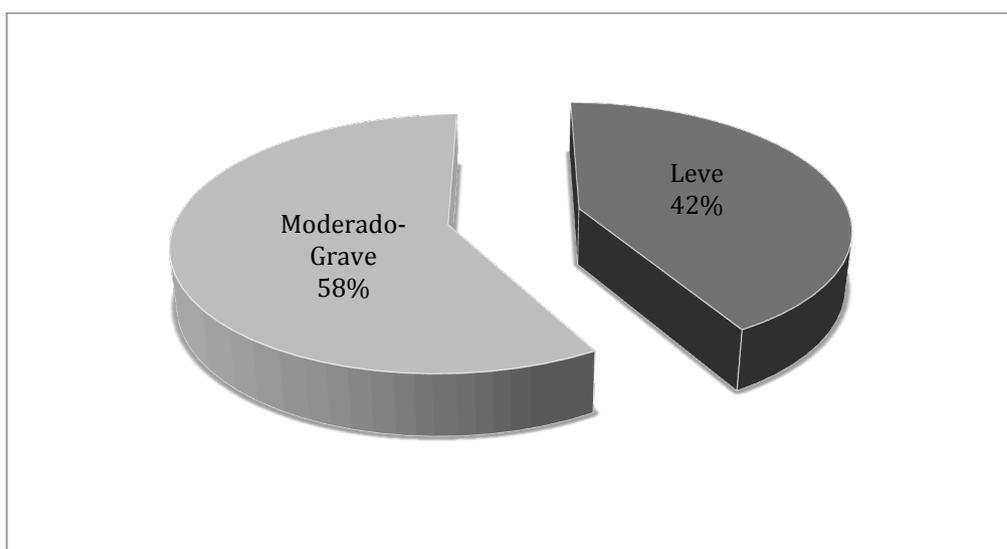


Figura 50. Clasificación de los pacientes grupo no ITSL-Pru p 3, en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia T0, según Brown, en %.

A continuación se describen las características clínicas, el tratamiento recibido, y la cantidad tolerada durante la PPDCCP en los pacientes evaluados a tiempo cero del grupo que no recibe el tratamiento.

Paciente	Cantidad media tolerada (g)	Clinica	Tratamiento
1	15	Eritema pruriginoso generalizado y dolor abdominal	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
2	7,5	Eritema generalizado, inyección conjuntival y angioedema labial	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
3	30	Prurito orofaríngeo, angioedema de úvula, y dolor abdominal	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina + Adrenalina nebulizada
4	15	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y vómitos	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
5	No provocado		
6	60	Disfonía y angioedema de úvula	adrenalina nebulizada + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
7	7,5	Eritema en cuello, urticaria en cara, náuseas e inyección conjuntival	300mcg adrenalina im + 120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
8	100	Urticaria en espalda, eritema facial y náuseas	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
9	60	Prurito oro-faríngeo, eritema en escote y angioedema labial	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
10	No provocado		
11	60	Dolor abdominal, distensión abdominal, urticaria en escote	120 mg 6-metilprednisolona iv + 5 mg Dexclorfeniramina
12	No provocado		

Tabla 8. Se describe la cantidad de melocotón tolerada a tiempo 0, el tipo de reacción presentada y el tratamiento recibido de los pacientes incluidos a no recibir ITSL-Pru p 3.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y no tratado en ninguna de las características clínicas y demográficas analizadas de forma basal.

1.3. Pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, en relación a cacahuete

Del total de los pacientes que deciden comenzar con ITSL-Pru p 3 (N=32), se clasificaron en 3 grupos en relación a su reactividad diferencial con cacahuete.

1.3.1. Grupo A

Se trata de pacientes alérgicos a cacahuete por reacción a su ingesta, así como prueba cutánea intraepidérmica, e IgE específica por InmunoCAP positiva a cacahuete. Lo componen 12 pacientes (37,5%), de los cuales el 58,3% eran mujeres. La mediana de edad presentada al inicio del estudio era de 29,5 años (25,75-33,50), con un inicio de síntomas con cacahuete hace 18,7 años (16,25-21), y de 17,33 años (15,5-21,2) para melocotón.

Sólo el 25% de los pacientes presentaban síntomas respiratorios por inhalación de polen, principalmente rinitis alérgica (66,7%), estando sensibilizados a algún polen de la batería testada en la prueba intraepidérmica el 75%.

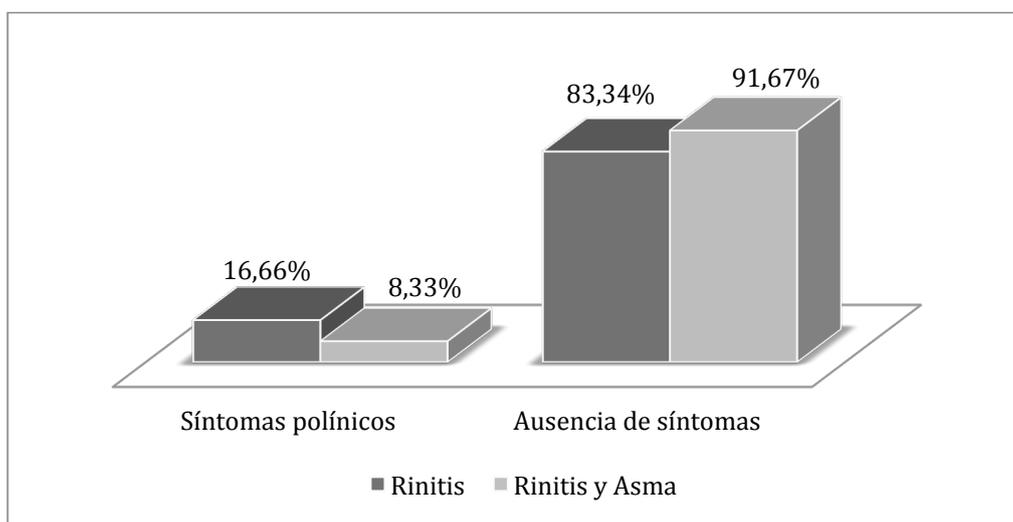


Figura 51. N(%) pacientes grupo A con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

Se analizaron los síntomas presentados durante la PPDCCP en este grupo en relación a cacahuete y a melocotón. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La mayoría presentaron clínica de anafilaxia leve tras cacahuete (58,3%), sin reacciones graves por melocotón.

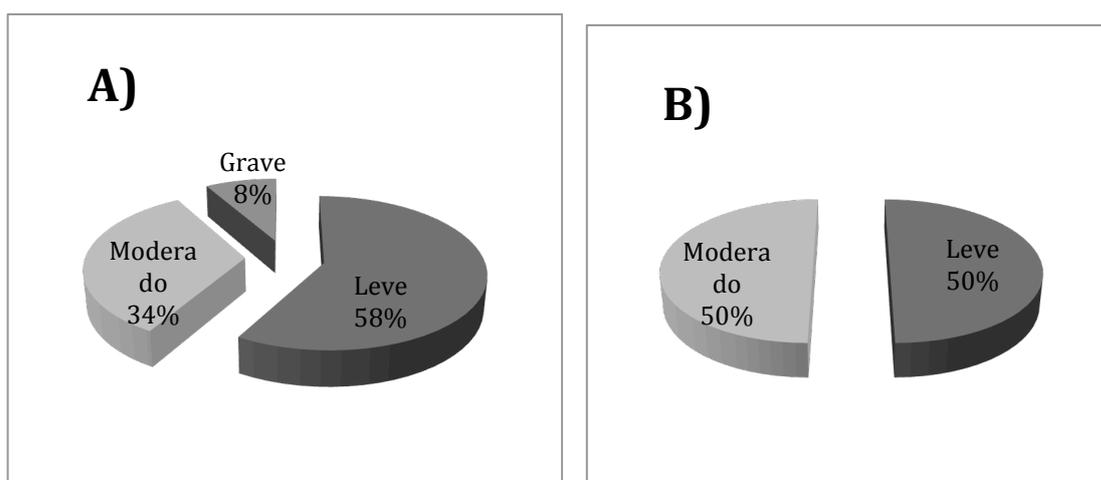


Figura 52. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo A en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0. **A)** Síntomas en relación a la PPDCCP con cacahuete. **B)** Síntomas en relación a la PPDCCP con melocotón.

1.3.2. Grupo B

Lo componen 11 pacientes (34,37%) sensibilizados a cacahuete que toleran su ingesta sin reacción, pero que tuvieron pruebas cutáneas y/o IgE específica a cacahuete positiva. El 90,1% son mujeres con una mediana de edad de 33,3 años (28-39, y que tuvieron el primer episodio de alergia por melocotón a la edad de 18,8 años (12-23).

El 27,3% (N=3) de ellos presentaban síntomas respiratorios por inhalación de polen, todos por rinitis sin asma concomitante, estando en 9 casos sensibilizados a algún polen de los testados (81,8%).

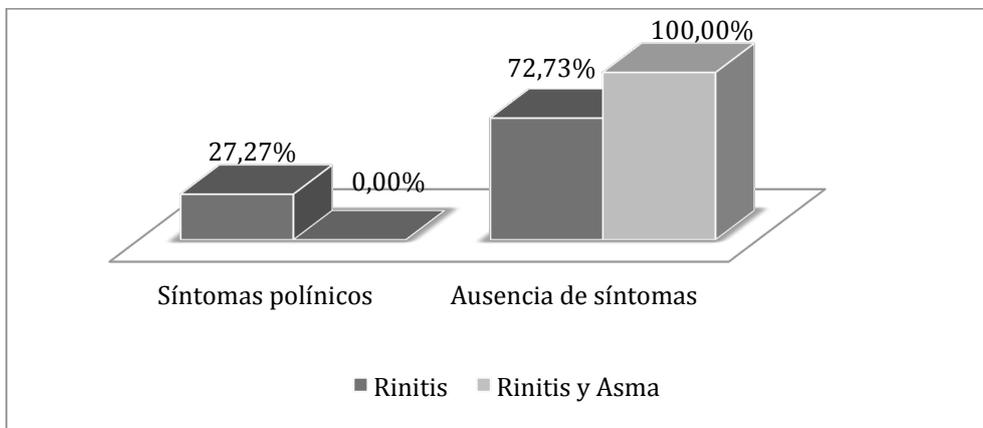


Figura 53. N(%) pacientes grupo B con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

Ninguno de estos pacientes presentó clínica de anafilaxia grave con melocotón durante la PPDCCP.

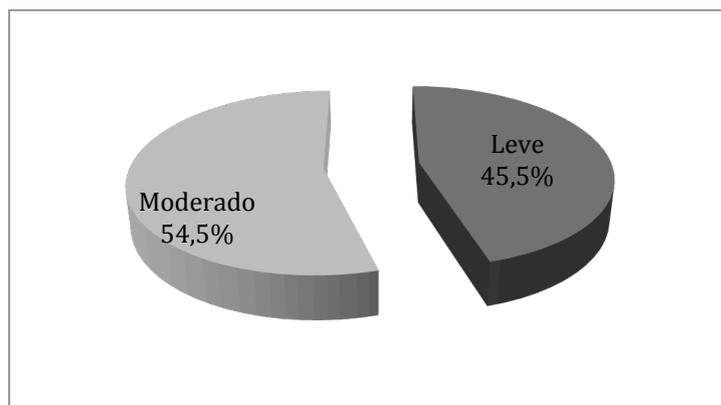


Figura 54. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo B en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0, en relación a la PPDCCP con melocotón.

1.3.3. Grupo C

Grupo de pacientes no alérgicos a cacahuete (toleran su ingesta sin reacción y no están sensibilizados por prueba cutánea ni por IgE específica a cacahuete). Lo componen 9 pacientes del grupo ITSL-Pru p 3 (28,12%). La mayoría eran mujeres (88,9%) con una mediana de edad media de 29 años (21,5-36,5), y mediana de inicio de los síntomas con melocotón a la edad de 14 años (8,5-18,5).

El 66,7% estaban sensibilizados a algún polen por prueba cutánea, presentando clínica respiratoria el 33,3%, principalmente rinitis (66,7%).

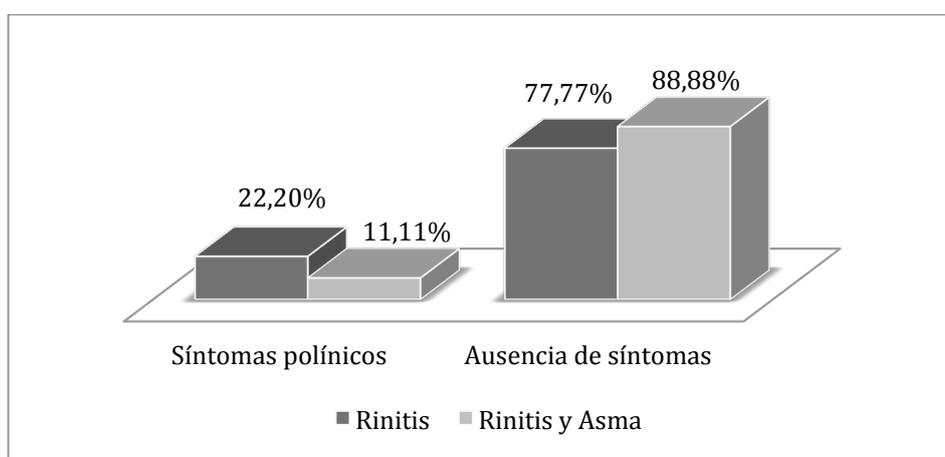


Figura 55. N(%) pacientes grupo C con síntomas por inhalación de polen (Rinitis o Rinitis y Asma).

En este grupo las manifestaciones clínicas fueron moderadas-graves en un 55,6% de los casos. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la gravedad de la clínica presentada por la ingesta de melocotón en la PPDCCP, respecto al grupo A ($p=0,01$) y el grupo B ($p=0,015$).

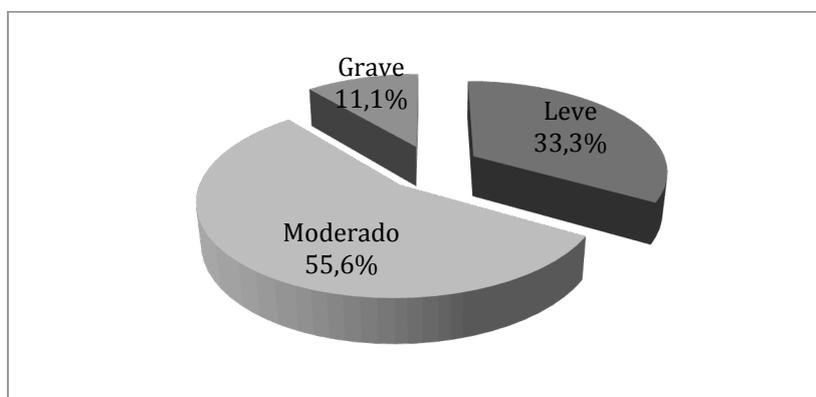


Figura 56. Clasificación (en %) de los pacientes Grupo C en función de la gravedad de los síntomas de anafilaxia presentados T0, en relación a la PPDCCP con melocotón.

2. Respuesta clínica

Se midió la eficacia clínica de la ITSL-Pru p 3 según los cambios clínicos producidos en el tamaño de la pápula por prueba cutánea, y la cantidad de melocotón tolerado tras un año de tratamiento. Se analizó también la eficacia clínica de la ITSL-Pru p 3 en relación a los cambios de reactividad frente al cacahuete. Para ello se midieron la existencia de cambios en el tamaño de pápula por prueba cutánea intraepidérmica para melocotón y cacahuete, así como la cantidad tolerada tras un año de tratamiento de melocotón, y de cacahuete.

Durante el período de estudio se produjeron 5 abandonos durante los 2 primeros meses, sin que dichos abandonos alterasen los datos clínicos ni demográficos globales de cada grupo. De ellos, 2 mujeres por gestación, 2 por motivos laborales, y 1 por motivos desconocidos. Finalmente continuaron hasta el primer año de tratamiento un total de 32 pacientes en el grupo de tratados, y 11 en el grupo no tratado.

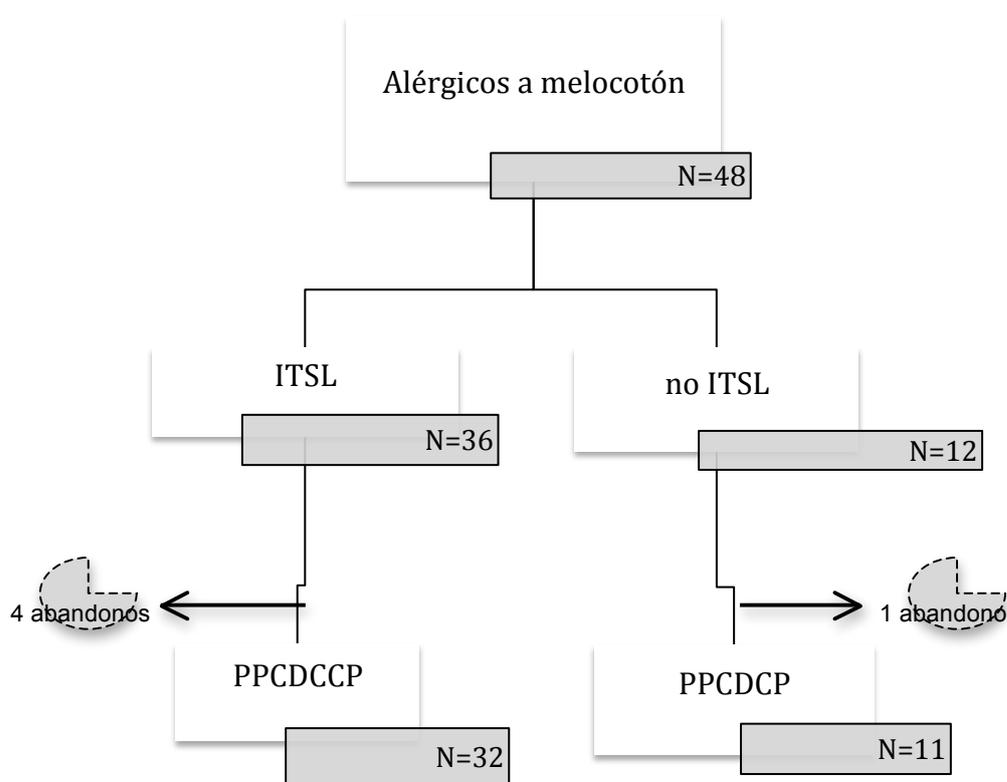


Figura 57. Diagrama de los pacientes seleccionados para el estudio.

2.1. Prueba cutánea intraepidérmica

A todos los pacientes se les realizó pruebas cutáneas intraepidérmicas para Pru p 3 antes de comenzar el tratamiento y tras un año de éste, independientemente del cuadro clínico presentado, midiendo el tamaño del habón por planimetría en su lectura.

2.1.1. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica en melocotón

La mediana del tamaño del habón creado tras la prueba intraepidérmica con la LTP del melocotón al inicio del estudio fue 7,39 mm² (5,4-8,5), sin diferencia significativa respecto al grupo no tratado ($p=0,12$).

Los resultados, tras un año de ITSL-Pru p 3 en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, indicaron una disminución estadísticamente significativa en el tamaño ($p<0,001$), aunque en ningún caso se negativizó (Figura 52).

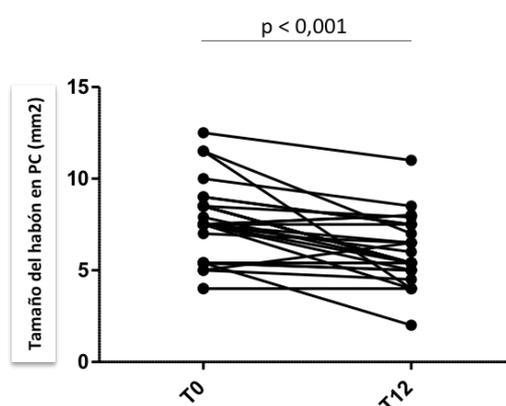


Figura 58. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica medida por planimetría del tamaño del habón al inicio y tras un año de ITSL-Pru p 3.

En los pacientes no tratados con ITSL-Pru p 3 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la pápula tras un año de ITSL-Pru p 3 (Figura 59).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

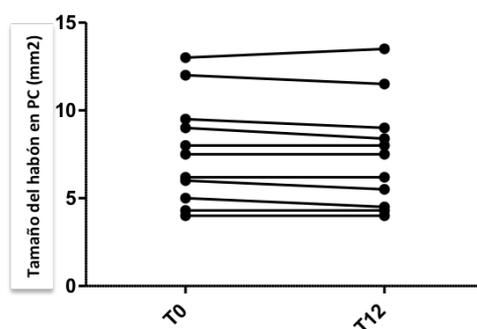


Figura 59. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica medida por planimetría del tamaño del habón al inicio y tras un año de seguimiento en el grupo no ITSL-Pru p 3.

2.1.2. Cambios en prueba cutánea intraepidérmica en relación a cacahuete

A todos los pacientes que decidieron comenzar con ITSL-Pru p 3 se les realizó prueba intraepidérmica a melocotón y cacahuete, y se analizaron los resultados de ambos comparando los cambios presentados al inicio y tras 12 meses de tratamiento en los tres grupos expuestos anteriormente (A, B, y C).

2.1.2.1. Grupo A:

Tras un año de tratamiento, se encontró un descenso estadísticamente significativo en el tamaño de la pápula en este grupo tanto para LTP de melocotón ($p=0,041$), como para cacahuete ($p=0,001$). La mediana del tamaño del habón creado tras la prueba intraepidérmica con Pru p 3 al inicio del estudio en este grupo fue $7,08 \text{ mm}^2$ (5,4-7,8) y de $8,02 \text{ mm}^2$ (5,4-7,8) para extracto de cacahuete completo.

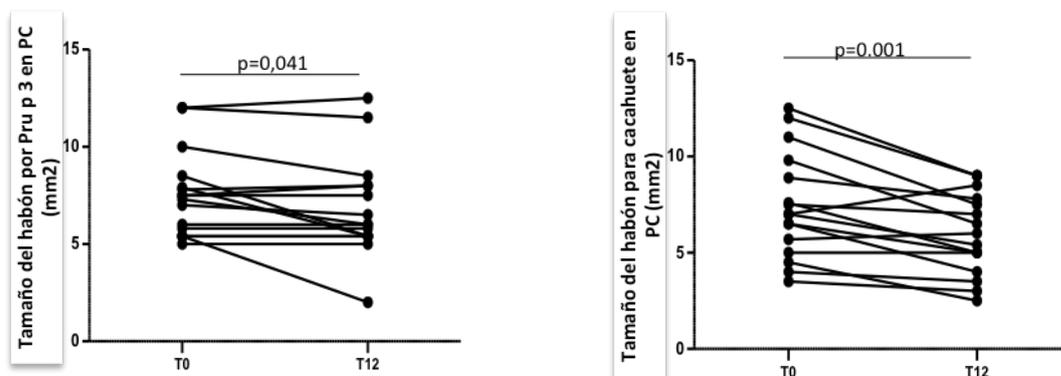


Figura 60. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 y cacahuete en el Grupo A (mm^2).

2.1.2.2. Grupo B:

El tamaño de pápula para Pru p 3 en la prueba cutánea descendió de forma estadísticamente significativa tras un año de ITSL-Pru p 3 ($p=0,035$), con una mediana de tamaño al inicio de $6,94 \text{ mm}^2$ (5-8,5). No se encontraron cambios respecto a la prueba intraepidérmica con cacahuete, con un diámetro inicial de $5,59 \text{ mm}^2$ (4-7).

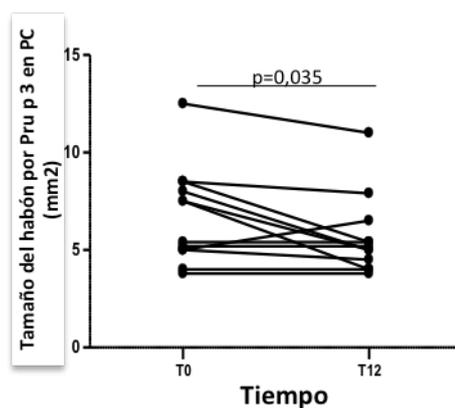


Figura 61. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 en el Grupo B (mm^2).

2.1.2.3. Grupo C:

Tras un año de tratamiento se observó en este grupo un descenso estadísticamente significativo en el tamaño del habón producido por Pru p 3 ($p=0,0085$). El tamaño medio inicial de la pápula fue $8,36 \text{ mm}^2$ (6,4-10,25). Como criterio de inclusión, la prueba cutánea para cacahuete fue negativa en todos los pacientes.

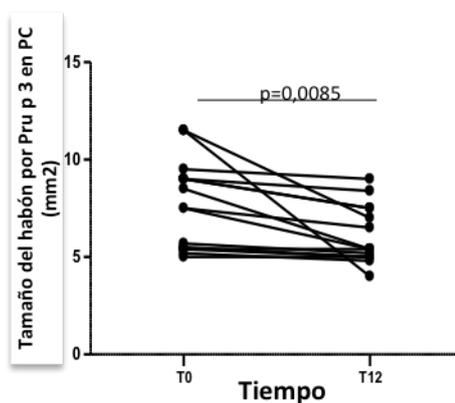


Figura 62. Cambios en el tamaño de habón por prueba intraepidérmica para Pru p 3 en el Grupo C (mm^2).

2.2. PPDCCP

A todos los pacientes, salvo los referidos previamente por haber presentado más de una reacción de anafilaxia tras la ingesta de melocotón en los últimos dos años (N=12), se les realizó una PPDCCP antes de comenzar el tratamiento y tras 12 meses de seguimiento para determinar la eficacia clínica de la ITSL-Pru p 3 según los cambios en la cantidad de melocotón tolerado al año por PPDCCP.

2.2.1. Cambios en tolerancia con melocotón

Del total de los 36 pacientes que finalizaron los 12 meses de seguimiento, 30 toleraron la cantidad completa de melocotón (28 del grupo ITSL-Pru p 3, y 2 del grupo no ITSL-Pru p 3). Al inicio (T0), la mediana de cantidad tolerada fue de 41,01 g (15-60) en el grupo tratado, y de 40,27 g (15-60) en el grupo no tratado, sin diferencias significativas entre ambos ($p=0,42$).

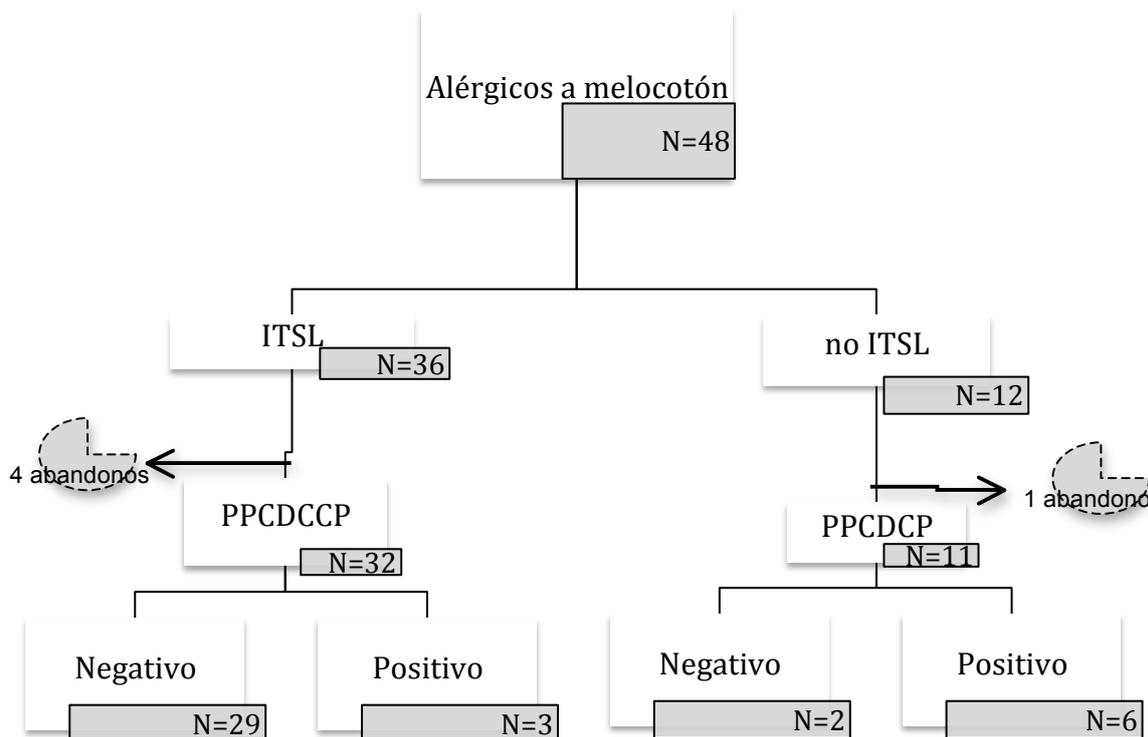


Figura 63. Diagrama de los pacientes seleccionados para el estudio inicial y al año, y resultados tras PPDCCP.

En los pacientes del grupo tratado hubo un aumento estadísticamente significativo de la tolerancia a melocotón tras un año de tratamiento específico ($p < 0,001$). Todos los pacientes, salvo 3 (90,6%) toleraron la pieza completa de melocotón de 150 g. De los 3 pacientes que reaccionaron, en uno de ellos las manifestaciones clínicas aparecieron tras 100 g de fruta, con síntomas de urticaria en cara y espalda, y los otros dos tras la misma dosis a la inicial de 7,5 g, presentando uno de ellos urticaria en cara y angioedema labial, y otro anafilaxia por eritema en cara y escote, dolor abdominal y vómitos, por lo que se trató con adrenalina.

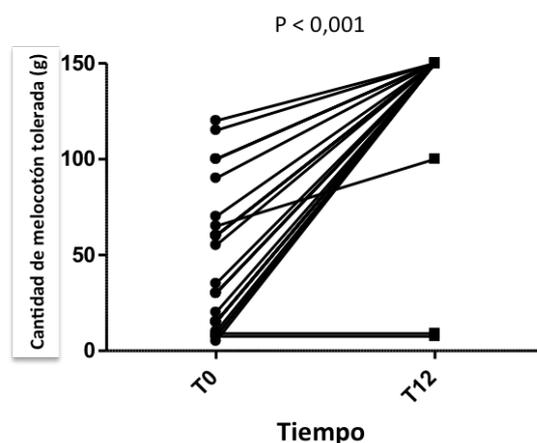


Figura 64. Gráfica con la cantidad de melocotón tolerada a los 12 meses de ITSL-Pru p 3.

En el grupo de pacientes no tratados con ITSL-Pru p 3, ninguno alcanzó la ingesta completa de la pieza de melocotón de 150 g, aunque algunos pacientes aumentaron de forma no estadísticamente significativa la cantidad tolerada.

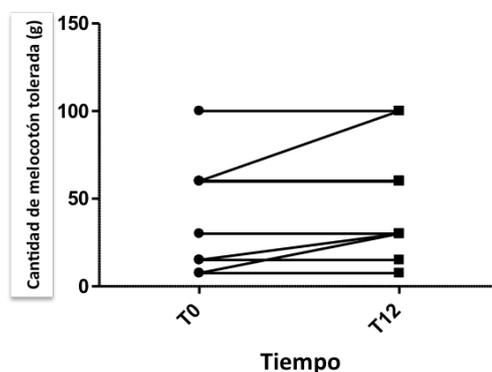


Figura 65. Gráfica con la cantidad de melocotón tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo sin ITSL-Pru p 3.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

En la siguiente tabla (Tabla 9) se describen brevemente las manifestaciones clínicas presentadas a los 12 meses de provocación y la cantidad de melocotón tolerada en cada paciente del grupo ITSL-Pru p 3.

Paciente	Cantidad tolerada (g) al inicio (T0)	Clínica inicial	Cantidad tolerada (g) tras 12 meses (T12) de ITSL	Clínica tras 12 meses (T12) de ITSL
1	60	Eritema generalizado y angioedema labial	150	---
2	7,5	Eritema generalizado, inyección conjuntival, y dolor abdominal	7,5	Eritema en cara y escote, dolor abdominal y vómitos.
3	100	Disfonía y angioedema de úvula	150	---
4	7,5	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y vómitos	7,5	Urticaria facial y angioedema labial.
5	No provocado		150	---
6	15	Prurito orofaríngeo, dolor abdominal, y urticaria facial y en cuello	150	---
7	30	Urticaria generalizada y inyección conjuntival y náuseas	150	---
8	15	Eritema facial y en escote, angioedema facial, y leve dolor abdominal	150	---
9	15	Prurito orofaríngeo, urticaria facial y angioedema labial	150	---
10	60	Prurito palmo-plantar, eritema facial, en escote y abdominal	150	---
11	No provocado		150	---
12	30	Prurito palmo-plantar, genital, y urticaria en cuello	150	---
13	15	Urticaria en tronco y extremidades superiores	150	---
14	100	Prurito orofaríngeo, urticaria facial, angioedema labial	150	---
15	100	Urticaria en espalda y prurito generalizado	150	---
16	30	Angioedema facial y eritema en espalda	150	---
17	30	Prurito orofaríngeo, urticaria facial, angioedema labial	150	---
18	15	Urticaria en tronco y extremidades superiores	150	---
19	60	Eritema generalizada y angioedema labial	100	Urticaria en cara y escote
21	7,5	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y tos irritativa.	150	---
22	No provocado		150	---
23	100	Angioedema facial y eritema en espalda	150	---
24	60	Náuseas, prurito palmo-plantar, y eritema en cara	150	---
25	15	Urticaria en tronco, eritema en cara y cuello, y dolor abdominal	150	---
26	30	Urticaria generalizada, dolor abdominal, y vómitos	150	---
27	7,5	Náuseas, prurito palmo-plantar, y eritema en cara	150	---
28	7,5	Urticaria en tronco, eritema en cara y cuello, y dolor abdominal	150	---

29	15	Angioedema de úvula, prurito orofaríngeo, y disfonía	150	---
30	60	Angioedema labio inferior, prurito orofaríngeo, y eritema en escote	150	---
31	No provocado		150	---
32	No provocado		150	---

Tabla 9. Tabla con la cantidad total tolerada de cada paciente del grupo ITSL-Pru p 3, a los 12 meses de tratamiento, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio y a T12.

Igualmente, se describen las manifestaciones clínicas presentadas tras PPDCCP con melocotón por los pacientes del grupo no tratado a los 12 meses, y la cantidad de fruta con la que reaccionaron.

Paciente	Cantidad tolerada (g) al inicio (T0)	Clínica inicial	Cantidad tolerada (g) tras 12 meses (T12)	Clínica tras 12 meses (T12) sin ITSL
1	15	Eritema pruriginoso generalizado y dolor abdominal	15	Eritema en cara y cuello, angioedema labial
2	7,5	Eritema generalizado, inyección conjuntival y angioedema labial	7,5	Urticaria en tronco, dolor abdominal y vómitos.
3	30	Prurito oro-faríngeo, angioedema de úvula, y dolor abdominal	30	Prurito oral, presión faríngea, urticaria en extremidades
4	15	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y vómitos	30	Urticaria facial y en escote y angioedema labial.
5	No provocado		15	Presión faríngea, dolor abdominal, eritema en cara, y prurito genital
6	60	Disfonía y angioedema de úvula	60	Angioedema palpebral unilateral, urticaria en cuello, tos repetitiva
7	7,5	Eritema en cuello, urticaria en cara, náuseas e inyección conjuntival	30	Eritema generalizado y dolor abdominal
8	100	Urticaria en espalda, eritema facial y náuseas	100	Urticaria en cara y cuello y dolor abdominal
9	60	Prurito orofaríngeo, eritema en escote y angioedema labial	100	Presión faríngea, angioedema de úvula y angioedema malar
10	No provocado		30	Prurito palmo-plantar, genital y urticaria en cuello
11	60	Dolor abdominal, distensión abdominal, urticaria en escote	60	Eritema en cara y cuello, y dolor abdominal
12	No provocado		60	Eritema generalizado y tos repetitiva

Tabla 10. Tabla con la cantidad total tolerada de cada paciente del grupo no ITSL-Pru p 3, a los 12 meses de tratamiento, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio y a T(12).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

2.2.2. Cambios en tolerancia en relación a cacahuete

Se realizó una PPDCCP al inicio y tras 12 meses de ITSL-Pru p 3, en los pacientes seleccionados del grupo A (N=12). La eficacia clínica del tratamiento se midió por los cambios presentados en estos pacientes en relación a la cantidad de cacahuete tolerada, así como en los subgrupos sensibilizados (B), y no alérgicos ni sensibilizados (C) además de los cambios de tolerancia en la ingesta de melocotón.

2.2.2.1. Grupo A:

En este grupo se detectó un aumento de la cantidad de melocotón tolerada de forma estadísticamente significativa tras un año de ITSL-Pru p 3 ($p < 0,001$). Todos los pacientes de este grupo toleraron la pieza completa de melocotón de 150 g. La mediana de cantidad máxima de fruta ingerida sin reacción antes de comenzar con el tratamiento fue de 50,2 g (15-100), con una diferencia significativa al comparar con el grupo C ($p = 0,01$).

Respecto a cacahuete, la mediana de la cantidad máxima acumulada que fue tolerada en este grupo al inicio fue de 3,4 g (0,9-5,6). Tras el año de tratamiento, se encontró un aumento estadísticamente significativo de la cantidad tolerada ($p = 0,0003$), con una mediana de hasta 9,8 g. Resulta interesante destacar que hasta el 58,3% de los sujetos ingirieron sin reacción durante la PPDCCP los 14 g totales sin reacción, y que hasta un 8,3% de los pacientes toleraron hasta 3 veces por encima de la cantidad basal, sin precisar de tratamiento con adrenalina en ninguno de ellos.

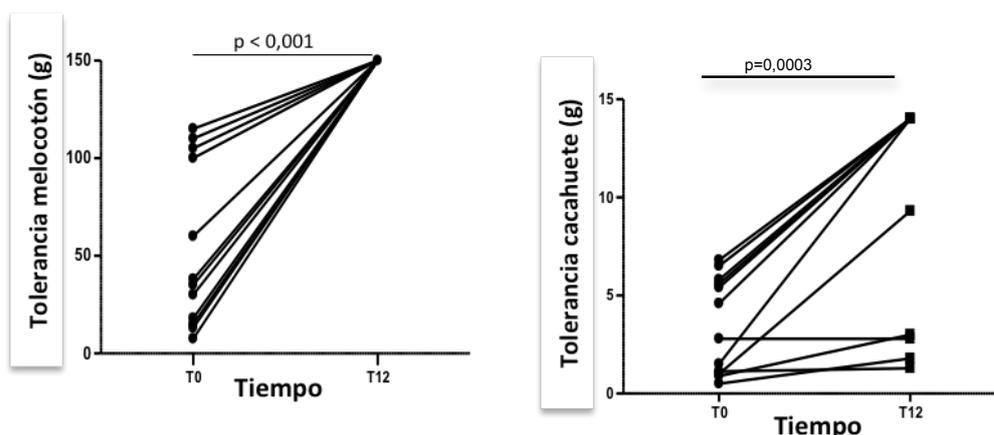


Figura 66. Cambios en la cantidad de melocotón y cacahuete tolerada tras PPDCCP a los 12 meses en el grupo A.

A continuación se describen las manifestaciones clínicas presentadas en este grupo de pacientes durante la provocación con cacahuete al inicio y tras 12 meses de recibir ITSL-Pru p 3. La manifestación clínica más frecuentemente presentada en la provocación antes de comenzar con el tratamiento, fue la aparición de eritema (72,72%), seguida del dolor abdominal (45,45%).

Paciente-Grupo A	Cantidad tolerada de cacahuete (g) (T0)	Clínica inicial	Cantidad tolerada de cacahuete (g) (T12)	Clínica tras 12 meses (T12) sin ITSL
1	1,5	Eritema generalizado, inyección conjuntival y angioedema labial	14	---
2	0,5	Disfonía, eritema en cara y angioedema de úvula	7,5	Tos repetitiva, angioedema labial y eritema en cuello
3	7,5	Prurito orofaríngeo, angioedema de úvula, y dolor abdominal	14	---
4	0,5	Prurito generalizado, eritema en escote y facial, presión orofaríngea, dolor abdominal, náuseas, y vómitos	14	---
5	7,5	Prurito orofaríngeo, eritema en cara y escote y angioedema labial	14	---
6	7,5	Urticaria en espalda, eritema en tronco y náuseas	14	---
7	7,5	Eritema en cuello, urticaria en cara, náuseas e inyección conjuntival	14	---
8	No provocado		14	---
9	0,5	Eritema pruriginoso generalizado y dolor abdominal	3,5	Eritema en cara y cuello, angioedema labial
10	3,5	Prurito palmo-plantar, urticaria en cara y presión faríngea	3,5	Eritema generalizado y tos repetitiva
11	0,5	Dolor abdominal, distensión abdominal, urticaria en escote	1,5	Eritema generalizado y dolor abdominal
12	0,5	Eritema en tronco y cara y dolor abdominal	3,5	Eritema en cara y cuello, y dolor abdominal

Tabla 11. Cantidad total acumulada de cacahuete tolerada en cada paciente del grupo A, y las manifestaciones clínicas presentadas al inicio (T(0) y a T(12).

3. Evaluación de la seguridad

De entre los pacientes que recibieron ITSL-Pru p 3, se evaluó la seguridad del tratamiento por medio del análisis de acontecimientos adversos.

El 53% de los pacientes presentaron reacciones adversas, todas clasificadas como leve-moderadas y controladas con antihistamínicos sin necesidad de uso de corticoides ni adrenalina. El 80% de las manifestaciones se localizaron en la región oro-faríngea, zona de administración del tratamiento, 16% en forma de urticaria peribucal y angioedema de labio. La mayoría de las reacciones aparecen durante la fase de inicio, de ascenso en la dosis de ITSL-Pru p 3, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) respecto a la fase de mantenimiento.

Reacciones adversas	Inicio	Mantenimiento	p
N, %	21 (84)	4 (16)	0.000
Síntomas (N,%)			
• SAO	17 (81)	3 (75)	0.99
• Sistémicos	4 (19)	0 (0)	0.63
• Inespecíficos	0 (0)	1 (25)	0.09
Tratamiento (N;%)			
• Sí	6 (28.6)	1 (25%)	0.88
• No	15 (71.4)	3 (75%)	0.91

Tabla 12. Muestra el número (N) y porcentaje (%) de reacciones adversas durante el año de tratamiento con ITSL-Pru p 3. Se recoge la necesidad de tratamiento y la clasificación de los síntomas presentados.

Hubo dos pacientes que presentaron eventos adversos no relacionados con el tratamiento. Uno de ellos tras la ingesta de fresas en domicilio, desarrolló un episodio de urticaria aguda pruriginosa en tronco y extremidades superiores que precisó de tratamiento con antihistamínicos y corticoterapia intravenosa en área de Urgencias con. El otro paciente presentó un episodio de urticaria aguda en extremidades y abdomen sin causa conocida que fue autolimitada con antihistamínicos vía oral en domicilio.

4. Respuesta humoral

Se midieron los cambios a nivel humoral producidos durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 a tiempo inicial (T(0)), 1 mes (T(1)), 6 meses (T(6)) y al año (T(12)), para la LTP del melocotón (Pru p 3) y del cacahuete (Ara h 9) a través de la determinación de IgE e IgG4 específica a dichos alérgenos, y su proporción (IgG4e/IgEe). Se analizaron los datos obtenidos en relación a los pacientes tratados y los subgrupos para cacahuete, así como en los no tratados con ITSL-Pru p 3, sin encontrar diferencias a nivel basal entre los grupos analizados.

4.1. ImmunoCAP para IgE, IgG4.

Se analizaron los valores a nivel basal entre el grupo de pacientes tratado con ITSL-Pru p 3, y no tratado. La mediana del valor basal de IgE para extracto de melocotón fue de 16,9 kUA/L (3,3-20,3) (N=32), sin diferencia significativa respecto al grupo no tratado ($p=0,42$) en el que el valor al inicio del estudio fue de 7,79 kUA/L (1,5-14) (N=11).

4.1.1. Cambios en las características IgE secuenciales.

Cuando se compararon los niveles de IgEe basales en el grupo de pacientes tratados, se encontró un ligero aumento en el primer mes de ITSL-Pru p 3 no significativo, continuado de un descenso progresivo hasta el final del seguimiento para la IgE a Pru p 3, y a Ara h 9, de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, en el grupo no tratado, no se encontraron modificaciones en ninguno de los tiempos (Figura 69).

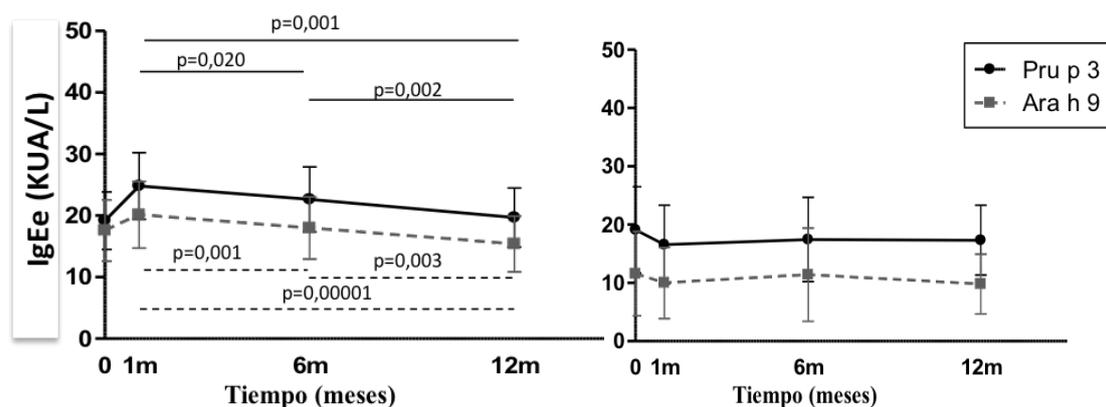


Figura 69. Comparación de los cambios en IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL- Pru p 3 (izquierda) y en el grupo No tratado (derecha).

4.1.2. Cambios en las características IgG4 secuenciales.

De forma paralela e inversa se produjo un incremento de los niveles de IgG4e, sólo observado en el grupo de pacientes que recibió ITSL-Pru p 3, siendo las diferencias significativas sólo para Pru p 3 y a T12 (Figura 70).

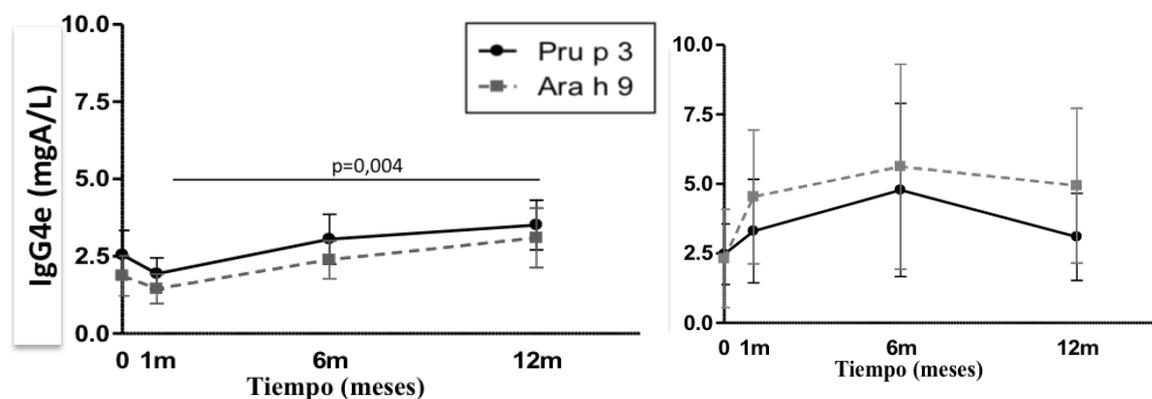


Figura 70. Comparación de los cambios de IgG4e para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL- Pru p 3 (izquierda) y en el grupo no tratado (derecha).

4.1.3. Cambios en las características IgG4/IgE secuenciales.

Considerando el cociente IgG4e/IgEe, se detectó un aumento significativo a los 12 meses para Pru p 3 y Ara h 9 en el grupo ITSL-Pru p 3, sin encontrarse modificaciones en el grupo sin el tratamiento (Figura 71).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

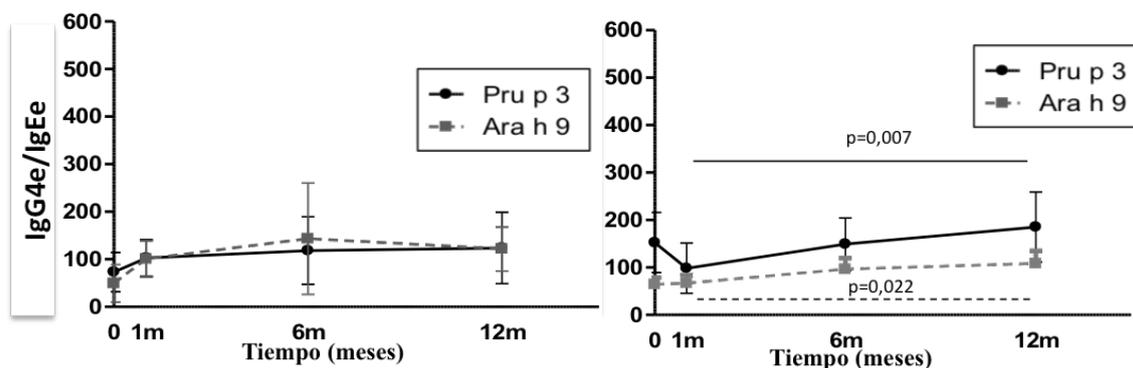


Figura 71. Comparación de los cambios en la proporción IgG4/IgE para Pru p 3 y Ara h 9 durante los 12 meses de seguimiento en el grupo ITSL-Prup 3 (izquierda) y no ITSL-Prup 3 (derecha).

4.2. ImmunoCAP para IgE, IgG4, en relación a la reactividad a cacahuete.

El mismo análisis se realizó comparando los cambios en las inmunoglobulinas para Pru p 3 y Ara h 9 en relación a los pacientes tratados y alérgicos a cacahuete.

La mediana del valor de IgE para extracto de melocotón antes de comenzar el tratamiento fue de 17,9 KUA/L (5,3-20,3), y de 12,36 kUA/L (4,8-26,25) para cacahuete, sin diferencias significativas.

En el grupo B la cifra basal para extracto completo de melocotón tuvo una mediana de 13,8 KUA/L (2,5-13) y de 6,43 kUA/L (0,85-7,9) para cacahuete completo.

En el grupo C, la mediana del valor antes de comenzar con la ITSL-Prup 3 para extracto de melocotón fue de 17,9 kUA/L (2,8-30,2), y negativo como criterio de inclusión para cacahuete.

Sin encontrar diferencias significativas en el valor de IgE a nivel basal entre los tres grupos.

4.2.1. Cambios en las características de IgE secuenciales en grupos A, B, y C:

Se encontraron diferencias significativas en los cambios de IgEe para ambas LTPs sólo en el grupo A y B.

En el grupo A de pacientes, al inicio de la con ITSL-Pru p 3 se observó un aumento, que a partir del primer mes continuó con un descenso hasta el T12. Este descenso en el valor de IgEe se observó desde el inicio del tratamiento haciéndose más marcado desde el sexto mes en el grupo B de pacientes.

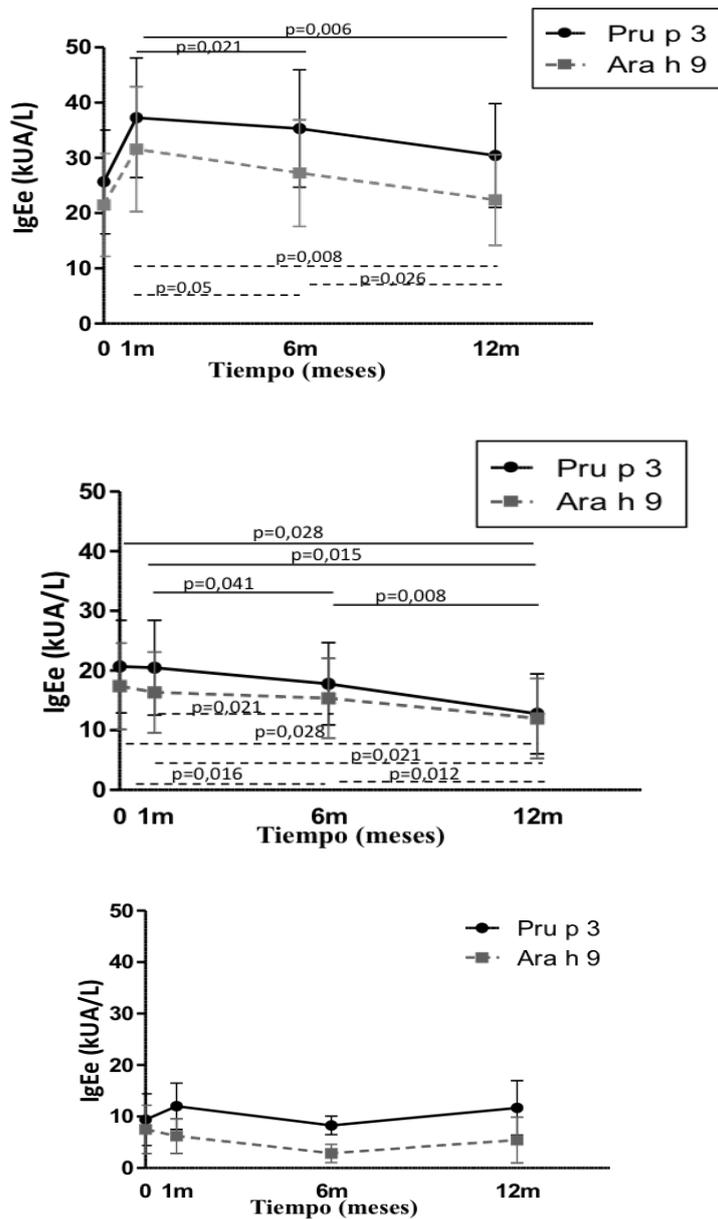


Figura 72. Comparación de los cambios de IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL- Pru p 3 en el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

4.2.2. Cambios en las características de IgG4e secuenciales en grupos A, B, y C:

No hubo cambios en el valor de IgG4e para Pru p 3 ni Ara h 9 a ninguno de los tiempos analizados en el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete. Sin embargo sí se encontró un aumento, significativo en el grupo C tras 12 meses de ITSL-Pru p 3, y no significativo en el grupo B, para ambas LTP.

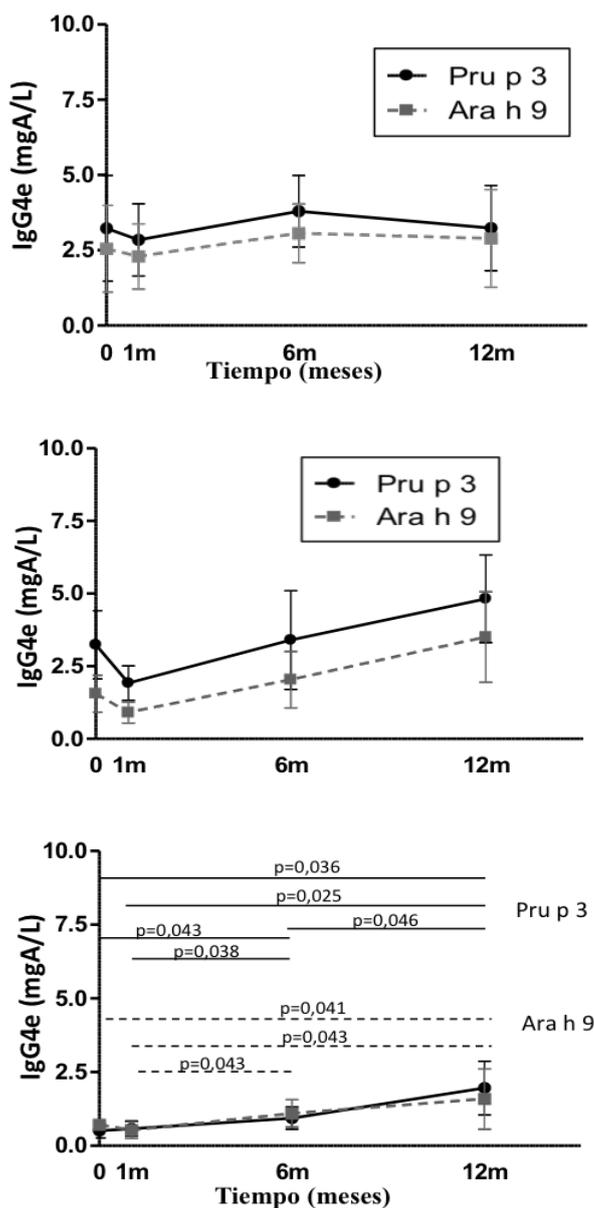


Figura 73. Comparación de los cambios en IgG4e para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 para el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

4.2.3. Cambios en las características IgG4/IgE secuenciales en grupos A, B, y C:

En el grupo A de pacientes no se observaron cambios en el valor de la proporción IgG4e/IgEe para Pru p 3 ni Ara h 9 a ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo sí se encontró un aumento no significativo a partir del primer mes de ITSL-Pru p 3 en el grupo de pacientes sensibilizados y tolerantes (B), y no sensibilizados (C).

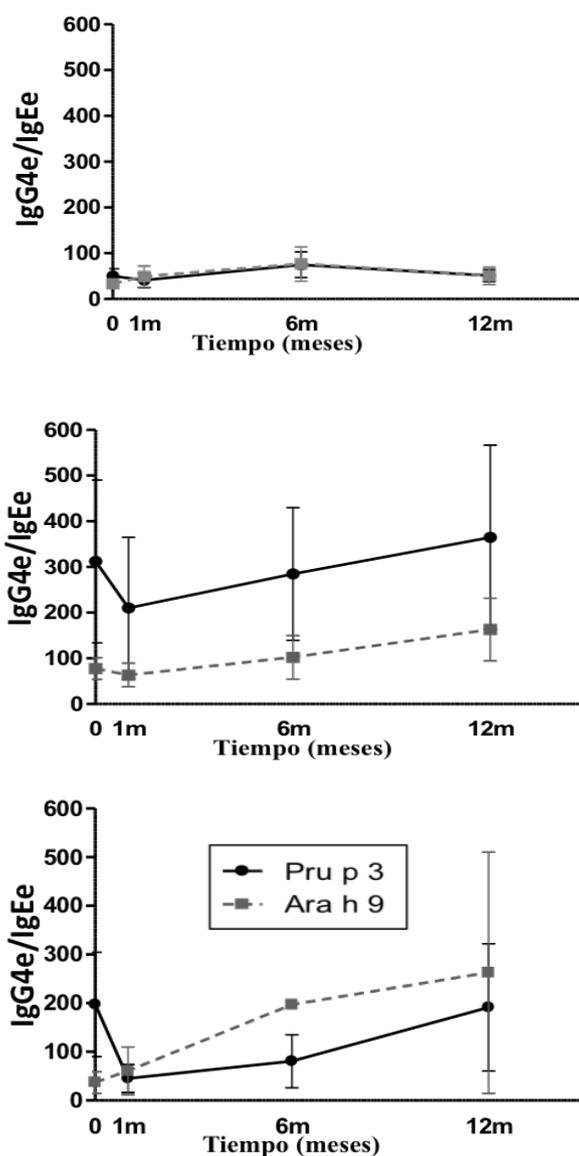


Figura 74. Comparación de los cambios en IgG4e/IgEe para Pru p 3 y Ara h 9 durante el tratamiento con ITSL-Pru p 3 para el grupo de pacientes alérgicos a cacahuete (A) (primero), sensibilizados tolerantes (B) (segundo), y no sensibilizados (C) (tercero).

5. Respuesta celular

Se estudiaron los cambios en la activación del basófilo frente a Pru p 3 y Ara h 9 en todos los pacientes tratados y no tratados, así como los cambios en las características fenotípicas de las células dendríticas (CD), en las distintas subpoblaciones de linfocitos (Th1, Th2, Treg, Th9, Células B, y Células NK), y un análisis de la proliferación específica de dichas células ante Pru p 3, en pacientes que reciben o no ITSL-Pru p 3.

5.1. Test de activación de basófilos (BAT)

5.1.1. Análisis de la concentración óptima mediante curvas dosis-respuesta:

La concentración para cada alérgeno (Pru p 3 y Ara h 9) fue elegida por curvas de dosis-respuesta en 5 pacientes alérgicos a melocotón y en 5 no sensibilizados y tolerantes a melocotón (Figura 75 y 76). Se realizó el BAT para las diferentes concentraciones de cada alérgeno (0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10) en los 10 sujetos.

Los sujetos que mostraron resultados negativos cuando se les añadieron los controles positivos (anti-IgE o fMLP) fueron considerados no respondedores. También fueron descartados aquellos resultados que mostraron un porcentaje de activación basal mayor al 10%.

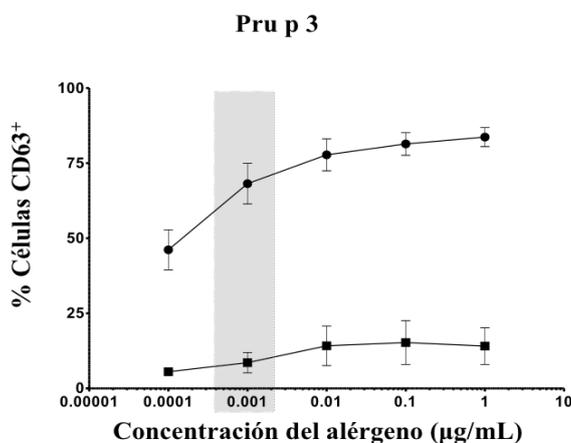


Figura 75. Curva dosis-respuesta con concentraciones seriadas de (µg/mL) de Pru p 3 en pacientes alérgicos a melocotón (N=5) y no sensibilizados-controles (N=5), para el test de activación de basófilos.

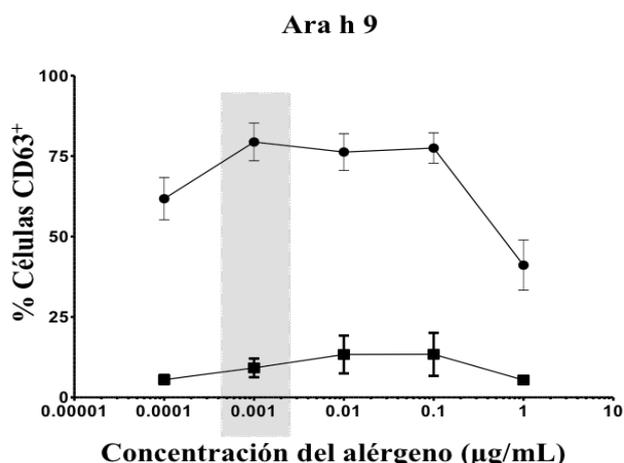


Figura 76. Curva dosis-respuesta con concentraciones seriadas de (µg/mL) de Ara h 9 en pacientes alérgicos a melocotón (N=5) y no sensibilizados-controles (N=5), para el test de activación de basófilos.

Finalmente, la concentración que mostró la mejor y mayor diferencia para discriminar entre pacientes y controles la reactividad específica del basófilo, fue de 0,001 µg/mL. Y fue con la que se realizaron los análisis posteriores del BAT en el grupo tratado y no tratado al inicio, al mes, 6 meses, y 12 meses.

5.1.2. Análisis de lo cambios de la reactividad del basófilo:

La comparación de la activación del basófilo tras un año de tratamiento con ITSL-Pru p 3 frente a Ara h 9 y Pru p 3, mostró un aumento significativo sólo en el grupo de pacientes tratados (N=32).

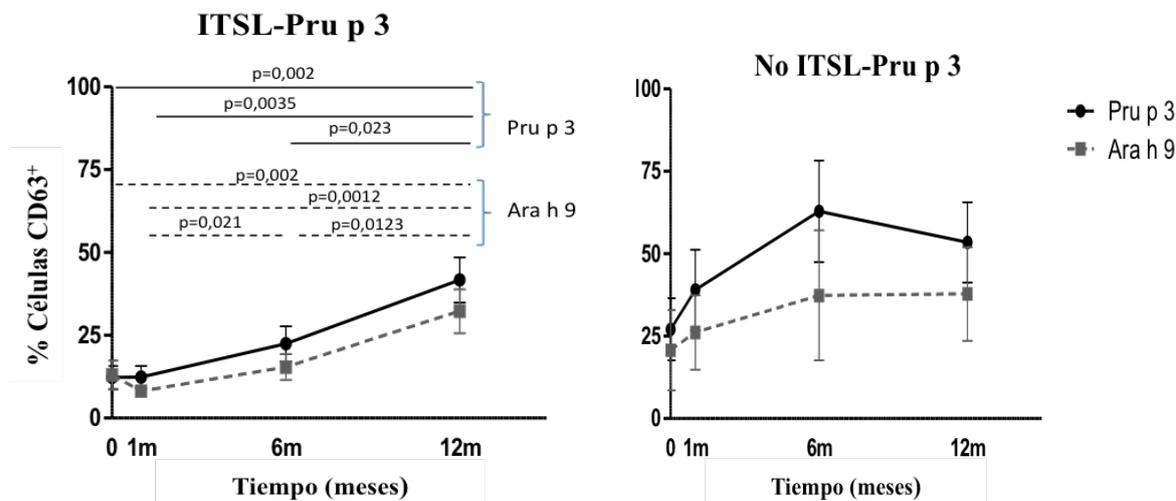


Figura 77. Cambios en BAT en grupo tratados y no tratados durante 1 año para Pru p 3 y Ara h 9.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Analizando los cambios producidos en relación al cacahuete, según los grupos realizados (A=alérgicos (N=12); B=sensibilizados (N=11); C=tolerantes (N=9)), se observó un aumento de reactividad del basófilo en el grupo A y B, con resultados significativos para ambas LTPs exclusivamente en el grupo A.

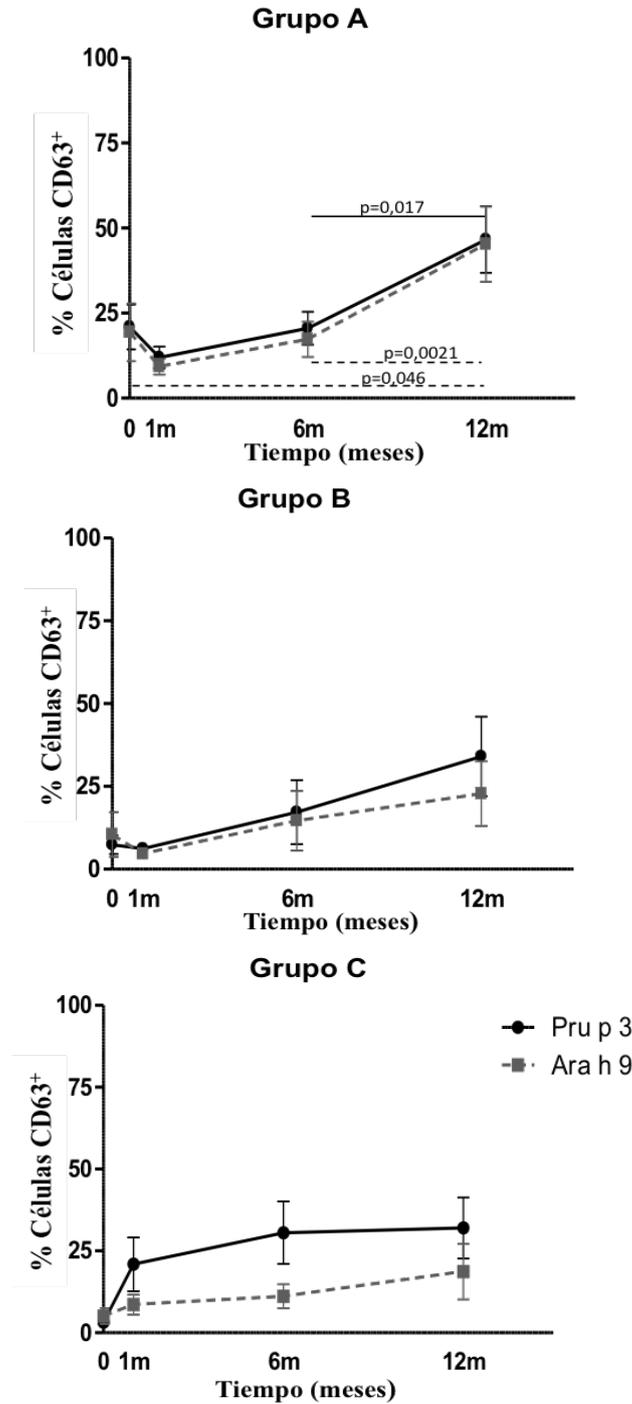


Figura 78. Cambios en BAT en grupos A-C tratados con ITSL-Pru p 3 durante 1 año, para Pru p 3 y Ara h 9, según % células CD63⁺.

5.2. Cambios en las características fenotípicas

El análisis de las características fenotípicas se realizó a través de citometría del flujo, mediante el empleo de Ac monoclonales específicos para marcadores de la superficie celular de CD, y de las distintas subpoblaciones de linfocitos seleccionadas (Th1/Th2/Th9/Treg/NK/B), estudiando su expresión en presencia de Pru p 3.

5.2.1. Células dendríticas

El análisis de las características fenotípicas de las CD se realizó con los marcadores de la superficie celular (CD40, CCR7, CD80, CD86 y CD83).

El estudio se realizó analizando las muestras obtenidas de forma seriada: basal, previo al comienzo de la ITSL-Pru p 3, al mes, a los 6 meses y a los 12 meses de tratamiento. Las muestras de los grupos controles fueron obtenidas de forma paralela al grupo de estudio.

5.2.1.1. Características fenotípicas a nivel basal:

Los resultados indicaron que a nivel basal no existían diferencias en la expresión de los diferentes marcadores de maduración (CD80 y CD86), ni de activación (CD83, CD40 y CCR7) de las CD entre los grupos de pacientes alérgicos tratados con ITSL-Pru p 3 y los no tratados. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes alérgicos, tanto tratados como no tratados, con los controles tolerantes a melocotón, para los diferentes marcadores. Como se observó en la figura 85, cuando se comparan los estados basales de los tres grupos de muestra para los diferentes marcadores, se encontraron diferencias significativas para el CD80 ($p=0.0017$; $p=0.0008$), CD86 ($p=0.0036$; $p=0.0016$), CCR7 ($p=0.0047$; $p=0.0001$), CD40 ($p=0.0001$; $p=0.0330$) y CD83 ($p=0.0004$; $p=0.0034$), todos ellos cuando se compararon el grupo de pacientes con y sin ITSL-Pru p 3, con respecto al grupo de pacientes tolerantes.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

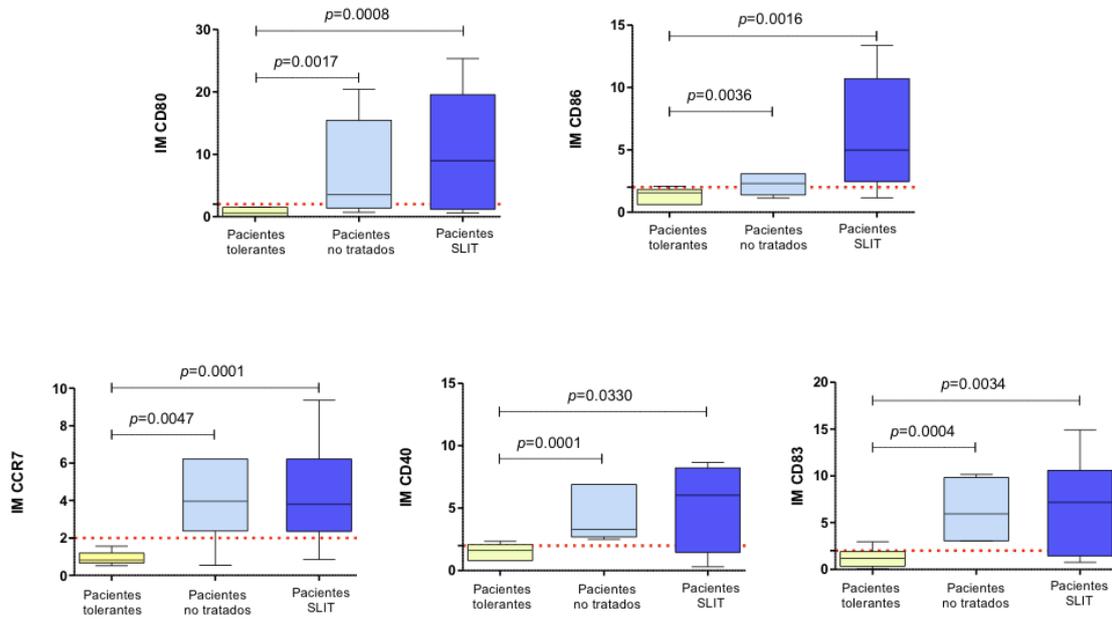


Figura 79. Resultados de maduración CD a nivel basal en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CD80, CD86, CCR7, CD40, y CD83.

5.2.1.2. Cambios en la maduración de las CD durante 1 año de ITSL-Pru p 3:

Una vez demostrado que los pacientes incluidos en los dos grupos tratados y no tratados no mostraban diferencias a nivel basal, se realizó el análisis del efecto de la IT en los cambios de expresión de estos marcadores en las muestras secuenciales. Los datos obtenidos indican que en el grupo de pacientes alérgicos tratados con ITSL-Pru p 3, se produce una reducción significativa de todos los marcadores de maduración de las CD. Esta disminución se hizo significativa a partir de los 6 meses ($p=0.0137$) para el marcador de maduración CD80, y de forma más temprana, a partir del 1er mes, para el marcador CD86 ($p=0.001$), manteniéndose en ambos casos esta disminución al año de tratamiento ($p=0.0029$; $p=0.0015$, respectivamente).

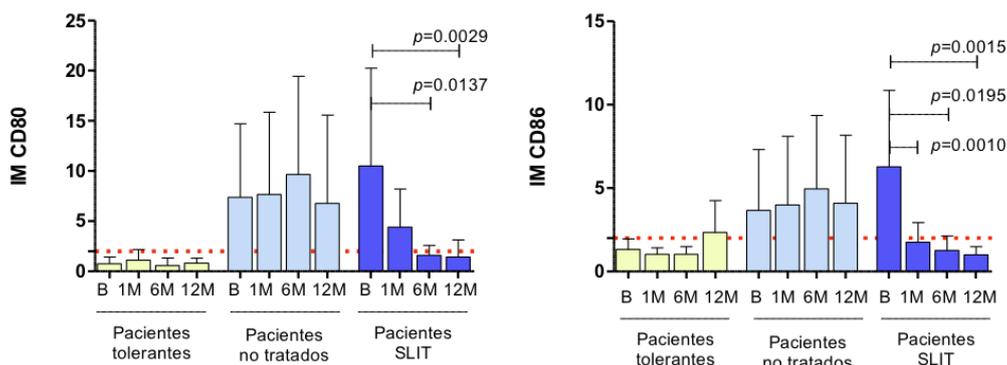


Figura 80. Resultados de maduración CD a distintos tiempos (basal, 1mes, 6 meses, y 12 meses) en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CD80 y CD86.

El análisis para los marcadores CCR7, CD40 y CD83 indicó la existencia de una disminución de la media del IA para todos ellos durante la IT, siendo en todos los casos esta disminución significativa desde el primer mes de tratamiento, y manteniéndose durante el año de ITSL-Pru p 3. Cuando se compararon los estados basales con los diferentes tiempo de estudio, se obtuvo que para el CCR7 hubo significancia al primer mes ($p=0.005$) a los 6 meses ($p=0.0039$) y a los 12 meses ($p=0.0005$). Para el CD40, la diferencia fue al mes ($p=0.0104$) a los 6 meses ($p=0.0020$) y a los 12 meses ($p=0.0005$), y la del CD83 fue similar, siendo para 1M ($p=0.0056$) a los 6M ($p=0.0020$) y a los 12M ($p=0.0005$).

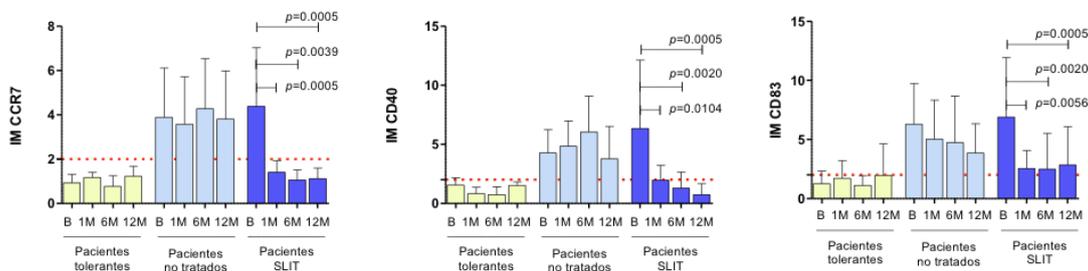


Figura 81. Resultados de maduración CD secuencial (basal, 1mes, 6 meses, y 12 meses) en pacientes tratados, no tratados y no sensibilizados a melocotón. IM expresado para los marcadores CCR7, CD40 y CD83.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Siguiendo con el estudio, cuando se analizaron los resultados sobre la media de los índices de maduración/activación de las CD en los otros dos grupos, pacientes no tratados y sujetos tolerantes, no se obtuvieron cambios de expresión para ninguno de los marcadores de CD testados a lo largo de las muestras secuenciales.

5.2.2. Cambios en las subpoblaciones de linfocitos (Th1/Th2/Th9/Treg/NK/B) durante 1 año de ITSL-Pru p 3

Se analizaron diferentes subpoblaciones linfocitarias tanto efectoras Th2 y Th9, como reguladoras (Treg), y otras subpoblaciones inflamatorias, Th1 y linfocitos NK. Además también se estudiaron los cambios en el porcentaje de linfocitos B inflamatorios productores de IgE. El fenotipo a estudiar fue el siguiente, los linfocitos Th2 fueron caracterizadas como células que expresaban $CD4^+CRTH2^+CCR4^+$, los linfocitos Th9 fueron $CD4^+CRTH2^+IL-9^+$, los Th1: $CD4^+CXCR3^+IFN\gamma^+$, Treg: $CD4^+CD127_{low}CD25^{high}FoxP3^+$, los linfocitos NK se diferenciaron en dos subpoblaciones: las inflamatorias, NK^{bright} ($CD56^+CD16^+IFN\gamma^{high}Perf_{low}$) y las citotóxicas, NK^{dim} ($CD56^+CD16^+IFN\gamma^{low}Perf^{high}$). Por último los linfocitos B se caracterizaron como ($CD19^+CD20CD138^+CXCR3^+IgE^+$).

5.2.2.1. Características fenotípicas a nivel basal:

El análisis comparativo a nivel basal, no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes alérgicos tanto tratados con ITSL-Pru p 3, como no tratados, para ninguna de las poblaciones estudiadas. Comparaciones respecto al grupo control mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células de las poblaciones efectoras Th2 ($p=0.0047$; $p=0.0097$), Th9 ($p=0.0141$; $p=0.0029$), y B plasmática ($p=0.0359$; $p=0.0055$), y una disminución significativa de la población Th1 ($p=0.0002$; $p=0.0001$) en ambos grupos de pacientes tanto tratados como no tratados. Además se observó una disminución significativa de las NK_{Bright} ($p=0.0168$) y de las Treg ($p=0.0183$) en el grupo de pacientes con ITSL-Pru p 3.

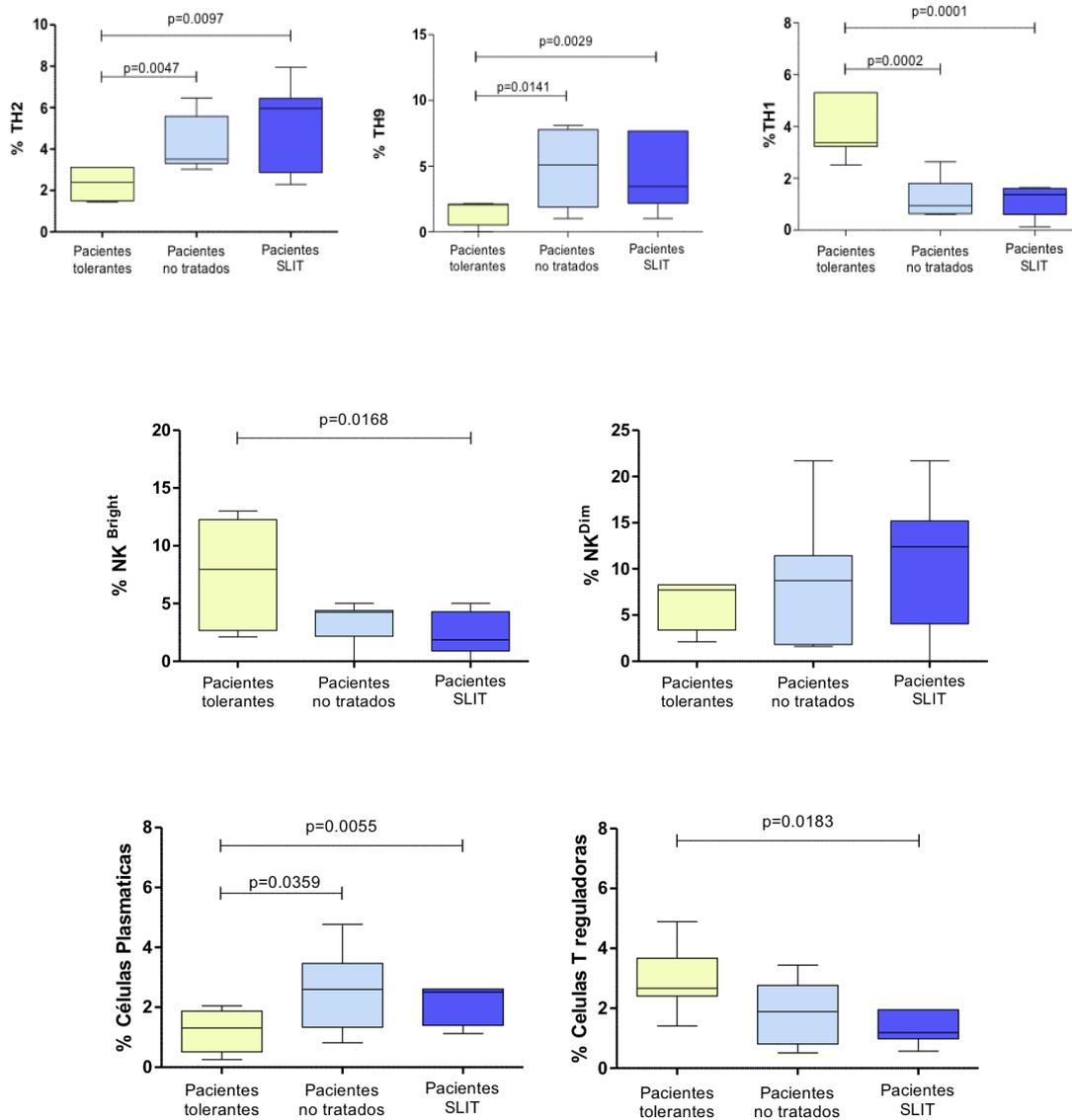


Figura 82. Fenotipo expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2, Th9, NK, Cél. Plasmáticas, y Treg) previo al inicio de ITSL-Pru p 3 en el grupo de pacientes que van o no a recibir el tratamiento, y sujetos tolerantes a melocotón.

5.2.2.2. Cambios de las características fenotípicas secuenciales:

En los siguientes resultados se intentó analizar si existieron diferencias en cuanto al porcentaje de las diferentes subpoblaciones celulares T y B a lo largo del tiempo durante la inmunoterapia. Los datos indicaron una disminución significativa de las dos subpoblaciones efectoras, Th2 y Th9 desde el primer mes de tratamiento (Figura 83).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Dicha disminución continuó durante los siguientes meses de tratamiento alcanzando niveles similares a controles tolerantes al año de ITSL-Pru p 3.

El análisis de la subpoblación de linfocitos T con patrón Th1 mostró un incremento significativo de forma temprana ya que las diferencias se observaron al primer mes de tratamiento ($p=0.0017$). Dicho incremento continuó durante el período de ITSL-Pru p 3 estudiado alcanzando porcentajes similares a los controles tolerantes al año de tratamiento (Figura 83)

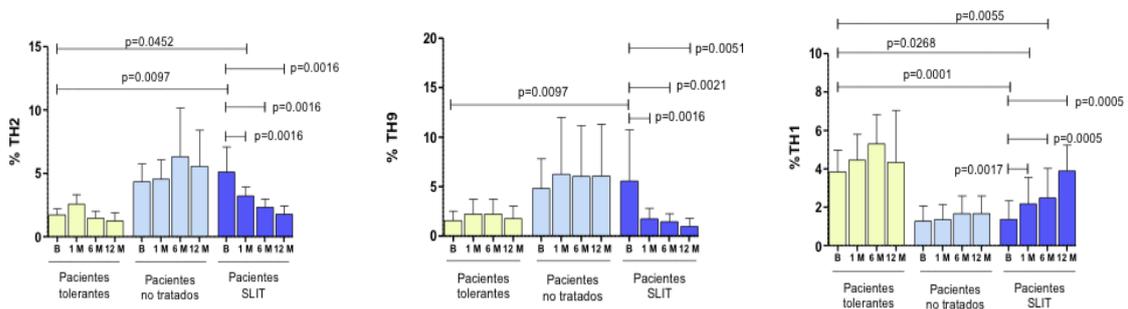


Figura 83. Fenotipo secuencial (basal, un mes, 6 meses y a los 12 meses), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2, Th9) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

En cuanto al análisis de los cambios de frecuencia en los linfocitos NK, aunque se observó una tendencia al incremento de la frecuencia de NK^{Bright} y una disminución de las NK^{Dim} , dichos cambios no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, se observó que a los 12 meses de tratamiento las diferencias significativas observadas para ambas subpoblaciones de NK en pacientes alérgicos cuando se comparaban con los sujetos tolerantes desaparecieron (Figura 84).

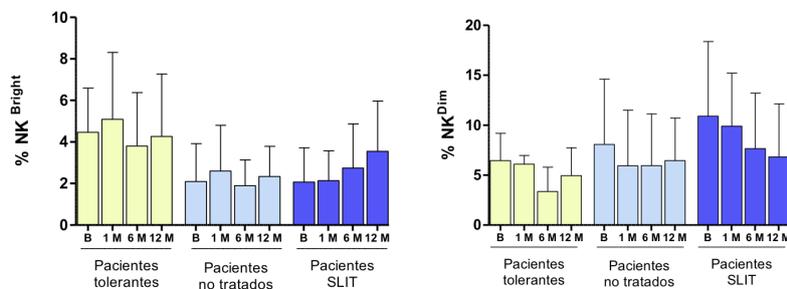


Figura 84. Fenotipo secuencial (basal, un mes, 6 meses y 12 meses), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (NK^{Bright} y NK^{Dim}) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

El análisis del efecto de la IT en la subpoblación de células plasmáticas productoras de IgE mostró una disminución significativa a partir de los 6 meses de tratamiento ($p=0.0128$). Lo que indicó que los cambios a nivel de esta subpoblación se producen de forma más tardía que los observados en las poblaciones T efectoras, Th2 y Th9 (Figura 85).

Por último el análisis de la frecuencia de células Treg mostró un aumento significativo temprano, al primer mes de tratamiento ($T(1)=0.0204$), que se mantuvo a lo largo de los 12 meses analizados ($T(6)=0.0128$; $T(12)=0.0010$) (Figura 85).

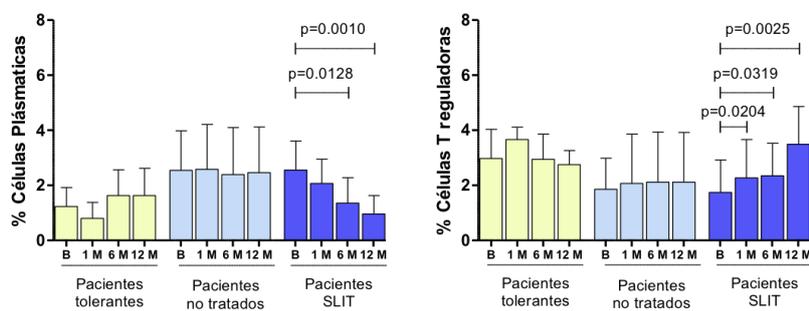


Figura 85. Fenotipo secuencial (basal, T(1), T(6), T(12)), expresado en porcentaje de subpoblaciones linfocitarias (Células Plasmáticas, y Treg) en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, no tratados, y tolerantes a melocotón.

El análisis de los resultados sobre la frecuencia de las diferentes poblaciones de linfocitos en las muestras secuenciales en los grupos de sujetos no tratados y sujetos tolerantes, no se observaron cambios en ninguna de las subpoblaciones celulares analizadas (Figuras 83-85).

5.3. Cambios en la respuesta proliferativa específica a Pru p 3 de las subpoblaciones linfocitarias (Th1/Th2/Th9/Treg/NK/B)

Tras el estudio del fenotipo de las poblaciones linfocitarias, se intentó analizar si existían diferencias en cuanto a la proliferación linfocitaria de clones específicos frente al alérgeno Pru p 3, entre sujetos con ITSL-Pru p 3 y sujetos alérgicos sin tratamiento, y sujetos tolerantes. Para ello, se realizó el test de transformación linfocitaria (TTL) incubando los linfocitos con CD premaduras con Pru p 3 a $10\mu\text{g/ml}$ y $25\mu\text{g/ml}$. La

capacidad de proliferación de las principales subpoblaciones linfocitarias se evaluó de forma basal y a los distintos tiempos secuenciales recogidos (T(1), T(6), T(12) meses). En todos los casos se empleó el CFSE como marcador de proliferación, tomando como valor final el índice de proliferación linfocitaria (IP) y considerando una proliferación positiva cuando $IP > 2$.

5.3.1. Proliferación basal

El análisis global de los resultados de proliferación en estado basal de los tres grupos indicó la existencia de diferencias significativas para las subpoblaciones Th2 y Th9 entre los grupos de pacientes y el grupo de sujetos tolerantes al melocotón ($p=0.0132$ y $p=0.0139$ para Th2; $p=0.0325$ y $p=0.0221$ para Th9). Sin embargo, no se observó proliferación específica a Pru p 3 en la subpoblación de linfocitos Th1 en ninguno de los grupos analizados (Figura 86).

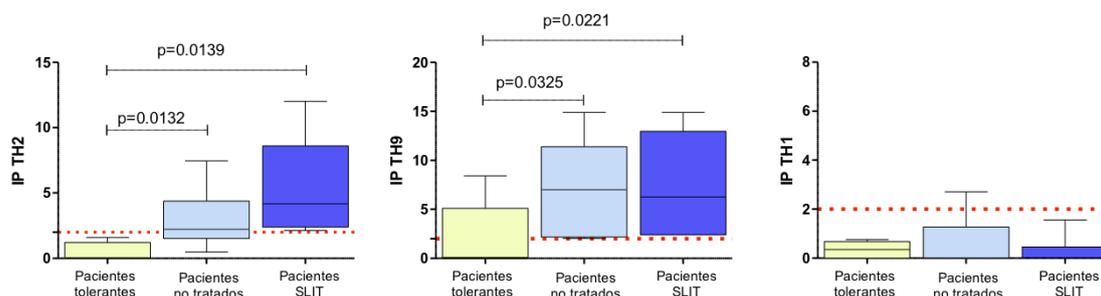


Figura 86. Análisis de la proliferación de subpoblaciones linfocitarias (Th2, Th9, Th1), expresado en IP en estado basal frente a Pru p 3, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados a melocotón.

Los resultados en los linfocitos NK^{Bright} mostraron que la respuesta proliferativa en estado basal de los tres grupos a estudiar fue negativa para las células NK^{Bright} . Sin embargo, si se observó una proliferación específica a Pru p 3 de la subpoblación NK^{Dim} , siendo esta significativamente más elevada en pacientes alérgicos a melocotón tanto tratados como no tratados con ITSL-Pru p 3 ($p=0.0060$ y $p=0.0251$, respectivamente) (Figura 87).

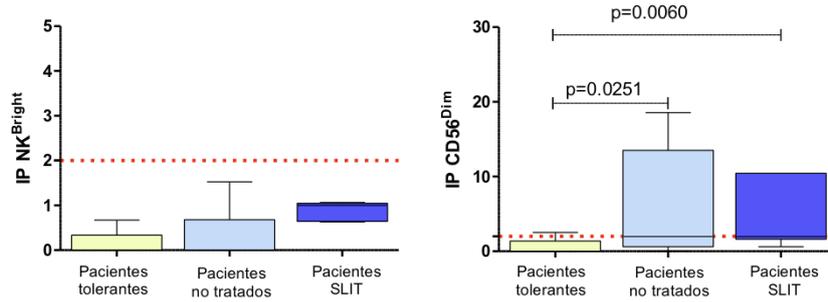


Figura 87. Análisis de la proliferación (IP) frente a Pru p 3, de subpoblaciones linfocitarias (NK^{Bright}, NK^{Dim}) en estado basal, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados a melocotón.

El análisis de la proliferación de la subpoblaciones de células B efectoras indicó un comportamiento similar al de las células T efectoras (Th2 y Th9), con un aumento significativo de la proliferación específica a Pru p 3 en pacientes alérgicos comparados con los individuos tolerantes ($p=0.0001$ y $p=0.0006$) (Figura 88).

No se observó una respuesta proliferativa específica a Pru p 3 de la subpoblación de células Treg en ninguno de los grupos analizados (Figura 88).

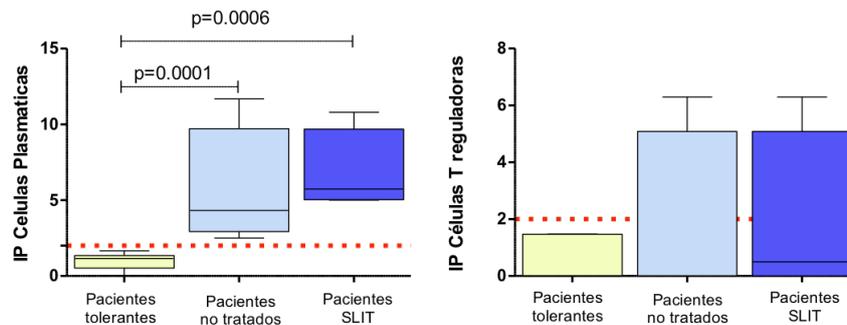


Figura 88. Análisis de la proliferación (IP) frente a Pru p 3, en las CP y Treg a nivel basal, para los grupos pacientes que van o no a recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

5.3.2. Análisis de los cambios en la respuesta proliferativa específica

El análisis secuencial de los cambios inducidos por la IT específica en la proliferación celular específica a Pru p 3 indican resultados paralelos a los observados en los estudios fenotípicos.

Se observó una disminución significativa de la proliferación a partir de los 6 meses de tratamiento en la subpoblación de linfocitos Th2 solo en los pacientes tratados con ITSL-Pru p 3 ($p=0.0058$) alcanzando niveles similares a los sujetos control a los 12 meses de tratamiento. En el caso de los linfocitos Th9, aunque se observó una disminución a los 12 meses, esta no fue significativa. Por el contrario, se observó un incremento significativo de la proliferación específica frente a Pru p 3 de la subpoblación Th1 desde el primer mes de tratamiento ($p(1m)=0.0413$; $p(6m)=0.0345$ $p(12m)=0.0058$) alcanzando niveles de proliferación positivos a partir de los 6 meses. Dichos cambios sólo se observaron en los pacientes tratados con ITSL-Pru p 3 (Figura 89).

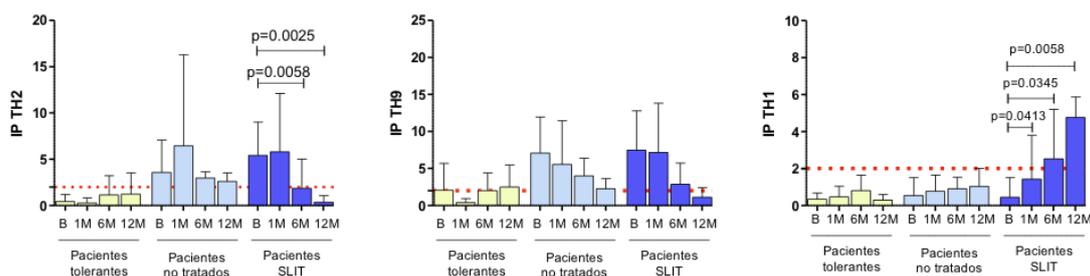


Figura 89. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, en las subpoblaciones de linfocitos Th2, Th9, Th1, para los grupos de pacientes que van o no recibir ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

La respuesta del grupo de sujetos tratados con ITSL-Pru p 3 fue diferente según la población de linfocitos NK. Se mostró un aumento significativo de la proliferación de los linfocitos NK^{Bright} siendo esta significativa a partir de los 6 meses de tratamiento (T(6) $p=0.0142$; T(12) $p=0,032$) sólo en pacientes tratados con ITSL-Pru p 3. De forma paralela, se observó una disminución significativa de la proliferación de la subpoblación de linfocitos NK^{Dim}, a partir de los 6 meses siendo la proliferación negativa a los 12 meses de tratamiento (Figura 90).

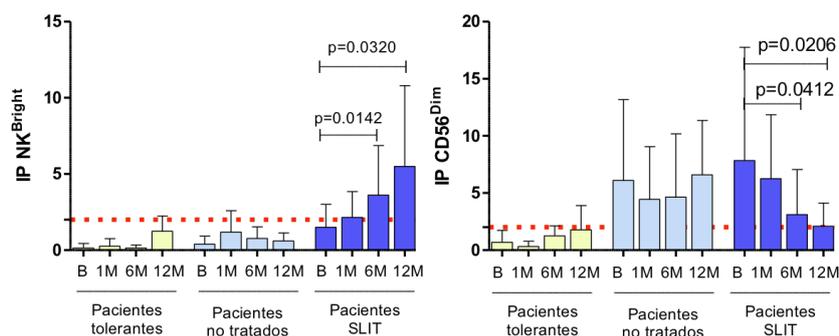


Figura 90. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, para los NK^{Bright} y NK^{Dim}, en los grupos de pacientes que van a recibir o no ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

En relación con la subpoblación de células B los datos mostraron que en el grupo de pacientes con ITSL-Pru p 3 la proliferación en presencia del Pru p 3 disminuye desde el primer mes, y que esta tendencia continúa a lo largo del tratamiento, siendo la diferencia significativa a los 6 ($p=0.0222$) y 12 meses ($p=0.0140$). Por el contrario, se observó un incremento significativo de la proliferación específica a Pru p 3 de la población de linfocitos Treg a los 12 meses de tratamiento ($p=0.0059$).

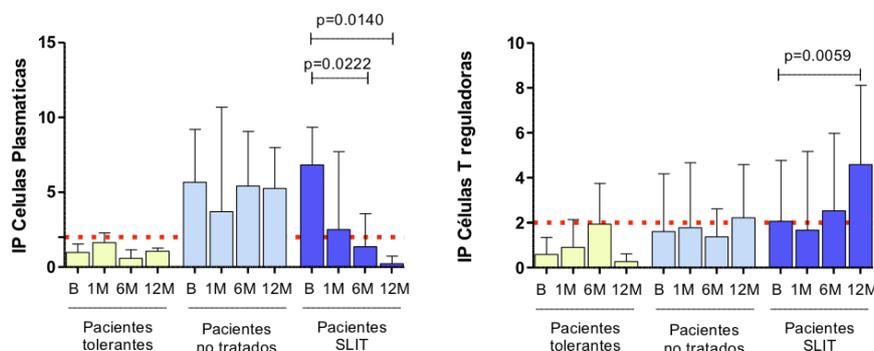


Figura 91. Análisis de la proliferación (IP) secuencial (basal, a T(1), T(6), T(12) meses) frente a Pru p 3, para las CP y Treg, en los grupos de pacientes que van a recibir o no ITSL-Pru p 3, y no sensibilizados-control a melocotón.

Los análisis estadísticos para el grupo de pacientes no tratados si bien los datos de IP fueron positivos para las células efectoras (células Th2 y Th9), así como para los linfocitos NK^{Dim} y células plasmáticas productoras de IgE, esta proliferación no sufrió cambios a los largo del tiempo para ninguna de las subpoblaciones. Por otro lado, los

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

linfocitos Th1, linfocitos NK^{Bright} y las células Treg mostraron una proliferación específica a Pru p 3 negativa a lo largo de todo el estudio en niveles similares a los encontrados en el grupo de sujetos tolerantes.

En cuanto al grupo de sujetos tolerantes, el IP frente a Pru p 3 fue negativo para todas las subpoblaciones de linfocitos estudiadas, tendencia que se mantuvo en el tiempo para todos los tipos de células.

Todos estos resultados revelan una relación directa con los resultados obtenidos tanto de fenotipo celular como con los obtenidos en la maduración de las CD.

DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Aunque en las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de la alergia a alimentos, aún sigue existiendo incertidumbre en algunos aspectos. Es complicado estimar la prevalencia, que actualmente se estima del 1-2% de la población general (19), e incidencia de la misma debido a los múltiples factores que influyen en esta patología, siendo las diferencias geográficas uno de ellos (34, 37, 140). Por otro lado, muchos de los estudios de epidemiología se basan en los datos aportados por el propio paciente (44). Para obtener una información más precisa sobre la prevalencia de la alergia a alimentos se deben realizar estudios con pruebas objetivas en su conjunto en base a la definición de alergia a alimentos (10), como primer paso de un diagnóstico correcto (418). El uso aislado de pruebas cutáneas intraepidérmicas y serológicas con la determinación de IgE específica, tiene sus limitaciones, ya que un resultado positivo por sensibilización no indica en todos los casos la existencia de alergia al alimento determinado. Además, estas pruebas pueden estar influenciadas por la edad, el perfil de sensibilización a otros alérgenos del ambiente, o a otros alimentos relacionados (448). Por todo ello es necesario comprobar la reactividad clínica al alimento mediante pruebas de provocación controlada (6, 29, 112, 426, 430, 457), siendo la PPDCCP las más objetiva (486). Desafortunadamente no existen muchos estudios en los que se aplique esta técnica diagnóstica debido a su complejidad, riesgo, coste, y a la falta de homogeneidad en los protocolos (602).

La alergia a alimentos supone uno de los principales motivos de consulta no sólo en una Unidad de Alergología sino que también son la principal causa de anafilaxia atendida en los Servicios de Emergencia (20). Se estima que se atienden alrededor de 30000 reacciones y ocurren 200 muertes por año debido a alergia alimentos sólo en los Estados Unidos, y 48 fallecimientos en Reino Unido (21). La anafilaxia por alimentos es más frecuente en niños y adolescentes que en los adultos, y dentro de ellos, afecta más a las mujeres, en especial por los alimentos de origen vegetal (6, 25, 29, 44, 270).

Cuando se evalúan los alimentos más frecuentemente implicados en la anafilaxia, existen diferencias geográficas y de edad. Centrándonos en nuestra zona del sur de Europa, y en población adulta, según los resultados del estudio NORA y Alergológica 2005, los alimentos de origen vegetal principales inductores de anafilaxia fueron los frutos secos y las frutas, concretamente de la familia *Rosaceae* (44, 140). En este sentido la sensibilización a LTP es particularmente importante y concreta del área

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Mediterránea y Portugal (254, 256), donde la presencia de vegetación del orden *Fagales* es muy escasa (391). Aunque su prevalencia exacta no ha sido establecida en población general, se ha detectado una sensibilización del 47-100% entre los pacientes que acuden a estudio alergológico por reacciones con frutas (254).

Dentro de las frutas rosáceas el melocotón es la principal implicada en dichas áreas, siendo Pru p 3, una LTP, el alérgeno mayor y sensibilizante primario (256). La dificultad intrínseca de los pacientes sensibilizados a este panalérgeno radica en que en su evolución clínica, debido a esta sensibilización primaria, pueden desarrollar síntomas con otros alimentos vegetales relacionados o no. Esta patología se conoce como Síndrome LTP, denominado así por su perfil heterogéneo debido a la amplia distribución de LTP en el reino vegetal, y a la estrecha relación estructural y de secuencia conformacional, dado que no sólo reconocen LTP de la familia Rosácea (melocotón, manzana, cereza, albaricoque, ciruela, fresa, nectarina, pera, mora, paraguayana, membrillo, y almendra) (128, 264, 339-341), sino de otros alimentos como otras frutas, hortalizas, legumbres, frutos secos, semillas, cereales, látex, e incluso pólenes (331-333).

Además esto es importante ya que los pacientes que son diagnosticados de Síndrome LTP presentan un fenotipo especial con predominancia de reacciones sistémicas (383), descritas en hasta un 58,69% de los casos (129), sin poder prever cuál es la ingesta mínima capaz de desarrollar hipersensibilidad alérgica en un determinado paciente, ni si estarán sensibilizados a otros alimentos además del melocotón. Esto se explica dado que se trata de proteínas de defensa acumuladas principalmente en la parte aérea de las plantas, con una estructura que las hace altamente resistentes a los tratamiento térmicos, cambios bruscos de pH, proteólisis, degradación endolisosomal, o incluso ondas de microondas (234, 236-240). Tal y como hemos evaluado en nuestro trabajo, y de acuerdo con los datos de estudios previos (553, 564, 603), la edad de inicio de este síndrome es más tardía, comenzando normalmente en la adolescencia, en torno a los 19 años, a diferencia de lo que ocurre con la sensibilización a otros alimentos como el cacahuete por sensibilización a proteínas de reserva, Ara h 2, la cuál aparece en edades más tempranas (44). Por último mencionar que la historia natural del síndrome LTP es tendente a la persistencia y a la adquisición de sensibilización a otros vegetales con el tiempo (129).

Con respecto al tratamiento de los pacientes con esta patología, hasta hace pocos años la única opción terapéutica era la evitación de los alimentos que le producían

síntomas, o incluso de aquellos a los que el paciente estaba sensibilizado. La prescripción farmacéutica se basaba en tratamiento sintomático para las crisis, incluida la adrenalina autoinyectable, por el riesgo que sufren estos pacientes de presentar una reacción sistémica. En alergia, en general, las terapias que buscan el restablecimiento de la tolerancia inmunológica (531) son el único tratamiento que puede alterar el curso de la enfermedad, y han demostrado ser una herramienta clínica segura y efectiva. Aunque el mecanismo inmunológico que lo produce no se conoce aún en profundidad, lo que se pretende con el tratamiento inmunomodulador es desviar el patrón de respuesta efectora de una reacción alérgica, Th2 hacia Th0/1, con la generación de células Treg específicas del alérgeno, que supriman las células T efectoras específicas (73, 534-536). Existen distintos tipos de IT dependiendo de la vía de administración.

La ITSC ha sido la principal investigada para el tratamiento de síntomas por aeroalérgenos y veneno de himenópteros (537, 538), demostrando eficacia con un buen perfil de seguridad. Sin embargo, para alimentos, los inicios con extracto acuoso de cacahuete, aunque demostraron eficacia (540), no superaron en seguridad. Este estudio con cacahuete fue abandonado al publicarse varios casos de fallecimientos en relación a alergia alimentaria (14). Por tanto es primordial encontrar rutas alternativas para el tratamiento con alimentos, que mejoren la seguridad y mantengan la tolerancia en los pacientes. Actualmente se trabaja más activamente en la vía oral, y en moléculas hipoalérgicas para la vía subcutánea (584).

En la ITO, hasta el momento actual, los estudios se han realizado sobre población pediátrica para alimentos como leche de vaca, pescado, huevo, trigo, manzana y cacahuete, hablando de un porcentaje de desensibilización de hasta el 75% (317, 542, 543). Este matiz es importante, pues la interrupción de la dosis diaria elevada que han de mantener, podría conducir a la presencia de reacciones de hipersensibilidad. Además de los cambios en la tolerancia *in vivo*, se han observado otros a nivel inmunológico, como el descenso de reactividad del basófilo a los 4-6 meses, y el aumento de IgG4 (546) e IgA (547). No obstante, alrededor del 90% de los participantes refirieron efectos adversos moderados, con uso de adrenalina en algunos casos, así como un alto porcentaje de abandono durante el tratamiento, lo que supone un riesgo mayor de sufrir reacciones en exposiciones posteriores no controladas (548, 549).

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

A la vista de lo mencionado anteriormente, la ruta sublingual supone una alternativa de tratamiento de esta patología, planteada como segura. Desde 1986 se ha conseguido una amplia experiencia clínica en la ITSL para aeroalérgenos por síntomas respiratorios (550). Aunque su primera indicación tanto en adultos como en niños, sigue siendo para la clínica de rinoconjuntivitis por aeroalérgenos, desde 2003 también se está mostrando útil para el tratamiento de la alergia a alimentos (551). Hasta la fecha existen 10 ensayos de ITSL con alimentos (leche, kiwi, avellana, cacahuete, y melocotón) (276, 552-555) en los que se ha observado tolerancia por reducción de síntomas en población infantil y adulta. Además, se mostraban datos de descenso de reactividad cutánea y del basófilo, así como un aumento del nivel de IgG4.

En el caso de la reactividad del basófilo durante la ITSL, ésta no ha sido suficientemente investigada. Se han encontrado estudios con ITSL con gramíneas o látex en los que su reactividad disminuye o bien no se modifica, por lo que no se puede aún establecer como biomarcador de mejoría clínica (556-558).

Respecto a la eficacia y seguridad de la ITSL frente a la ITO, se ha comprobado un menor porcentaje de efectos secundarios, siendo la mayoría (hasta un 29% de los casos) locales de la zona de administración (276, 553).

Actualmente, por tanto, parece necesario el estudio en profundidad del efecto de la ITSL para el tratamiento de la alergia a alimentos, tanto de los mecanismos inmunológicos por los que se produce, como de los cambios que se inducen en otros alimentos relacionados, dado que parece más segura para el paciente que otras rutas, manteniendo la tolerancia. En concreto para los pacientes sensibilizados a LTP, ya que la complejidad de este síndrome radica en la cantidad de alimentos de origen vegetal con los que tienen reacciones graves.

En este trabajo se han incluido un total de 48 pacientes con una edad comprendida entre los 15-65 años, con alergia confirmada a melocotón, que fue condición imprescindible para incluir a los pacientes en el estudio. Los sujetos fueron remitidos a una Unidad de Alergología, y tras su valoración mediante un estudio alergológico tanto *in vivo* como *in vitro*, se les propuso iniciar el tratamiento de seguimiento a un año, con ITSL-Pru p 3. Por motivos personales, 36 decidieron comenzar con el tratamiento, y un grupo 12 participar sin realizar la ITSL.

Se analizaron las características clínicas y demográficas de ambos grupos de pacientes, sin encontrar diferencias significativas. Más del 58% fueron mujeres, con

una mediana de edad de 30 años. Un porcentaje mayor al 66% estaban sensibilizados a pólenes, pero tan sólo en hasta el 44% de estos pacientes manifestaban clínica de rinitis aislada o en conjunción con asma en relación con esta sensibilización, coincidiendo estos datos con los aportados por publicaciones previas (553, 564, 603). La mediana de edad de aparición de síntomas con melocotón fue de 18 años, y el último episodio sufrido tras su ingesta 8 años antes de nuestra valoración. Alrededor del 83% de los pacientes tratados y no tratados presentaron alergia a otros vegetales relacionados con la sensibilización a LTP, de ellos los más frecuentes fueron la manzana, el kiwi, la fresa, el cacahuete, la nuez, y la avellana, en relación a lo estudiado hasta el momento (129, 139, 256, 564). En los ensayos publicados referentes a la ITSL con Pru p 3 en los que se evalúan pacientes con características demográficas similares, no se hace evaluación de la sensibilización a vegetales relacionados con LTP.

Por otro lado, la importancia clínica principal de este estudio recae en el hecho de que el 100% de los pacientes incluidos y tratados, presentaron síntomas sistémicos en relación con la ingesta de melocotón, siendo el 43% leves, y el 55% moderados o graves (131). Los síntomas en relación con melocotón fueron confirmados mediante PPDCCP con melocotón fresco con piel, salvo en los pacientes que habían presentado más de una reacción sistémica tras su ingesta en los dos años previos al inicio del tratamiento. En total se provocaron el 77% de los pacientes. En este aspecto, los pacientes del grupo no ITSL-Pru p 3 no presentaron diferencias.

Si bien existen estudios de ITSL específica a diferentes alérgenos alimentarios, muy pocos sobre LTP, y más concretamente sobre la alergia al melocotón, Pru p 3. El estudio de Fernández-Rivas y cols., a pesar de ser de los mejores trabajos según la revisión de la Cochrane (563) respecto a ITSL con alimentos, es un ensayo DCCP de corta duración, con pocos pacientes incluidos, y en el que la mayoría, hasta un 63% de ellos, manifestaban sólo síntomas locales tras la ingesta de melocotón (553, 603), por lo que menos del 50% referían síntomas sistémicos, excluyendo además los que habían presentado anafilaxia grave. Otra de las diferencias de nuestro trabajo con estos ensayos previos es que la valoración de la tolerancia se realizó con melocotón fresco con piel, no con Pru p 3 liofilizado, por lo que se mantienen todas las características físico-químicas del alimento inalteradas a como va a ser consumido en la vida real.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

En nuestro estudio hemos demostrado que la ITSL-Pru p 3 es segura para los pacientes incluso con reacciones graves. No se objetivaron reacciones sistémicas durante la fase de inicio ni de mantenimiento de la misma. En total continuaron con el tratamiento 32 pacientes, de los cuales el 53% de los cuales presentó alguna reacción en relación con la misma, siendo síntomas leves localizados con la zona de administración del tratamiento durante la fase de aumento de dosis al inicio, en el 80% de ellos, autolimitados sin tratamiento en la mayoría de los casos. Estos datos coinciden con el estudio de Fernández-Rivas (553), donde el 98% de las reacciones fueron locales en la fase de inicio de la ITSL con melocotón. Además, coincide con los datos de seguridad con respecto a la ITSL, en los que la mayoría de la reacciones descritas con su administración son locales sin repercusión para el paciente (556-558).

Tras un año de tratamiento, se evaluó la efectividad de la IT y la tolerancia a melocotón en el grupo de pacientes tratados con ITSL-Pru p 3 comparándolo con el grupo de pacientes no tratados. El tiempo de tratamiento es otra novedad de este estudio, pues hasta ahora, se había estudiado la eficacia de la IT a 6 meses (553, 603). El 91% de los pacientes que recibieron la ITSL-Pru p 3 mejoraron su tolerancia a melocotón tras los 12 meses del período de estudio, mientras que sólo el 25% de los no tratados incrementaron la tolerancia de forma espontánea.

La respuesta a la ITSL-Pru p 3 se midió por los cambios en el tamaño de la pápula en las pruebas intraepidérmicas con LTP, y por los cambios en la cantidad de melocotón con piel ingerida sin reacción mediante la PPDCCP al inicio y tras 12 meses de seguimiento. Únicamente se encontraron diferencias significativas en los pacientes tratados, con una disminución en el diámetro de la pápula por prueba intraepidérmica, y un aumento significativo en la cantidad de melocotón tolerada en PPDCCP. Sólo 3 pacientes (9,4%) continuaron sin tolerar la cantidad completa de 150g, si bien aumentaron la cantidad de melocotón tolerada. Estos resultados guardan relación con estudios anteriores en los que se utilizaba el mismo producto en el contexto de un ensayo clínico. En ellos, tras 6 meses, encontraron una disminución de la reactividad cutánea, y un aumento de la cantidad de Pru p 3 necesaria para inducir hipersensibilidad alérgica (553, 603). Es importante señalar que, como se ha mencionado antes, después de 1 año de ITSL-Pru p 3, el 91% de los pacientes mostraron una tolerancia completa a melocotón con piel. Desafortunadamente, no hay datos comparables en la literatura, tal vez debido al corto tiempo de los otros estudios.

Un efecto interesante de la IT que hasta el momento no ha sido suficientemente estudiado es como el tratamiento con un alérgeno puede afectar la sensibilización a otros alérgenos relacionados. La información a este respecto es muy limitada. Existe un estudio realizado por Garcia y cols. (564) en el que se evaluaron los cambios clínicos en pacientes sometidos a ITSL con extracto de piel de melocotón respecto a la prueba cutánea con manzana, en concreto para Mal d 1 y Mal d 4 (ninguna LTP), encontrando disminución del tamaño de la pápula (564). Sin embargo, no se analizó la reactividad frente a Mal d 3, la LTP de la manzana.

En nuestro estudio se quiso analizar el efecto de la ITSL-Pru p 3 en la reactividad al cacahuete, ya que un porcentaje importante de los pacientes estaban catalogados como alérgicos al mismo. En este sentido, nuestro estudio añade otro punto novedoso, al analizar los cambios en la tolerancia del cacahuete a través de su LTP (Ara h 9) en los pacientes que recibieron ITSL-Pru p 3. Así, en el grupo de pacientes tratados con ITSL-Pru p 3 se clasificaron 3 grupos en función de su reactividad con cacahuete. De ellos, 12 (37,5%) también tenían alergia al cacahuete (Grupo A), 11 (34,37%) estaban sensibilizados pero toleraban su ingesta (Grupo B), y 9 (28,12%) no tenían sensibilización ni reacción a su ingesta (Grupo C). Se analizaron igualmente las características clínicas y demográficas de estos 3 grupos de pacientes. Se observó que el porcentaje de pacientes varones (41,7%) era mayor en los también alérgicos al cacahuete respecto a los tolerantes (B y C), además de que los pacientes del grupo C mostraron una mayor gravedad en las reacciones, y toleraron una cantidad inferior de melocotón. No está claro porqué se observaron estos datos, ya que no se encontraron diferencias clínicas ni demográficas entre este grupo y los demás, a excepción de una sensibilización más restringida a las frutas rosáceas, sin encontrar además, publicaciones al respecto que lo pudieran aclarar.

Es importante señalar que todos los pacientes alérgicos al cacahuete tuvieron un perfil de sensibilización por LTP. Cuando se analizan los períodos de inicio de síntomas con los diferentes alimentos, todos los pacientes del grupo A tuvieron alguna reacción con melocotón previa al inicio de síntomas con cacahuete, siendo la mediana de aparición de clínica con cacahuete de 19 años.

Teniendo en cuenta la respuesta clínica de la ITSL-Pru p 3 respecto al melocotón en estos 3 grupos, se encontraron datos similares, con una disminución significativa del área de la pápula por prueba intraepidérmica con melocotón, y con un aumento significativo en la cantidad de melocotón tolerado. Sin embargo, el porcentaje de

casos con una PPDCCP negativa a melocotón tras 12 meses de la IT fue diferente. En el grupo A el 100% fueron tolerantes al melocotón completo, en el grupo B el 91%, y el 78% de los pacientes en el grupo C. Estos resultados indican que en el grupo C, exclusivamente alérgicos a melocotón, no sólo tenían reacciones más graves, como se describió anteriormente, sino que también respondieron ligeramente peor a la ITSL-Pru p 3. Aunque estos hallazgos merecerían un análisis más detallado con una población mayor, que la mediana de tolerancia natural al melocotón fuese menor en el grupo C, podría sugerir la necesidad de un período de tratamiento más largo hasta conseguir alcanzar el mismo beneficio clínico que en los otros grupos, como se ha descrito recientemente en la ITSL con pólenes (569).

Con respecto a los cambios clínicos en la respuesta al cacahuete tras la ITSL-Pru p 3, se analizaron en el grupo de pacientes alérgicos (A), comparando a tiempo basal y tras 12 meses los cambios en prueba cutánea y tolerancia a cacahuete por PPDCCP. Tras un año, el 66,7% de los pacientes presentaron una disminución del tamaño de pápula en la prueba intraepidérmica con cacahuete. Un 58,3% de los pacientes ingirieron sin reacción durante la PPDCCP la cantidad máxima de cacahuete, y el resto, salvo un paciente, aumentaron su tolerancia respecto al valor basal. Aunque ese 58,3% de pacientes que consiguieron la tolerancia completa a cacahuete tras el tratamiento es menor que los valores alcanzados respecto al melocotón (91%), los resultados son esperanzadores debido a la importancia de este alimento respecto al riesgo de reacciones sistémicas (265, 273). Sin embargo, se precisarían estudios en una mayor población para poder corroborar estos datos. Así mismo es posible que el tiempo de tratamiento debiera ser superior a un año con algunos alimentos para obtener resultados similares.

Con respecto a los cambios inmunológicos a nivel humoral, se ha considerado que las variaciones en los niveles de IgEe e IgG4e, y más concretamente, la proporción IgG4e/IgEe son biomarcadores para la evaluación de las IT (604, 605). En nuestro estudio se han detectado cambios de los niveles de IgEe e IgG4e para Pru p 3 y Ara h 9 tras 12 meses de seguimiento, sólo en los pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, con una disminución de IgEe y un aumento de IgG4e. Tras un mes de ITSL-Pru p 3 se produjo un incremento de los niveles de IgE tanto para Pru p 3 como para Ara h 9, tal y como se ha descrito en estudios previos con ITSL (554, 555, 559, 572). Pasada esta fase de inicio del tratamiento, se observó una tendencia significativa a la disminución progresiva de IgEe, y al aumento en los valores de IgG4e tanto para Pru p 3 como para Ara h 9 en el grupo de pacientes tratados. Estos resultados están de acuerdo con

los datos obtenidos en pacientes tratados con ITSL para cacahuete (554, 559), pero no coinciden con los trabajos previos para ITSL con melocotón, en los que se observa un aumento significativo en los niveles de IgG4 e para Pru p 3 en el grupo activo (553), así como un aumento significativo en los niveles de IgEe para Pru p 3 (564, 603). Estas discrepancias probablemente sean debidas a la duración del tratamiento en esos casos (6 meses) en comparación con nuestro estudio de 12 meses. El análisis de la relación IgG4e/IgEe mostró un aumento significativo tras el año de ITSL-Pru p 3, lo que indica que el aumento de IgG4e junto a la disminución de IgEe podría contribuir como indicador de mejora de la tolerancia, como también se ha encontrado en los datos respecto a ITSL con cacahuete (595).

Con respecto al análisis de los cambios para IgEe e IgG4e por grupo de pacientes en función del cacahuete, éstos mostraron un comportamiento diferencial en el grupo C, donde no se encontraron diferencias para IgEe a Pru p 3, pero si hubo un aumento significativo en los niveles de IgG4e a Pru p 3. Sin embargo, la relación IgG4e/IgEe no difirió entre los grupos.

Considerando los cambios en la reactividad del basófilo, se encontró un aumento tanto para Pru p 3, como para Ara h 9, tras 12 meses de ITSL-Pru p3. Se ha encontrado un patrón similar en estudios previos realizados con ITSL-Pru p 3 (603) y con IT por aeroalérgenos, tales como polen de gramíneas (558) o ácaro del polvo (*Dermatophagoides*) (606), indicando que los efectos clínicos de la IT son independientes de los cambios cuantitativos en la reactividad de los basófilos. Sin embargo, también existen publicaciones en las que se observa una disminución en la reactividad del basófilo durante la ITSL para aeroalérgenos (607), y para alimentos como leche de vaca (608) y cacahuete (554). Razones que podrían explicar estas diferencias incluyen el contacto permanente con LTP dado su ubicuidad tanto en pólenes como en alimentos en el área Mediterránea; o a que se deba a un efecto transitorio de la reactividad del basófilo, tal y como se ha demostrado para el cacahuete (609) y aeroalérgenos (610). Sería interesante por tanto, medir esta reactividad durante un período de tiempo más largo y poder observar su evolución.

Al comparar los cambios de reactividad del basófilo en los grupos A, B, y C, de forma individual, sólo se encontraron cambios significativos en la reactividad para el grupo A. Es de señalar en este caso además, que se observó un descenso significativo del tamaño del habón a Pru p 3 por prueba intraepidérmica tras un año de ITSL-Pru p 3 a la vez que aumentaba la reactividad del basófilo. Esto podría indicar que los efectos

beneficiosos de la IT podrían estar en este caso mediados por una disminución en la reactividad de los mastocitos en lugar de la reactividad de los basófilos (595), o que las condiciones específicas experimentales no imitan con exactitud las condiciones fisiológicas.

En la literatura se ha descrito que la IT específica induce cambios en la fase tardía de la respuesta inmunológica, y que éstos están asociados con marcadores celulares que indican la existencia de una modulación de la respuesta, desde una Th2 hacia una menos inflamatoria Th1/Treg (611). En este trabajo se han estudiado los cambios celulares que pudieran originar una modificación en la respuesta inmunológica que expliquen los beneficios clínicos obtenidos durante la ITSL. Así, se han analizado por un lado las características fenotípicas de las CD y sus cambios durante el seguimiento de un año de ITSL-Pru p 3, ya que estas células son críticas en el inicio de la respuesta inmunológica, y capaces de modularla dependiendo de las moléculas coestimuladoras y señales inducidas por las citoquinas que intervienen durante el proceso de presentación antigénica (612). El análisis a nivel basal demostró la existencia de maduración específica a Pru p 3 únicamente en los pacientes alérgicos a Pru p 3, con diferencias significativas respecto a los sujetos que toleraban el alimento, lo que confirma los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo (598). El análisis de los marcadores de superficie celular de maduración CD80 y CD86, y de activación CD83, CD40, y CCR7, demostró una disminución de su expresión sólo en los pacientes tratados con ITSL-Pru p 3, lo que sugiere una disminución de la respuesta efectora dirigiéndose así a una reguladora (613, 614). Esto se confirma cuando analizamos las características fenotípicas de las subpoblaciones linfocitarias, según lo cual a nivel basal se caracterizó por un aumento significativo en las poblaciones efectoras Th2, Th9, y células B, con una disminución de las células Th1 en los grupos de pacientes alérgicos al melocotón comparados con los sujetos tolerantes. Durante la evolución con la ITSL-Pru p 3 estas diferencias se invirtieron, hallándose una disminución significativa que se mantuvo desde el primer mes de tratamiento, en las dos subpoblaciones de células efectoras Th2 y Th9, junto a un incremento significativo también desde el primer mes en la subpoblación Th1 y Treg, en el grupo de pacientes que recibieron ITSL-Pru p 3. Es importante señalar los cambios observados en la población Th9, ya que según la literatura éstas tienen un papel inflamatorio (60, 615, 616).

En las células NK aunque también hubo una tendencia al incremento de expresión, estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo para las células plasmáticas

productoras de IgE el descenso que se encontró fue significativo a partir del 6º mes de tratamiento. Ninguno de estos cambios fue observado ni en el grupo de pacientes no tratados con ITSL-Pru p 3, ni en los sujetos control.

Finalmente se intentó analizar mediante TTL si los cambios observados en el fenotipo de las diferentes subpoblaciones eran generados de manera específica por Pru p 3. Los datos indican que durante la ITSL-Pru p 3, los cambios en la proliferación específica frente a Pru p 3 fueron similares a los resultados obtenidos en la expresión fenotípica, observándose sólo variaciones significativas para el grupo de pacientes que recibió ITSL-Pru p 3. Se encontró un IP negativo a los 12 meses de tratamiento para la subpoblación Th2, Th9, NK^{Dim} y de células plasmáticas productoras de IgE, así como el incremento de la proliferación a los 6 meses de ITSL-Pru p 3 para la subpoblación Th1, NK^{Bright}, que son las productoras de IFN (617, 618). Éstas influyen en la amplificación de la respuesta Th1 tal y como se ha demostrado en reacciones alérgicas a amoxicilina (619). Además, se ha observado un incremento en la subpoblación de Treg.

Otro resultado relevante de este estudio está relacionado con los cambios observados en la subpoblación de células B productoras de IgE, ya que son células efectoras en la respuesta alérgica, y por tanto, dianas de la modulación durante la IT específica (620). Aunque no existen muchos estudios enfocados en esta subpoblación linfocitaria, nuestro grupo ha demostrado recientemente su papel en los cambios inmunológicos producidos durante la ITSC con Dp (*Dermatophagoides pteronissinus*) relacionándolo con la mejoría clínica de los pacientes (621). Los resultados de este trabajo confirman los datos obtenidos en el trabajo previo e indican que los beneficios de la ITSL-Pru p 3 pueden estar relacionados con la reducción de los niveles de células plasmáticas productoras de IgE, lo cual se correlaciona con los resultados encontrados a nivel humoral de disminución de los valores de IgE a Pru p 3.

Actualmente existen escasos estudios que analicen en profundidad los cambios inmunológicos subyacentes a la ITSL. Los que hay publicados son referentes en su mayoría a la edad pediátrica para avellana, leche de vaca, kiwi, melocotón y cacahuete, sin ahondar en los cambios a nivel celular. Tan sólo en el estudio de Kim y cols. (554) se estudiaron las modificaciones en las células Treg tras 12 meses de ITSL, sin observar diferencias en este sentido.

Este estudio representa el primer análisis de la ITSL en pacientes con reacciones sistémicas moderadas y graves, en lugar de con SAO, lo que nos ha permitido investigar los efectos terapéuticos y los cambios inmunológicos en este tipo de pacientes. Sin embargo, hubo algunas limitaciones en este estudio. Aunque se ha analizado la eficacia a la IT, tanto en pacientes tratados como no tratados, utilizando PPDCCP, no se incluyó un grupo control placebo explícitamente, sino que se comparan con el grupo de pacientes que no recibieron la intervención. Además, el tiempo de seguimiento de 12 meses, aunque mayor a lo descrito hasta el momento actual, podría limitar la extensión de los cambios clínicos e inmunológicos inducidos por la ITSL-Pru p 3, tales como en las poblaciones celulares y reactividad del basófilo. Los estudios futuros podrían incluir un mayor número de pacientes, un grupo control placebo verdadero, y un seguimiento de los resultados clínicos y cambios inmunológicos durante un intervalo de tiempo más prolongado.

En resumen, este trabajo demuestra que la ITSL-Pru p 3 produce una clara mejoría clínica en pacientes alérgicos a melocotón con síntomas sistémicos, y que ésta se ve acompañada por unos cambios a nivel inmunológico que modulan la respuesta desde un patrón Th2 con producción de IgE a Pru p 3 y linfocitos Th2, Th9, y B productoras de IgE, hacia uno Th1 con disminución de los anticuerpos y de las células anteriores, acompañado de un aumento de linfocitos Th1, NK inflamatorios, y Treg. Dichos cambios se pueden utilizar como biomarcadores candidatos para la determinación de la evolución de los pacientes durante la IT específica en fases tempranas de la misma.

CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. El tratamiento con inmunoterapia sublingual específica de Pru p 3 ha demostrado ser eficaz en más del 90% de los pacientes con alergia demostrada a melocotón.
2. La eficacia de la inmunoterapia se ha demostrado mediante la disminución significativa en el tamaño de la papula en la prueba intraepidérmica para LTP en el grupo de pacientes tratados, así como un incremento significativo en la cantidad de melocotón tolerado en el 91% de los pacientes tratados.
3. Se ha demostrado una mejoría en la tolerancia a cacahuete en pacientes alérgicos a cacahuete, observándose una disminución significativa en el tamaño de la papula en la prueba intraepidérmica y un incremento en la tolerancia a cacahuete en más del 60% de los pacientes.
4. Aunque se han observado reacciones durante la administración de la IT, más del 90% de las mismas fueron locales, se resolvieron de forma espontánea o con antihistamínicos orales, y se produjeron en la fase de inicio. Ningún paciente sufrió una reacción sistémica tras la administración de la ITSL-Pru p 3.
6. Se detectó un descenso significativo en los niveles de IgE específica para Pru p 3 así como incremento significativo en los niveles de IgG4 a partir del sexto mes de IT, que se mantuvo hasta el primer año de tratamiento en el total de pacientes que lo recibieron.
7. En el total de pacientes tratados, se detectaron cambios en los niveles de IgE e IgG específica para Ara h 9 de forma paralela a los cambios obtenidos para Pru p 3.
8. Se observó un aumento significativo en la reactividad en el test de activación de basófilos para Pru p 3 y Ara h 9 en el grupo de pacientes tratados sin correlación con la mejoría clínica de los pacientes.
9. Existe un descenso significativo en la maduración de las CD frente a Pru p 3 en el grupo de pacientes tratados, desde el primer mes de tratamiento, y se mantiene durante el primer año.
10. Respecto a los cambios en las subpoblaciones linfocitarias, se produjo un descenso de las subpoblaciones linfocíticas Th2, Th9, y de las células plasmáticas productoras de IgE frente a Pru p 3, y un incremento de las subpoblaciones linfocíticas Th1, NK^{Bright}, y Treg, lo que indica un cambio hacia el patrón Th1/Treg, y frente a Pru p 3.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

11. El cambio en el patrón de respuesta desde Th2 hacia un patrón Th1/Treg es inducido de forma específica por la LTP del melocotón, Pru p 3, tal y como fue demostrado en los estudios de proliferación.

Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FRUTAS:

Especie	Nombre del alérgeno	Identificación bioquímica	PM(Kda)	Familia
<i>Ananas comosus</i>	Ana c 1	Profilina	15	Bromeliacea
Piña	Ana c 2	Bromelina	22.8	
<i>Cucumis melo</i>	Cuc m 1	Proteasa	66	Cucurbitacea
Melón	Cuc m 2	Profilina	14	
	Cuc m 3	PR-1	16	
<i>Actinidia chinensis</i>	Act c 5	Kiwelina	28	Actinidiaceae
Kiwi amarillo	Act c 8	Homólogo Bet v 1	17	
	Act c 10	LTP	10	
<i>Actinidia deliciosa</i>	Act d 1	Cisteina proteasa	30	Actinidiaceae
Kiwi verde	Act d 2	Taumatina	24	
	Act d 3		40	
	Act d 4	Fitocistatina	11	
	Act d 5	Kiwelina	26	
	Act d 6	(-)pectinametilsterasa	18	
	Act d 7	Peptina metilesterasa	50	
	Act d 8	Homólogo Bet v 1	17	
	Act d 9	Profilina	14	
	Act d 10	LTP	10	
	Act d 11	Homólogo Bet v 1	17	
	Act d 12	11S legumina	50	
	Act d 13	2S albúmina	11	
<i>Punica granatum</i>	Pun g 1	LTP	9	Myrtaceae
Granada				
<i>Fragaria ananassa</i>	Fra a 1	Homólogo Bet v 1	18	Rosaceae
Fresa	Fra a 3	LTP	10	
	Fra a 4	Profilina	13	
<i>Malus domestica</i>	Mal d 1	Homólogo Bet v 1		Rosaceae
Manzana	Mal d 2	Taumatina	23	
	Mal d 3	LTP	9	
	Mal d 4	Profilina	14.4	
<i>Morus nigra</i>	Mor n 3	LTP	10	Lauraceae
Mora				
<i>Prunus armeniaca</i>	Pru ar 1	Homólogo Bet v 1		Rosaceae
Albaricoque	Pru ar 3	LTP	9	

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

<i>Prunus avium</i>	Pru av 1	Homólogo Bet v 1	9	Rosaceae
Cereza	Pru av 2	Taumatina	30	
	Pru av 3	LTP	10	
	Pru av 4	Profilina	15	
<i>Prunus domestica</i>	Pru d 3	LTP	9	Rosaceae
Ciruela				
<i>Prunus 230ipogea</i>	Pru p 1	Homólogo Bet v 1	18	Rosaceae
Melocotón	Pru p 2	Taumatina	25-28	
	Pru p 3	LTP	9	
	Pru p 4	Profilina	14	
	Pru p 7	Proteína reguladora giberelina		
<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 1	Homólogo Bet v 1	18	Rosaceae
Pera	Pyr c 3	LTP		
	Pyr c 4	Profilina	14	
	Pyr c 5	Isoflavona-reductasa	35.5	
<i>Persea americana</i>	Pers a 1	Endoquitinasa	32	Lauraceae
Aguacate				
<i>Citrus limón</i>	Cit l 3	LTP	9	Rutaceae
Limón				
<i>Citrus reticulata</i>	Cit r 3	LTP	9	Rutaceae
Mandarina				
<i>Citrus sinensis</i>	Cit s 1	Germina	23	Rutaceae
Naranja	Cit s 2	Profilina	14	
	Cit s 3	LTP	9	
<i>Litchi sinensis</i>	Lit c 1	Profilina	15	Sapindaceae
Lichi				
<i>Vitis 230ipogea230</i>	Vit v 1	LTP	9	Vitaceae
Uva				
<i>Musa acuminata</i>	Mus a 1	Profilina	15	Musaceae
Plátano	Mus a 2	Quitinasa clase I	33	
	Mus a 3	LTP	9	
	Mus a 4	Taumatina	20	
	Mus a 5	β -1,3 glucanasa	30	

Anexo 1. Tabla clasificación y función de los alérgenos descritos en frutas

FRUTOS SECOS:

Especie	Nombre del alérgeno	Identificación bioquímica	PM(Kda)	Familia
<i>Anacardium occidentale</i>	Ana o 1	7S vicilina	50	Anacardiaceae
Anacardo	Ana o 2	11S legumina	55	
	Ana o 3	2S albumina		
<i>Arachis hiipogea</i>	Ara h 1	7S Vicilina	64	Leguminoseae
Cacahuete	Ara h 2	2S albúmina	17	
	Ara h 3	11S legumina	60,37	
	Ara h 4	Glicinina		
	Ara h 5	Profilina	15	
	Ara h 6	2S albúmina	15	
	Ara h 7	2S albúmina	15	
	Ara h 8	Homólogo Bet v 1	17	
	Ara h 9	LTP	9,8	
	Ara h 10	Oleosina	16	
	Ara h 11	Oleosina	14	
	Ara h 12	Defensina		
	Ara h 13	Defensina		
	Ara h 14	Oleosina	17,5	
	Ara h 15	Oleosina	17	
	Ara h 16	2ns-LTP	8,5	
	Ara h 17	LTP	11	
<i>Bertolletia excelsa</i>	Ber e 1	2S albúmina	9	Lecythidaceae
Nuez de Brasil	Ber e 2	11S legumina	29	
<i>Castanea sativa</i>	Cas s 1	Homólogo Bet v 1	22	Fagaceae
Castaña	Cas s 5	Quitinasa		
	Cas s 8	LTP	12-13	
	Cas s 9		17	
<i>Corylus avellana</i>	Cor a 1	Homólogo Bet v 1	17	Corylaceae
Avellana	Cor a 2	Profilina	14	
	Cor a 8	LTP	9	
	Cor a 9	11S legumina	40	
	Cor a 11	7S vicilina	48	
	Cor a 12	oleosina	17	
	Cor a 13	oleosina	14-16	

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

	Cor a 14	2s Albumina		
<i>Junglans nigra</i>	Jug n 1	2S albúmina		Juglandaceae
Nuez negra	Jug n 2	7s Vicilina		
<i>Junglan regia</i>	Jug r 1	2S albumina	15-16	Juglandaceae
Nuez de nogal	Jug r 2	7s Vicilina	44	
	Jug r 3	LTP	9	
	Jug r 4	11S legumina		
<i>Pistacia vera</i>	Pis v 1	2S albúmina		Anacardiaceae
Pistacho	Pis v 2	11S legumina	32	
	Pis v 3	7S vicilina		
	Pis v 4	Superóxido dismutasa	25.7	
	Pis v 5	11S legumina	36	
<i>Prunis dulcis</i>	Pru du 3	LTP	9	Rosaceae
Almendra	Pru du 4	Profilina	14	
	Pru du 5	Proteína ribosómica ácida	10	
	Pru du 6	11S legumina	360	
<i>Carya illinoensis</i>	Car i 1	2S albúmina	16	Juglandaeae
Nuez pecana	Car i 4	11S legumina	55.4	
<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 3	LTP	9	Compositae
Pipas de girasol				

Anexo 2. Tabla clasificación y función de los alérgenos descritos en frutos secos.

HORTALIZAS:

Especie	Nombre del alérgeno	Identificación bioquímica	PM(Kda)	Familia
<i>Apium graveolens</i>	Api g 1	Homólogo Bet v 1	15	Umbelliferae
Apio	Api g 2	LTP	9	
	Api g 3	Cloroplasto		
	Api g 4	Profilina	14	
	Api g 5	FAD	58	
	Api g 6	LTP	7	
<i>Asparagus officinalis</i>	Aspa o 1	LTP	9	Liliaceae
Espárrago				
<i>Brassica rapa</i>	Bra r 1	2S albúmina	10-14	Cruciferae
Nabo	Bra r 2	homólogo proheveína	25	
<i>Capsicum annuum</i>	Cap a 1	Taumatina	23	Solanaceae
Pimiento	Cap a 2	Profilina	14	
<i>Daucus carota</i>	Dau c 1	Homólogo Bet v 1	16	Umbelliferae
Zanahoria	Dau c 4	Profilina	14	
	Dau c 5	Isoflavonarreductasa		
<i>Lactuca sativa</i>	Lac s 1	LTP	9	Compositae
Lechuga				
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sola l 1	Profilina	14	Solanaceae
Tomate	Sola l 2	β -fructururanosidasa	50	
	Sola l 3	LTP	6	
	Sola l 4	Homólogo Bet v 1		
	Sola l 6	2nsLTP	7	
	Sola l 7	LTP	12.5	
<i>Solanum tuberosum</i>	Sola t 1	Patatina	43	Solanaceae
Patata	Sola t 2	(-)catepsina D	21	
	Sola t 3	(-) cisteinproteasa	21	
	Sola t 4	(-) serinproteasa	16	
<i>Manihot esculenta</i>	Man e 5	Rica en ácido glutámico	30	Euphorbiaceae
Yuca (mandiola)				
<i>Brassica oleracea</i>	Bra o 3	LTP	9	Cruciferae
Repollo				

Anexo 3. Tabla clasificación y función de los alérgenos descritos en hortalizas.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

LEGUMBRES:

Especie	Nombre del alérgeno	Identificación bioquímica	PM(Kda)	Familia
<i>Lens culinaris</i>	Len c 1	Vicilina	47	Fabaceae
Lentejas	Len c 2	Proteína de semilla biotilada	66	
	Len c 3	LTP	9	
<i>Glycine max</i>	Gly m 1	Proteína HF	7	Fabaceae
Soja	Gly m 2	PR	8	
	Gly m 3	Profilina	14	
	Gly m 4	Homólogo Bet v 1	17	
	Gly m 5	7S vicilina		
	Gly m 6	11S legumina (glicinina)	76	
	Gly m 7	Proteína de semilla biotilada		
	Gly m 8	2S albúmina		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pha v 3	LTP	9	Fabaceae
Judía verde				
<i>Lupinus angustifolius</i>	Lup an 1	7S vicilina (conglutina)	55-61	Fabaceae
Altramuz				
<i>Pisum sativum</i>	Pis s 1	Vicilina	44	Fabaceae
Guisante	Pis s 2	Convicilina	63	
<i>Arachis hypogea</i>				Fabaceae
Cacahuete				

Anexo 4. Tabla clasificación y función de los alérgenos descritos en legumbres.

PIEL:

A. Área con erupción eritematosa (%):

B. Prurito:

- 0** Inexistente
- 1** Leve, rascado ocasional
- 2** Moderado, rascado durante más de 2 minutos cada vez
- 3** Grave, rascado continuo intenso, excoiación

C. Urticaria/Angioedema:

- 0** Ausente
- 1** Leve (<3 habones, o leve edema de labio)
- 2** Moderado, (<10 habones o edema de labio o cara significativa)
- 3** Grave, generalizado

D. Erupción:

- 0** Inexistente
- 1** Leve, algunas áreas de eritema fugaz
- 2** Moderado, áreas de eritema
- 3** Grave, eritema generalizado grave (>50%)

VÍA RESPIRATORIA SUPERIOR:

A. Estornudos/picor:

- 0** Ausentes
- 1** Leve, raros/ocasional
- 2** Moderado, <10/intermitente rascado de la nariz, ojos.
- 3** Grave, rinorrea persistente, >10 estornudos/rascado continuo de nariz, ojos/inflamación periocular

VÍA RESPIRATORIA INFERIOR:

A. Sibilantes:

- 0** Ausentes
- 1** Leve, algunos sibilantes espiratorios
- 2** Moderado, sibilantes espiratorios e inspiratorios
- 3** Grave, audibles sin fonendo, uso de musculatura accesoria

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

B. Laringe:

- 0** Inexistente
- 1** Leve, >3 episodios de tos o carraspeo, o sensación de nudo faríngeo o dolor
- 2** Moderado, disfonía tos seca frecuente
- 3** Grave, estridor

GASTROINTESTINAL:

A. Subjetivos:

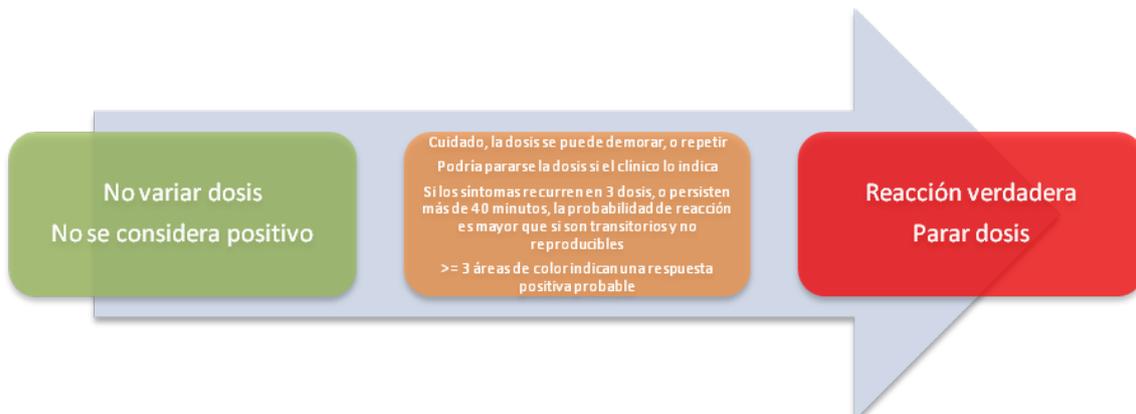
- 0** Ausentes
- 1** Leve, náuseas, dolor abdominal, prurito orofaríngeo
- 2** Moderado, frecuente sensación de dolor abdominal y náusea con actividad normal
- 3** Grave, notable sensación de dolor abdominal que disminuye la actividad

B. Objetivos:

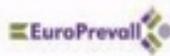
- 0** Inexistente
- 1** Leve, 1 episodios de emesis o diarrea
- 2** Moderado, 2-3 episodios de emesis o diarrea, o 1 de cada
- 3** Grave, >3 episodios de emesis o diarrea, o 2 de cada

CARDIOVASCULAR/NEUROLÓGICO:

- 0** Frecuencia cardíaca y Tensión arterial normal a basal
- 1** Leve, taquicardia o sensación subjetiva de debilidad o mareo
- 2** Moderado, descenso en tensión arterial >20% basal o alteración significativa del estado mental
- 3** Grave, colapso cardiovascular, signos de fracaso circulatorio (inconsciencia)



Anexo 5. Escala clasificación de síntomas para finalizar provocación con alimentos.



CASE RECORD FORM
Food CRF
Cross-sectional study WP 1.3

Centre:

Subject code:
Subject initials:
Investigator initials:

Date (dd/mm/yyyy):

FOOD:

Fill a separate form for each food reported to give symptoms in 6 and 7 of the background CRF

Recall: include only the food if involved in immediate adverse reactions appearing in the 2 hours following ingestion.

1. Number of adverse reactions:

2. Type of complaints (of the most severe reaction induced by the food intake):

A. Complaints of the oral cavity Oral allergy syndrome**B. Skin complaints** Urticaria Angioedema Erythema / flushing Itching**C. Digestive complaints** Nausea Vomiting Stomach pain Cramps Diarrhoea Dysphagia**D. Airway complaints** Asthma (dyspnea, wheezing, cough, chest tightness) Rhinitis Dysphonia Tightness of the throat**E. Eye complaints** Conjunctivitis**F. Cardiovascular complaints** Cardiac arrhythmia Myocardial ischaemia (angina, infarction) Hypotension**G. Neurologic complaints** Disorientation, confusion Dizziness Seizures Incontinence Loss of consciousness

3. Age at onset of the first adverse reaction : (years for patients > 3 y)

..... (months for children up to 3 y)

4. Time elapsed since the last reaction (until today):

 Up to 1 month > 1- 8 months >8-12 months > 12-24 months >2-5 years >5 years Unknown

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

5. Interval between the food intake and the onset of symptoms:

- < 5 minutes 5- 15 minutes >15- 30 minutes
 >30 – 60 minutes > 1- 2 hours > 2 hours
 Unknown

6. Medication received to control the reaction:

- Yes: antihistamines corticosteroids adrenaline inhaled betamimetics
 intravenous fluids vasopressors oxygen mechanical ventilation
 unknown
 No
 Unknown

7. Emergency care assistance and/or hospitalization after a reaction:

- Yes
 No
 Unknown

8. The complaints after eating the food increase in a specific period of the year:

Yes, in:

January	May	September
February	June	October
March	July	November
April	August	December

- No
 Unknown

9. Minimum intake to trigger the first complaint:

- A bite / a swallow
 ¼ helping
 ½ helping
 One normal helping (according to patient's age)
 Unknown

10. The reaction described is induced by the food:

- Raw/fresh
 Processed
- juice: Yes No Unknown
 jam: Yes No Unknown
 canned: Yes No Unknown
 boiled: Yes No Unknown
 steamed: Yes No Unknown
 baked: Yes No Unknown
 fried: Yes No Unknown
 roasted: Yes No Unknown
 dried: Yes No Unknown
 fermented: Yes No Unknown
 other * (specify):
- Unknown

* For babies with immediate adverse reactions to cow's milk formula, write "formula" at other

11. The skin contact with this food ALSO induces adverse reactions:

- Yes; type:
- Contact urticaria
 Dermatitis
 Rhinitis/conjunctivitis
 Bronchoaspm (dyspnea, cough, wheezing, chest tightness)
 Anaphylaxis
- No
 Unknown

12. The inhalation of this food (odour, aerosols, vapours, powder) ALSO induces adverse reactions:

- Yes; type:
 - Rhinitis/conjunctivitis
 - Bronchospasm (dyspnea, cough, wheezing, chest tightness)
 - Skin reactions (itching, erythema and/or urticaria)
 - Anaphylaxis
- No
- Unknown

Anexo 6. Cuestionario tipo de anamnesis dirigida de alergia alimentos por el grupo Europeo (EuroPrevall)

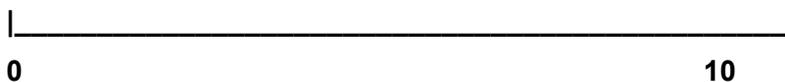
ESCALA VISUAL ANALÓGICA (EVA).

Escala visual analógica para los síntomas del síndrome de alergia oral durante test de provocación controlada a doble ciego con Pru p3

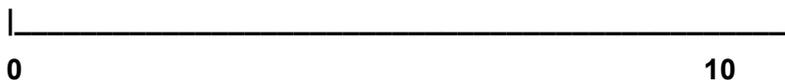
- Por favor indique la intensidad de sus síntomas **en este momento** realizando una marca vertical en la escala de abajo.

- El "0" corresponde a "no existencia de síntomas", y "10" corresponde al máximo de intensidad de los síntomas.

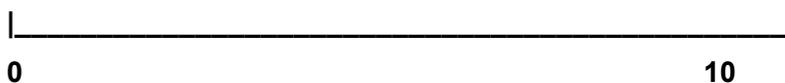
01. Picor labios/oral



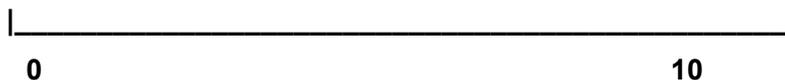
02. Picor en la lengua



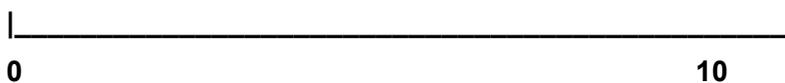
03. Picor de garganta/oidos



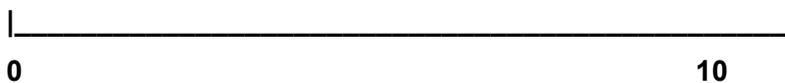
04. Inflamación de labios (sensación)



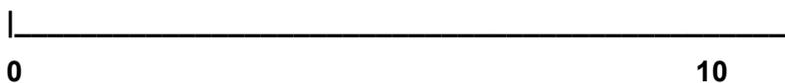
05. Inflamación de la lengua (sensación)



06. Opresión faríngea



07. Dificultad para tragar



Anexo 7. Escala visual analógica de síntomas de alergia oral para valorar provocación con alimentos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Evaluación de los mecanismos inmunológicos implicados en la eficacia de la inmunoterapia sublingual con LTP (Pru p3) en pacientes alérgicos a LTPs de alimentos mono o polisensibilizados.

Investigador principal:

Información

Usted ha sido diagnosticado por su alergólogo de alergia a alimentos debido a sensibilización a proteínas específicas de alimentos llamadas “LTPs”. Por esta razón, y debido a que usted cumple los criterios de inclusión, su médico le invita a participar en este estudio.

En el servicio de Alergología del Hospital Regional Universitario Carlos Haya se está desarrollando un estudio que pretende mejorar los conocimientos acerca de los mecanismos implicados en la respuesta a la inmunoterapia sublingual con LTP del melocotón (Pru p 3), principal causa de alergia alimentaria en nuestro medio.

Durante el período de la vacunación se precisa la obtención de muestras de sangre periódicas para llevar a cabo estas investigaciones. Además el paciente será revisado para controlar su enfermedad y evolución.

En el estudio no pueden participar los pacientes de especial riesgo, que ofrezcan dificultades para su exploración y/o que tengan otras patologías como enfermedades autoinmunes, cutáneas y hematológicas.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Carlos Haya.

Tratamiento de la alergia a alimentos

Las reacciones alérgicas a frutas son la alergia alimentaria más frecuente en población adulta. Las LTPs son unas proteínas muy estables que son la causa de las reacciones más graves y se encuentran presente en múltiples frutas y verduras.

Hasta ahora no existe ningún tratamiento específico para la alergia a alimentos excepto la evitación del alimento. Sin embargo, recientemente se ha probado el uso de una inmunoterapia específica con una proteína del tipo LPT (llamada “Pru p3”) que ha mostrado mejoría en la tolerancia a los alimentos que contienen LTPs con un buen perfil de seguridad. La inmunoterapia actúa sobre la causa de la alergia que usted padece ya que está compuesta de aquella sustancia a la cual usted está sensibilizado y que es el origen, cada vez que usted se expone a ella, de los síntomas que padece.

La inmunoterapia sublingual consiste en la administración en la mucosa sublingual de dosis crecientes de un extracto que contiene proteínas que le producen los síntomas para alcanzar una dosis máxima y crear tolerancia a estas proteínas. En este estudio la dosis de iniciación será realizada en cuatro visitas consecutivas en el hospital. En cada visita usted recibirá diversas dosis sublinguales, y una vez que la dosis máxima ha sido alcanzada usted continuará el tratamiento en casa con dosis diarias (una o tres veces al día) durante un año. Posteriormente, su médico decidirá si usted continúa con el tratamiento o no. Este tratamiento ha sido probado en un ensayo

clínico previo mostrándose buena tolerancia al mismo y los resultados han sido publicados. Sin embargo, en ocasiones pueden existir algunos efectos adversos como sucede con cualquier otro medicamento. Estas reacciones son en su mayoría locales, con prurito o hinchazón leve de la mucosa oral siendo normalmente pasajeras y habitualmente desaparecen sin tratamiento. Más raramente puede haber reacciones sistémicas, y que suelen consistir en la reproducción de sus síntomas alérgicos (urticaria o hinchazón), y en los casos más graves, aunque también muy infrecuentes, puede aparecer una reacción anafiláctica (mareo, hipotensión, pérdida de conocimiento...). Para minimizar el riesgo de aparición de reacciones, la fase de iniciación será realizada en el hospital y permanecer en observación una hora tras la administración de las dosis. Posteriormente siga los consejos que le de su médico. Un estudio previo realizado con el mismo producto utilizado en este estudio ha permitido determinar la utilidad de este tratamiento ya que ha mostrado un incremento modesto en la tolerancia a la proteína a la cual los sujetos eran alérgicos ("Pru p3"). Sin embargo hacen falta más estudios que aporten información sobre las dosis más adecuadas que produzcan un mayor efecto beneficioso con buena tolerancia al producto. Esta es la razón por la cual le ofrecemos participar en este estudio. Es un trabajo de carácter científico y no tiene fines lucrativos. Su participación en él va a contribuir a mejorar el conocimiento del proceso que se analiza y que requiere la evaluación de un número grande de individuos para poder validarla.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente: Durante este proyecto se realizarán una serie de procedimientos diagnósticos, la mayoría de las cuales no conllevan ningún riesgo (tales como prick test, test de embarazo, etc). Se realizarán test de tolerancia a Pru p3 con un protocolo controlado para determinar el grado de sensibilización que usted tiene a Pru p3 y para poder monitorizar de forma objetiva la respuesta al tratamiento. Se realiza administrando cantidades crecientes de la proteína y realizando una monitorización precisa de los síntomas, que en la mayoría de los casos son muy leves (prurito o hinchazón leve de la mucosa oral), y en el caso improbable de que ocurra una reacción sistémica (mareo, hipotensión, urticaria) se le administrará inmediatamente el tratamiento adecuado para controlar la reacción.

Habrán 6 visitas al hospital, además de la fase de inducción de tolerancia a la inmunoterapia que se realizará en 4 días consecutivos en el hospital. Se tomarán muestras de sangre en algunas de estas visitas. Los riesgos a los que se exponen los pacientes son mínimos, ya que la extracción de sangre es una práctica habitual que no suele producir complicaciones, salvo ligeros hematomas, cuando se realiza por el personal técnico adecuado.

Participación Voluntaria

Es importante que sepa que su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y que puede abandonar el mismo en cualquier momento, sin que ello implique el más mínimo deterioro en la relación médico-paciente ni perjuicio alguno en el tratamiento que debe recibir.

Confidencialidad

Se mantendrá absoluta Confidencialidad respecto a su identificación y a la enfermedad que padece. Una vez que firme el consentimiento informado, autoriza al personal involucrado a acceder a los datos de su historia clínica, de forma que, de acuerdo a la legislación vigente (Ley Orgánica 15/1999, 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal), se pueda verificar la exactitud de todos los datos contenidos en el estudio concernientes a usted.

Cualquier nueva información referente al producto investigado o procedimientos del estudio, que aparezca durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Los médicos e investigadores que participan en el estudio no cobran ningún tipo de remuneración especial por trabajar en el presente estudio

Es importante que lea esta hoja con detenimiento y que formule cuantas preguntas desee, con el fin de poder aclarar todas las dudas respecto al estudio y su participación en el mismo. No es necesario que conteste inmediatamente. Piénselo, consulte con quien considere oportuno y, cuando esté seguro de su decisión hágaselo saber al médico que le ha explicado el estudio. En caso de nuevas dudas puede ponerse en contacto con

Nombre del médico:

Número de teléfono:

Dirección (Hospital):

Si usted tiene más preguntas sobre sus derechos como participante en el estudio hágaselo saber a su médico del estudio o si desea ponerse en contacto con un tercero imparcial, puede contactar también con el representante de pacientes de su hospital.

Se le entregará una copia firmada y fechada de este documento.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: Evaluación de los mecanismos inmunológicos implicados en la eficacia de la inmunoterapia sublingual con LTP (Pru p3) en pacientes alérgicos a LTPs de alimentos mono o polisensibilizados.

Yo,..... (*Nombre y apellidos*)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: (*Nombre del Investigador*)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º cuando quiera

2º sin tener que dar explicaciones

3º sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

**Firma del participante
el participante)**

Fecha (escrita a mano por

**Nombre y firma del investigador
el investigador)**

Fecha (escrita a mano por

Anexo 8. Consentimiento informado para participar en el estudio de ITSL-Pru p 3

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

1. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco, a la dirección de correo electrónico: **biohbanco.hch.sspa@juntadeandalucia.es**

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará a su asistencia sanitaria.

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

En el apartado dedicado al consentimiento (2.3), usted podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se protege su identidad con un código anonimizada (eliminándose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada.

1.1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento (2.3).

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante procedimientos médico-quirúrgicos asistenciales, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas, porque lo que donaría sería el excedente que quedara de dichas muestras.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas de las que usted será debidamente informado.

2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

3. Disponibilidad de la información sobre la muestra

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis posteriores.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

6. Derecho de revocación del consentimiento

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si solicita que sus muestras sean anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

2.1. DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del Donante:

DNI / NIE:

NUHSA:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE del/de la representante legal:

2.2. PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre del profesional	Fecha	Firma
------------------------------------	-------	-------

2.3. CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas y he podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Manifiesto mi voluntad de donar mis muestras biológicas y permitir el tratamiento de los datos asociados a la misma al Biobanco, procedente de:

Excedente del procedimiento diagnóstico, terapéutico o quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido.....

La obtención de forma expresa.....

.....

.....

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratadas de la siguiente forma:

Codificada (serán identificadas por un código, desligándose de la información que me identifica, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi
identidad).

Deseo establecer **restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea
utilizada en.....

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: **SI** **NO**

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de
hacerlo.....

Autorizo a ser informado/a de los datos genéticos y otros de carácter personal
obtenidos durante la investigación relativa a mi salud

Marque lo que proceda: **SI** **NO**

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En a de de

El/La Donante

El/La Representante legal (sólo
en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

3. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.....
revoco el consentimiento informado otorgado con fecha (especificar fecha aproximada y/o procedimiento:.....
.....
.....)

y solicito:

- La eliminación de las muestras donadas
- La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....
.....

En a de de

El/La Donante

El/La Representante legal (sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Anexo 9. Consentimiento informado escrito para toma de muestras de biobanco.

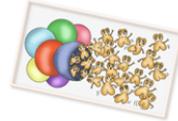




Documento de información. Menores de 14 años

Almacenamiento de muestras en biobanco para investigación biomédica

Para poder entender cómo funciona nuestro cuerpo y por qué nos ponemos enfermos, los investigadores tienen que estudiar nuestros genes, que son como un libro de instrucciones que está en todas nuestras células. Tu participación es importante porque para esta investigación hace falta comparar el libro de instrucciones (los genes) de muchas personas.



Por eso te vamos a proponer que nos des algunas de tus células para que los investigadores puedan estudiarlas.



Como pasa con las cosas que son más importantes de verdad, no le podemos poner un precio a "tu regalo". Por eso no os pagamos con dinero, pero hay otra recompensa mayor, que es contribuir a que la ciencia avance y a que en el futuro otras personas se puedan curar gracias a que tú y otros como tú hayan querido colaborar. Ahora te vamos a contar cómo los científicos van a estudiar tus células.

Puedes hacernos todas las preguntas que quieras mientras te lo explicamos. Nos gustará mucho contestar.

Como vas a venir al hospital a que te hagamos un análisis, podemos utilizar esas células para nuestra investigación.

Tus células son muy importantes para nosotros y por eso se guardará en un lugar especial que se llama biobanco. Bio significa "vida" y "banco" almacén.



En el biobanco se encargarán de que no se estropeen y también de prestarlas para las investigaciones más interesantes.



Existe una lista de todos los biobancos que hay en España que se puede consultar por internet. Si las células se trasladan, en esa lista se explica dónde encontrarlas.

Los investigadores que van a analizar a tus células no necesitan conocer quién eres. Pero los encargados del biobanco guardaremos tu nombre y otros datos en nuestros ordenadores.



Así podremos seguir el rastro de tus células y sabremos a quién se las hemos prestado. Cuando tú también quieras saberlo, pregúntaselo a tus padres y nosotros se lo diremos. Pero cuando tengas 18 años, tú mismo podrás llamarnos o escribirnos.

Si los investigadores encuentran algo que fuera importante para ti, llamaremos a tus padres, se lo contaremos y hablará/n contigo.

También podremos hacer que tus células ya no se utilicen más si tú lo decides cualquier día y por cualquier razón. Nos lo pueden pedir tus padres, o tú cuando cumplas 18 años.

Muchas gracias
por tu participación

Firma de los padres o representante legal

Firma de la persona que ha informado

Fecha y Lugar: En _____ a _____ de _____ del _____.

Biobanco: _____ Teléfono: _____ Email: _____

Dirección: _____

El copyright de estas imágenes corresponde a la empresa "23 pares ilustraciones científicas S. L.", quedando prohibida su reproducción y/o uso en cualquier forma que no sea el propio de este consentimiento informado, sin el consentimiento expreso de "23 pares ilustraciones científicas S. L."

Anexo 10. Consentimiento informado escrito para menores de 18 años para toma de muestras de biobanco.



Episodio	Intervalo	Edad	Alimento	Vía	Cantidad	Cutáneo	RC	Asma	Anafilaxia	Ejercicio	SAO	Fármacos/Obs
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	
						- Urticaria - AE - Prurito - Eritema	- Ocular - Nasal - Macroglosia - Disfonia	- Tos - Disnea	- MEG - Pérdida conciencia - hTA - Esfínteres		- Prurito - Vómitos - Diarreas	

Anexo 11. Tabla de recogida de datos para episodios presentados de alergia alimentos



Hospital San Juan de Dios
Plaza del Hospital Civil. 29009 Málaga
Jefe de Servicio: Dr. Blanca Gómez

DATOS DEL PACIENTE:

NOMBRE..... NHC.....
APELLIDOS..... TELÉFONO.....
EDAD..... DIRECCIÓN.....
SEXO..... LOCALIDAD.....
PROFESIÓN.....
FECHA.....

EXPLORACIÓN FÍSICA GENERAL:

ESTADO NUTRITIVO:
PIEL:
BOCA:
FARINGE:
TÓRAX:
• ACR:
• TA:
• PC:
ABDOMEN:
ALTURA: PESO: IMC:

ANTECEDENTES PERSONALES:

- 1. ATOPIA
 - ASMA: SI NO
 - i. POLEN ÁCAROS HONGOS EPITELIOS LÁTEX
PLUMAS
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 - 2. ¿Sigue tratamiento?.....
 - 3. ¿Inmunoterapia? SI NO
 - Marca:.....
 - Laboratorio:.....



Composición:.....
 DM:.....
 Fin de la Inmunoterapia:.....

- RINITIS: SI NO
 - i. POLEN ÁCAROS HONGOS EPITELIOS LÁTEX
 PLUMAS
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 - 2. ¿Sigue tratamiento?.....
 - 3. ¿Inmunoterapia? SI NO
 - Marca:.....
 - Laboratorio:.....
 - Composición:.....
 - DM:.....
 - Fin de la Inmunoterapia:.....
- Dermatitis atópica: SI NO
 - i. Número de brotes/año.....
 - ii. Año de comienzo.....
 - iii. Último brote.....
 - iv. Localización de lesiones.....
 - v. Tratamiento.....

2. OTROS ANTECEDENTES DE HIPERSENSIBILIDAD:

- ¿Anafilaxia veneno de himenópteros? SÍ NO
 - i. APIS POLISTES VÉSPULA VESPA GABRO
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 - 2. ¿Sigue tratamiento?.....
 - 3. ¿Inmunoterapia? SI NO
 - Marca:.....
 - Laboratorio:.....
 - Composición:.....
 - DM:.....
 - Fin de la Inmunoterapia:.....
- ¿Anafilaxia no filiada? SI NO

Efecto de la inmunoterapia específica con melocotón.

1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Sigue tratamiento?.....
- ¿Urticaria? SI NO
 - i. AGUDA CRÓNICA AGUDA RECIDIVANTE
 1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Sigue tratamiento?.....
 3. ¿Sabe la causa?
 - ¿RAM? SI NO
 1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Con qué?.....
 3. ¿Está diagnosticado por un alergólogo?.....
 4. ¿Qué tolera?.....
 - ¿Neumonitis por hipersensibilidad? SÍ NO
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Con qué?.....
 3. ¿Está diagnosticado por un especialista?.....
 - ¿Enfermedades autoinmunes? SI NO
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Con qué?.....
 3. ¿Está diagnosticado por un especialista?.....
 4. ¿Sigue tratamiento?.....
 - ¿Enteropatías? SI NO
 - 1. ¿Desde cuándo?.....
 2. ¿Con qué?.....
 3. ¿Está diagnosticado por un especialista?.....
 4. ¿Sigue tratamiento?.....

ANTECEDENTES FAMILIARES: ANEXO 1 (COMPLETAR UNO POR FAMILIAR DE PRIMER GRADO DEL PACIENTE).

Anexo 12. Formulario de recogida de datos en anamnesis dirigida de alergia alimentos

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA:

1. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *Journal of immunology*. 2004;172(5):3252-9.
2. Gupta R, Sheikh A, Strachan D, Anderson HR. Increasing hospital admissions for systemic allergic disorders in England: analysis of national admissions data. *BMJ*. 2003;327(7424):1142-3.
3. Ninan TK, G. R. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years art. *BMJ*. 1992;304:873-5.
4. Allergens and the genetics of allergy. [press release]. New York: The antigens1975.
5. Fernández Rivas M BB, Rodríguez R, Salcedo G. . Alérgenos Alimentarios. *Tratado de Alergología SEAIC*. 807-231992.
6. Panel N-SE, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(6 Suppl):S1-58.
7. Foods AAoAalCoArt. Adverse reactions to foods / American Academy of Allergy and Immunology, Committee on Adverse Reactions to Foods [and] National Institute of Allergy and Infectious Diseases: [Bethesda, Md.] : U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health,; 1984. 84-2442 p.
8. Brujnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindselev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D, et al. Adverse reactions to food. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. Allergy*. 1995;50(8):623-35.
9. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813-24.
10. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(5):832-6.
11. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(2):228-38.
12. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. International archives of allergy and immunology*. 1994;105(3):224-33.
13. Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(2):414-20.
14. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO - ARIA - GA(2)LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *The World Allergy Organization journal*. 2013;6(1):17.
15. Yunginger JW, Sweeney KG, Sturmer WQ, Giannandrea LA, Teigland JD, Bray M, et al. Fatal food-induced anaphylaxis. *Jama*. 1988;260(10):1450-2.

16. Land MH, Kim EH, Burks AW. Oral desensitization for food hypersensitivity. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2011;31(2):367-76, xi.
17. Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*. 1987;79(5):683-8.
18. Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet*. 1994;343(8906):1127-30.
19. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(2):357-67.
20. Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(2 Pt 1):452-6.
21. Pumphrey RS, Gowland MH. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(4):1018-9.
22. de Silva IL, Mehr SS, Tey D, Tang ML. Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review. *Allergy*. 2008;63(8):1071-6.
23. Avery NJ, King RM, Knight S, Hourihane JO. Assessment of quality of life in children with peanut allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2003;14(5):378-82.
24. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(4):1016-8.
25. Radauer C, Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(3):518-25.
26. Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Beyer K, Defernez M, Sperrin M, Mackie AR, et al. How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(4):964-71.
27. Moneret-Vautrin DA, Morisset M. Adult food allergy. *Current allergy and asthma reports*. 2005;5(1):80-5.
28. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(3):638-46.
29. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(5):1210-8 e4.
30. Venter C, Pereira B, Voigt K, Grundy J, Clayton CB, Higgins B, et al. Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy*. 2008;63(3):354-9.
31. Osterballe M, Mortz CG, Hansen TK, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2009;20(7):686-92.
32. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(4):798-806 e13.
33. Dalal I, Binson I, Reifen R, Amitai Z, Shohat T, Rahmani S, et al. Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy*. 2002;57(4):362-5.
34. Alergia a los alimentos. En: *Alergológica. Factores epidemiológicos* cnysmdleareEaMSEodA. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las

- enfermedades alérgicas en España. . In: Abelló SAe, editor. *Alergológica: Sociedad Española de Alergología e Inmunología*; 1995. p. 165-83.
35. Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 1995;6(1):39-43.
 36. Iikura Y, Imai Y, Imai T, Akasawa A, Fujita K, Hoshiyama K, et al. Frequency of immediate-type food allergy in children in Japan. *International archives of allergy and immunology*. 1999;118(2-4):251-2.
 37. Sampson HA. Update on food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(5):805-19; quiz 20.
 38. Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, et al. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy*. 2001;56(12):1172-9.
 39. Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T, et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy*. 2004;59(3):338-45.
 40. Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, Ibanez MD, Cuesta-Herranz J, van Odijk J, et al. Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):603-7.
 41. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *Journal of immunology*. 2000;164(11):5844-9.
 42. Grimshaw KE, King RM, Nordlee JA, Hefle SL, Warner JO, Hourihane JO. Presentation of allergen in different food preparations affects the nature of the allergic reaction--a case series. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(11):1581-5.
 43. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *The New England journal of medicine*. 2015;372(9):803-13.
 44. Fernandez Rivas M. Food allergy in *Alergologica-2005*. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2009;19 Suppl 2:37-44.
 45. Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of dermatological science*. 2007;47(2):109-17.
 46. Tan TH, Ellis JA, Saffery R, Allen KJ. The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2012;42(1):20-9.
 47. Tsai HJ, Kumar R, Pongracic J, Liu X, Story R, Yu Y, et al. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(1):101-9.
 48. Karmaus W, Botezan C. Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *Journal of epidemiology and community health*. 2002;56(3):209-17.
 49. Flohr C, Nagel G, Weinmayr G, Kleiner A, Strachan DP, Williams HC, et al. Lack of evidence for a protective effect of prolonged breastfeeding on childhood eczema: lessons from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Two. *The British journal of dermatology*. 2011;165(6):1280-9.
 50. Lack G. Update on risk factors for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(5):1187-97.
 51. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1331-6.

52. Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1301-8; quiz 9-10.
53. Gell PGH CR. *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications, ed, Oxford. 1963.
54. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Current opinion in immunology*. 2006;18(6):738-44.
55. Berin MC, Shreffler WG. T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1311-20; quiz 21-2.
56. Chatila TA, Li N, Garcia-Lloret M, Kim HJ, Nel AE. T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(4):812-23; quiz 24-5.
57. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(10):761-71.
58. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*. 2008;9(12):1347-55.
59. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbj H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*. 2008;9(12):1341-6.
60. Gomez E, Fernandez TD, Dona I, Rondon C, Campo P, Gomez F, et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(10):1542-53.
61. Sato A, Iwasaki A. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(12):1333-8.
62. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*. 2001;2(4):361-7.
63. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Corrigendum: Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2015;16(3):326.
64. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):701-21 e1-70.
65. Uersin C, Beerli RR, Bauer M, Manolova V, Dietmeier K, Buser RB, et al. Mechanisms of allergen-specific desensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(2):375-83.
66. Shamji MH, James LK, Durham SR. Serum immunologic markers for monitoring allergen-specific immunotherapy. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2011;31(2):311-23, x.
67. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011;66(6):725-32.
68. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annual review of immunology*. 2005;23:749-86.
69. Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi PD. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International immunopharmacology*. 2012;13(4):432-9.
70. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(1 Pt 1):99-107.

71. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):3-12; quiz 3.
72. HG. W. Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of the hens egg. *J Infect Dis*. 1911;8:147-53.
73. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(10):1389-97.
74. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 2014;5:461.
75. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2004;5(10):987-95.
76. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(7):1628-42.
77. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(10):1379-88.
78. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews*. 2001;182:68-79.
79. Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy*. 2006;61(1):3-14.
80. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*. 1995;155(3):1151-64.
81. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Clinical immunology*. 2005;115(1):10-8.
82. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(2):295-302.
83. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *European journal of immunology*. 2004;34(3):613-22.
84. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21(4):503-13.
85. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):R75-81.
86. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*. 2001;27(1):20-1.
87. Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1705-17.
88. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1701-11.
89. Kashyap M, Thornton AM, Norton SK, Barnstein B, Macey M, Brenzovich J, et al. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *Journal of immunology*. 2008;180(4):2039-43.
90. Ring S, Schafer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *European journal of immunology*. 2006;36(11):2981-92.

91. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008;63(11):1455-63.
92. Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European journal of immunology*. 2009;39(9):2331-6.
93. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology*. 2011;23(6):424-30.
94. Burks AW, Laubach S, Jones SM. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1344-50.
95. Fulgoni VL, 3rd. Current protein intake in America: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(5):1554S-7S.
96. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy. *Chemical immunology and allergy*. 2006;91:159-73.
97. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends in cell biology*. 1992;2(6):170-4.
98. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunological reviews*. 2005;206:232-59.
99. Telemo E, Korotkova M, Hanson LA. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2003;90(6 Suppl 3):28-33.
100. Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, Perdue MH. The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *Journal of immunology*. 1998;161(5):2561-6.
101. Scott H, Solheim BG, Brandtzaeg P, Thorsby E. HLA-DR-like antigens in the epithelium of the human small intestine. *Scandinavian journal of immunology*. 1980;12(1):77-82.
102. Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology*. 1974;66(5):987-92.
103. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual review of medicine*. 2009;60:261-77.
104. Asero R. Peach-induced contact urticaria is associated with lipid transfer protein sensitization. *International archives of allergy and immunology*. 2011;154(4):345-8.
105. Burks W. Skin manifestations of food allergy. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 3):1617-24.
106. Kobza Black A, Greaves MW, Champion RH, Pye RJ. The urticarias 1990. *The British journal of dermatology*. 1991;124(1):100-8.
107. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *The New England journal of medicine*. 2011;365(14):1315-27.
108. Atherton DJ, Sewell M, Soothill JF, Wells RS, Chilvers CE. A double-blind controlled crossover trial of an antigen-avoidance diet in atopic eczema. *Lancet*. 1978;1(8061):401-3.
109. Jansen JJ, Kardinaal AF, Huijbers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BP, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1994;93(2):446-56.
110. Kotaniemi-Syrjanen A, Reijonen TM, Romppanen J, Korhonen K, Savolainen K, Korppi M. Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in wheezing infants: the risk for asthma in later childhood. *Pediatrics*. 2003;111(3):e255-61.



111. James JM. Respiratory manifestations of food allergy. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 3):1625-30.
112. Bock SA, Atkins FM. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *The Journal of pediatrics*. 1990;117(4):561-7.
113. Ibanez MD, Martinez M, Munoz MC, Rosales JM, Alonso E, Laso MT. [Assessment of diagnostic tests in food allergy]. *Allergologia et immunopathologia*. 1996;24 Suppl 1:6-17.
114. James JM, Crespo JF. Allergic reactions to foods by inhalation. *Current allergy and asthma reports*. 2007;7(3):167-74.
115. Gomez-Casado C, Garrido-Arandia M, Pereira C, Catarino M, Parro V, Armentia A, et al. Component-resolved diagnosis of wheat flour allergy in baker's asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(2):480-3.
116. James JM. Common respiratory manifestations of food allergy: a critical focus on otitis media. *Current allergy and asthma reports*. 2004;4(4):294-301.
117. Salvatore S, Vandenplas Y. Gastroesophageal reflux and cow milk allergy: is there a link? *Pediatrics*. 2002;110(5):972-84.
118. Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome: case presentations and management lessons. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):149-56.
119. Machida HM, Catto Smith AG, Gall DG, Trevenen C, Scott RB. Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1994;19(1):22-6.
120. Hill DJ, Hudson IL, Sheffield LJ, Shelton MJ, Menahem S, Hosking CS. A low allergen diet is a significant intervention in infantile colic: results of a community-based study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;96(6 Pt 1):886-92.
121. Chehade M, Aceves SS. Food allergy and eosinophilic esophagitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2010;10(3):231-7.
122. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(1):3-20 e6; quiz 1-2.
123. Amlot PL, Kemeny DM, Zachary C, Parkes P, Lessof MH. Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clinical allergy*. 1987;17(1):33-42.
124. Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer GF, Ebner C. Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *European journal of immunology*. 2003;33(12):3303-10.
125. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Annals of allergy*. 1988;61(6 Pt 2):47-52.
126. Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Bindslev-Jensen C. The clinical relevance of sensitization to pollen-related fruits and vegetables in unselected pollen-sensitized adults. *Allergy*. 2005;60(2):218-25.
127. Valenta R, Kraft D. Type 1 allergic reactions to plant-derived food: a consequence of primary sensitization to pollen allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1996;97(4):893-5.
128. Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;100(6 Pt 1):728-33.
129. Gomez F, Aranda A, Campo P, Diaz-Perales A, Blanca-Lopez N, Perkins J, et al. High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms. *PloS one*. 2014;9(9):e107304.

130. Asero R. Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1999;83(5):377-83.
131. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(2):371-6.
132. Schwartz LB, Atkins PC, Bradford TR, Fleekop P, Shalit M, Zweiman B. Release of tryptase together with histamine during the immediate cutaneous response to allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1987;80(6):850-5.
133. Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(1):144-9.
134. Tole JW, Lieberman P. Biphasic anaphylaxis: review of incidence, clinical predictors, and observation recommendations. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2007;27(2):309-26, viii.
135. Lieberman P. Biphasic anaphylactic reactions. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2005;95(3):217-26; quiz 26, 58.
136. Muraro A, Dubois AE, DunnGalvin A, Hourihane JO, de Jong NW, Meyer R, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Food allergy health-related quality of life measures. *Allergy*. 2014;69(7):845-53.
137. Brown SG. Cardiovascular aspects of anaphylaxis: implications for treatment and diagnosis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005;5(4):359-64.
138. Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S470-5.
139. Pascal M, Munoz-Cano R, Reina Z, Palacin A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2012;42(10):1529-39.
140. Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy*. 2014;69(10):1397-404.
141. Shakib F, Ghaemmaghami AM, Sewell HF. The molecular basis of allergenicity. *Trends in immunology*. 2008;29(12):633-42.
142. Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;55(2):235-46.
143. Pomes A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy*. 2002;57(8):673-9.
144. Flicker S, Vrtala S, Steinberger P, Vangelista L, Bufe A, Petersen A, et al. A human monoclonal IgE antibody defines a highly allergenic fragment of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5: molecular, immunological, and structural characterization of the epitope-containing domain. *Journal of immunology*. 2000;165(7):3849-59.
145. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *International archives of allergy and immunology*. 2002;129(3):189-97.
146. Lombardero M, Quirce S, Duffort O, Barber D, Carpizo J, Chamorro MJ, et al. Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1992;89(4):884-94.

147. Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Niederberger V, Twardosz A, et al. Calcium-binding allergens: from plants to man. *International archives of allergy and immunology*. 1998;117(3):160-6.
148. Virtanen T. Lipocalin allergens. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:48-51.
149. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(1 Pt 1):27-36.
150. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(5 Pt 1):717-28.
151. Sampson HA. Immunological approaches to the treatment of food allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2001;12 Suppl 14:91-6.
152. Sampson HA. Food allergy: when mucosal immunity goes wrong. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):139-41.
153. Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Mancebo E, de Durana DA. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2008;19(8):675-81.
154. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, de las Heras M, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, et al. Peach allergy pattern: experience in 70 patients. *Allergy*. 1998;53(1):78-82.
155. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;6(1):1.
156. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(5):821-30; quiz 31.
157. Tordesillas L, Pacios LF, Palacin A, Cuesta-Herranz J, Madero M, Diaz-Perales A. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(1):174-81.
158. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;964:47-68.
159. Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wuthrich 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 pollen profilin Bet v 2. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2001;756(1-2):315-25.
160. Lopez-Torrejon G, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Sanchez-Jimenez M, Alvarez J, Rodriguez J, et al. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(8):1065-72.
161. Rodriguez-Perez R, Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Salcedo G. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2. *Allergy*. 2003;58(7):635-40.
162. Willeroider M, Fuchs H, Ballmer-Weber BK, Focke M, Susani M, Thalhamer J, et al. Cloning and molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Cap a 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *International archives of allergy and immunology*. 2003;131(4):245-55.
163. Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Winter MG, Akkerdaas JH, Summers C, Lebens A, et al. Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms. *Clinical and translational allergy*. 2014;4(1):4.

164. Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ, Shewry PR. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of molecular biology*. 1985;183(3):499-502.
165. Baar A, Pahr S, Constantin C, Scheibelhofer S, Thalhamer J, Giavi S, et al. Molecular and immunological characterization of Tri a 36, a low molecular weight glutenin, as a novel major wheat food allergen. *Journal of immunology*. 2012;189(6):3018-25.
166. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Kalkkinen N, Reunala T. Rye gamma-70 and gamma-35 secalins and barley gamma-3 hordein cross-react with omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(3):466-73.
167. Monsalve RI, Villalba M, Rico M, Shewry PR, Rodriguez R. The 2S albumin proteins. In: ENC M, Shewry PR, editors. *Plant food allergens*. Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 42-56.
168. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature biotechnology*. 1996;14(10):1269-73.
169. Sirvent S, Palomares O, Cuesta-Herranz J, Villalba M, Rodriguez R. Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(23):6011-8.
170. Onaderra M, Monsalve RI, Mancheno JM, Villalba M, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG, et al. Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994;225(2):609-15.
171. Rundqvist L, Tengell T, Zdunek J, Bjorn E, Schleucher J, Alcocer MJ, et al. Solution structure, copper binding and backbone dynamics of recombinant Ber e 1-the major allergen from Brazil nut. *PloS one*. 2012;7(10):e46435.
172. Teuber SS, Dandekar AM, Peterson WR, Sellers CL. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;101(6 Pt 1):807-14.
173. Sharma GM, Irsigler A, Dhanarajan P, Ayuso R, Bardina L, Sampson HA, et al. Cloning and characterization of 2S albumin, Car i 1, a major allergen in pecan. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(8):4130-9.
174. Robotham JM, Wang F, Seamon V, Teuber SS, Sathe SK, Sampson HA, et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(6):1284-90.
175. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Conti A, Ansaloni R, et al. Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(6 Pt 1):1021-7.
176. Eller E, Mortz CG, Bindslev-Jensen C. Cor a 14 is the superior serological marker for hazelnut allergy in children, independent of concomitant peanut allergy. *Allergy*. 2015.
177. Chen X, Wang Q, El-Mezayen R, Zhuang Y, Dreskin SC. Ara h 2 and Ara h 6 have similar allergenic activity and are substantially redundant. *International archives of allergy and immunology*. 2013;160(3):251-8.
178. Koppelman SJ, de Jong GA, Laaper-Ertmann M, Peeters KA, Knulst AC, Hefle SL, et al. Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(4):490-7.
179. Puumalainen TJ, Poikonen S, Kotovuori A, Vaali K, Kalkkinen N, Reunala T, et al. Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(2):426-32.

180. Dunwell JM. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 1998;15:1-32.
181. Woo EJ, Dunwell JM, Goodenough PW, Marvier AC, Pickersgill RW. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature structural biology*. 2000;7(11):1036-40.
182. Poltl G, Ahrazem O, Paschinger K, Ibanez MD, Salcedo G, Wilson IB. Molecular and immunological characterization of the glycosylated orange allergen Cit s 1. *Glycobiology*. 2007;17(2):220-30.
183. Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;107(6):1077-81.
184. Chung SY, Butts CL, Maleki SJ, Champagne ET. Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(15):4273-7.
185. Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant cell*. 1995;7(7):945-56.
186. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(3):517-23.
187. Wallowitz M, Peterson WR, Uratsu S, Comstock SS, Dandekar AM, Teuber SS. Jug r 4, a legumin group food allergen from walnut (*Juglans regia* Cv. Chandler). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(21):8369-75.
188. Robotham JM, Xia L, Willison LN, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. Characterization of a cashew allergen, 11S globulin (Ana o 2), conformational epitope. *Molecular immunology*. 2010;47(9):1830-8.
189. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(4):535-42.
190. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):14-23; quiz 4.
191. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):930-5.
192. Asensio T, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Somoza ML, Rodriguez J, et al. Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(4):896-9.
193. Wagner S, Breiteneder H. Hevea brasiliensis latex allergens: current panel and clinical relevance. *International archives of allergy and immunology*. 2005;136(1):90-7.
194. Aleksic I, Popovic M, Dimitrijevic R, Andjelkovic U, Vassilopoulou E, Sinanotis A, et al. Molecular and immunological characterization of Mus a 5 allergen from banana fruit. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56(3):446-53.
195. Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, et al. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;101(4 Pt 1):531-7.
196. Cuesta-Herranz J, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, De las Heras M, Duran C, et al. Identification of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(6):827-33.
197. Salcedo G, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R. The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2001;1(2):177-83.
198. Sowka S, Hsieh LS, Krebitz M, Akasawa A, Martin BM, Starrett D, et al. Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of

avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(43):28091-7.

199. Sanchez-Monge R, Blanco C, Diaz-Perales A, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C, et al. Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29(5):673-80.

200. Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, et al. Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(1):127-33.

201. Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(5):1002-7.

202. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*. 1991;280 (Pt 2):309-16.

203. Marzban G, Herndl A, Kolarich D, Maghuly F, Mansfeld A, Hemmer W, et al. Identification of four IgE-reactive proteins in raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(12):1497-506.

204. Breiteneder H. Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*. 2004;59(5):479-81.

205. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(2):481-8.

206. Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M, et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *Journal of molecular biology*. 2003;329(4):721-30.

207. Palacin A, Rodriguez J, Blanco C, Lopez-Torrejon G, Sanchez-Monge R, Varela J, et al. Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(7):1220-8.

208. Inschlag C, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Scheiner O, et al. Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *International archives of allergy and immunology*. 1998;116(1):22-8.

209. Palacin A, Tordesillas L, Gamboa P, Sanchez-Monge R, Cuesta-Herranz J, Sanz ML, et al. Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(9):1422-30.

210. James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW. Wheat alpha-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;99(2):239-44.

211. Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G. Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1997;27(10):1130-7.

212. Seppala U, Majamaa H, Turjanmaa K, Helin J, Reunala T, Kalkkinen N, et al. Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors. *Allergy*. 2001;56(7):619-26.

213. Burks AW, Cockrell G, Connaughton C, Guin J, Allen W, Helm RM. Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *International archives of allergy and immunology*. 1994;105(2):143-9.
214. Moroz LA, Yang WH. Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *The New England journal of medicine*. 1980;302(20):1126-8.
215. Gu X, Beardslee T, Zeece M, Sarath G, Markwell J. Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *International archives of allergy and immunology*. 2001;126(3):218-25.
216. Tordesillas L, Gomez-Casado C, Garrido-Arandia M, Murua-Garcia A, Palacin A, Varela J, et al. Transport of Pru p 3 across gastrointestinal epithelium - an essential step towards the induction of food allergy? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2013;43(12):1374-83.
217. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of molecular biology*. 2003;325(1):123-33.
218. Mogensen JE, Ferreras M, Wimmer R, Petersen SV, Enghild JJ, Otzen DE. The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes. *Biochemistry*. 2007;46(11):3356-65.
219. Hauser M, Asam C, Himly M, Palazzo P, Voltolini S, Montanari C, et al. Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(12):1804-14.
220. Uberti F, Penas E, Manzoni Y, di Lorenzo C, Ballabio C, Fiocchi A, et al. Molecular characterization of allergens in raw and processed kiwifruit. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(2):139-44.
221. Bolhaar ST, Ree R, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Zuidmeer L. Allergy to jackfruit: a novel example of Bet v 1-related food allergy. *Allergy*. 2004;59(11):1187-92.
222. Bolhaar ST, van Ree R, Ma Y, Bruijnzeel-Koomen CA, Vieths S, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Severe allergy to sharon fruit caused by birch pollen. *International archives of allergy and immunology*. 2005;136(1):45-52.
223. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;214(2):538-51.
224. Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy*. 1982;37(6):437-43.
225. Hoffmann-Sommergruber K, Demoly P, Cramer R, Breiteneder H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, et al. IgE reactivity to Api g 1, a major celery allergen, in a Central European population is based on primary sensitization by Bet v 1. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(2 Pt 1):478-84.
226. Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R, Wuthrich B, Pichler C, Fritsch R, et al. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1996;26(10):1161-70.
227. Kader JC. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1996;47:627-54.
228. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(6):781-91.

229. Breiteneder H, Mills C. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005;5(3):275-9.
230. Douliez JP, Michon T, Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1467(1):65-72.
231. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(9):1336-41.
232. Richard C, Leduc V, Battais F. Plant lipid transfer proteins (LTPs): biochemical aspect in panallergen--structural and functional features, and allergenicity. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2007;39(3):76-84.
233. Fernandez-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29(9):1239-47.
234. Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sanchez-Monge R, Salcedo G, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(4):789-95.
235. Borges JP, Jauneau A, Brule C, Culerrier R, Barre A, Didier A, et al. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2006;44(10):535-42.
236. van Ree R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):910-3.
237. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, et al. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International archives of allergy and immunology*. 2001;124(1-3):67-9.
238. Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S, et al. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy*. 2005;60(10):1262-8.
239. Garino C, Zitelli F, Travaglia F, Colsson JD, Cravotto G, Arlorio M. Evaluation of the impact of sequential microwave/ultrasound processing on the IgE binding properties of Pru p 3 in treated peach juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(35):8755-62.
240. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, et al. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(4):775-83.
241. Vassilopoulou E, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Rigby NR, Mills EN, et al. Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome. *International archives of allergy and immunology*. 2007;143(2):92-102.
242. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(26):7738-41.
243. Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(2):493-7.

244. Garcia-Casado G, Crespo JF, Rodriguez J, Salcedo G. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(4):647-9.
245. Lindorff-Larsen K, Winther JR. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS letters*. 2001;488(3):145-8.
246. Zuidmeer L, van Ree R. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2007;7(3):269-73.
247. Kitajima M, Lee HC, Nakayama T, Ziegler SF. TSLP enhances the function of helper type 2 cells. *European journal of immunology*. 2011;41(7):1862-71.
248. Schulten V, Nagl B, Scala E, Bernardi ML, Mari A, Ciardiello MA, et al. Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein from peach, dominates the immune response to its homolog in hazelnut. *Allergy*. 2011;66(8):1005-13.
249. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature immunology*. 2010;11(4):289-93.
250. Garcia BE, Lombardero M, Echechipia S, Olaguibel JM, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, et al. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(2):291-5.
251. Palacin A, Quirce S, Armentia A, Fernandez-Nieto M, Pacios LF, Asensio T, et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(5):1132-8.
252. He FJ, Nowson CA, MacGregor GA. Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet*. 2006;367(9507):320-6.
253. Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(1):133-40.
254. Andersen MB, Hall S, Dragsted LO. Identification of european allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;41(1):4-19.
255. Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, Wangorsch A, Haustein D, Vieths S. IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *International archives of allergy and immunology*. 2002;128(2):105-14.
256. Asero R, Antonicelli L, Arena A, Bommarito L, Caruso B, Crivellaro M, et al. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(4):547-55.
257. Rodrigues-Alves R, Lopez A, Pereira-Santos MC, Lopes-Silva S, Spinola-Santos A, Costa C, et al. Clinical, anamnestic and serological features of peach allergy in portugal. *International archives of allergy and immunology*. 2009;149(1):65-73.
258. Ballmer-Weber BK. Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy*. 2002;57(10):873-5.
259. Stumvoll S, Westritschnig K, Lidholm J, Spitzauer S, Colombo P, Duro G, et al. Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(5):974-9.
260. Fernandez Rivas M. [Cross-reactivity between fruit and vegetables]. *Allergologia et immunopathologia*. 2003;31(3):141-6.
261. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Figueredo E, Igea JM, Umpierrez A, De-Las-Heras M. Allergy to plant-derived fresh foods in a birch- and ragweed-free area. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(10):1411-6.

262. Alvarado MI, Perez M. Study of food allergy in the Spanish population. *Allergologia et immunopathologia*. 2006;34(5):185-93.
263. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antepará I, Colas C, Davila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(11):1764-73.
264. San Miguel-Moncin M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, et al. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*. 2003;58(6):511-7.
265. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(6):881-90.
266. Du Toit G, Lack G. Optimizing the diagnosis of peanut and tree nut allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(8):1019-22.
267. Maloney JM, Rudengren M, Ahlstedt S, Bock SA, Sampson HA. The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;122(1):145-51.
268. Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Meshier D, Maleki SJ, Fisher HR, et al. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;122(5):984-91.
269. Ball H, Luyt D, Bravin K, Kirk K. Single nut or total nut avoidance in nut allergic children: outcome of nut challenges to guide exclusion diets. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(8):808-12.
270. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69(1):62-75.
271. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Godbold JH, Sampson HA. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(6):1322-6.
272. Nicolaou N, Murray C, Belgrave D, Poorafshar M, Simpson A, Custovic A. Quantification of specific IgE to whole peanut extract and peanut components in prediction of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):684-5.
273. Krause S, Reese G, Randow S, Zennaro D, Quarantino D, Palazzo P, et al. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(4):771-8 e5.
274. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(5):1134-41, 41 e1-3.
275. Sicherer SH, Sampson HA. Peanut and tree nut allergy. *Current opinion in pediatrics*. 2000;12(6):567-73.
276. Enrique E, Pineda F, Malek T, Bartra J, Basagana M, Tella R, et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(5):1073-9.
277. Amat Par P, Sanosa Valls J, Lluch Perez M, Malet Casajuana A, Garcia Calderon PA. Dried fruit hypersensitivity and its correlation with pollen allergy. *Allergologia et immunopathologia*. 1990;18(1):27-34.
278. Hernandez J, Garcia Selles FJ, Pagan JA, Negro JM. [Immediate hypersensitivity to fruits and vegetables and pollenosis]. *Allergologia et immunopathologia*. 1985;13(3):197-211.

279. Rodríguez J, Crespo JF, Lopez-Rubio A, De La Cruz-Bertolo J, Ferrando-Vivas P, Vives R, et al. Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(1 Pt 1):183-9.
280. Scala E, Till SJ, Asero R, Abeni D, Guerra EC, Pirrotta L, et al. Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy*. 2015;70(8):933-43.
281. De Swert LF, Gadisseur R, Sjolander S, Raes M, Leus J, Van Hoeyveld E. Secondary soy allergy in children with birch pollen allergy may cause both chronic and acute symptoms. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2012;23(2):117-23.
282. Ibanez MD, Martinez M, Sanchez JJ, Fernandez-Caldas E. [Legume cross-reactivity]. *Allergologia et immunopathologia*. 2003;31(3):151-61.
283. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, Jarvinen KM, Sicherer SH, Sampson HA, et al. Clinical features and resolution of food protein-induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(2):382-9.
284. Bar-El Dadon S, Pascual CY, Eshel D, Teper-Bamnolker P, Ibanez MD, Reifen R. Vicilin and the basic subunit of legumin are putative chickpea allergens. *Food chemistry*. 2013;138(1):13-8.
285. Verma AK, Kumar S, Das M, Dwivedi PD. A comprehensive review of legume allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013;45(1):30-46.
286. Bernhisel-Broadbent J, Taylor S, Sampson HA. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1989;84(5 Pt 1):701-9.
287. Martinez San Ireneo M, Ibanez MD, Fernandez-Caldas E, Carnes J. In vitro and in vivo cross-reactivity studies of legume allergy in a Mediterranean population. *International archives of allergy and immunology*. 2008;147(3):222-30.
288. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *The Journal of pediatrics*. 1985;107(5):669-75.
289. Akkerdaas J, Finkina EI, Balandin SV, Santos Magadan S, Knulst A, Fernandez-Rivas M, et al. Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: a novel legume allergen. *International archives of allergy and immunology*. 2012;157(1):51-7.
290. Sanchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, Fernandez-Crespo J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(5):955-61.
291. Lopez-Torrejon G, Salcedo G, Martin-Esteban M, Diaz-Perales A, Pascual CY, Sanchez-Monge R. Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(6):1208-15.
292. Senna GE, Crivellaro M, Bonadonna P, Dama A, Mezzelani P, Passalacqua G. Pizza, an unsuspected source of soybean allergen exposure. *Allergy*. 1998;53(11):1106-7.
293. Beliveau S, Gaudreault P, Goulet L, Primeau MN, Marcoux D. Type I hypersensitivity in an asthmatic child allergic to peanuts: was soy lecithin to blame? *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2008;12(1):27-30.
294. Wensing M, Knulst AC, Piersma S, O'Kane F, Knol EF, Koppelman SJ. Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(2):420-4.
295. Shaw J, Roberts G, Grimshaw K, White S, Hourihane J. Lupin allergy in peanut-allergic children and teenagers. *Allergy*. 2008;63(3):370-3.
296. Figueroa J, Blanco C, Dumpierrez AG, Almeida L, Ortega N, Castillo R, et al. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. *Allergy*. 2005;60(1):48-55.

297. Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodriguez R, Cuesta-Herranz J, Palomares O. Improvement of mustard (*Sinapis alba*) allergy diagnosis and management by linking clinical features and component-resolved approaches. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(5):1304-7.
298. Caballero T, San-Martin MS, Padial MA, Contreras J, Cabanas R, Barranco P, et al. Clinical characteristics of patients with mustard hypersensitivity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2002;89(2):166-71.
299. Monreal P, Botey J, Pena M, Marin A, Eseverri JL. Mustard allergy. Two anaphylactic reactions to ingestion of mustard sauce. *Annals of allergy*. 1992;69(4):317-20.
300. Panconesi E, Sertoli A, Fabbri P, Giorgini S, Spallanzani P. Anaphylactic shock from mustard after ingestion of pizza. *Contact dermatitis*. 1980;6(4):294-5.
301. Leon F, Rodriguez M, Cuevas M. The major allergen of linseed. *Allergy*. 2002;57(10):968.
302. Berez B, Clare Mills EN, Paradi I, Lang F, Tamas L, Shewry PR, et al. Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*. 2013;138(4):2374-81.
303. Caubet JC, Hofer MF, Eigenmann PA, Wassenberg J. Snack seeds allergy in children. *Allergy*. 2010;65(1):136-7.
304. Lavine E, Ben-Shoshan M. Allergy to sunflower seed and sunflower butter as proposed vehicle for sensitization. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;11(1):2.
305. Yagami A. Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy*. 2010;65(10):1340-1.
306. Sicherer SH, Furlong TJ, DeSimone J, Sampson HA. Self-reported allergic reactions to peanut on commercial airliners. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(1):186-9.
307. Aaronov D, Tasher D, Levine A, Somekh E, Serour F, Dalal I. Natural history of food allergy in infants and children in Israel. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2008;101(6):637-40.
308. Burney PG, Potts J, Kummeling I, Mills EN, Clausen M, Dubakiene R, et al. The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy*. 2014;69(3):365-71.
309. Rance F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy*. 2000;55(5):496-500.
310. Sirvent S, Akotenou M, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Rodriguez R, Villalba M, et al. The 11S globulin Sin a 2 from yellow mustard seeds shows IgE cross-reactivity with homologous counterparts from tree nuts and peanut. *Clinical and translational allergy*. 2012;2(1):23.
311. Sirvent S, Palomares O, Vereda A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R. nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(12):1929-36.
312. Asero R. Lipid transfer protein cross-reactivity assessed in vivo and in vitro in the office: pros and cons. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2011;21(2):129-36.
313. Oppel T, Thomas P, Wollenberg A. Cross-sensitization between poppy seed and buckwheat in a food-allergic patient with poppy seed anaphylaxis. *International archives of allergy and immunology*. 2006;140(2):170-3.

314. Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JT, Morisset M, Guerin L, Kanny G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy*. 2006;61(3):349-56.
315. Molina-Infante J, Santolaria S, Sanders DS, Fernandez-Banares F. Systematic review: noncoeliac gluten sensitivity. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;41(9):807-20.
316. Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(11):1712-26.
317. Rodriguez del Rio P, Diaz-Perales A, Sanchez-Garcia S, Escudero C, do Santos P, Catarino M, et al. Oral immunotherapy in children with IgE-mediated wheat allergy: outcome and molecular changes. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2014;24(4):240-8.
318. Palosuo K. Update on wheat hypersensitivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2003;3(3):205-9.
319. Lauriere M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snegaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, et al. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact dermatitis*. 2006;54(5):283-9.
320. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Antigliadin IgE--indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy*. 2000;55(4):386-91.
321. Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonomi S, Iametti S, et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *International archives of allergy and immunology*. 2007;144(1):10-22.
322. Daengsuwan T, Palosuo K, Phankingthongkum S, Visitsunthorn N, Jirapongsananuruk O, Alenius H, et al. IgE antibodies to omega-5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy*. 2005;60(4):506-9.
323. Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, et al. Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(4):461-6.
324. Cardona V, Luengo O, Garriga T, Labrador-Horrillo M, Sala-Cunill A, Izquierdo A, et al. Co-factor-enhanced food allergy. *Allergy*. 2012;67(10):1316-8.
325. Palacin A, Gomez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PLoS one*. 2012;7(12):e50799.
326. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Conti A, Fortunato D, et al. Maize food allergy: lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;395(1):93-102.
327. Pastorello EA, Scibilia J, Farioli L, Primavesi L, Giuffrida MG, Mascheri A, et al. Rice allergy demonstrated by double-blind placebo-controlled food challenge in peach-allergic patients is related to lipid transfer protein reactivity. *International archives of allergy and immunology*. 2013;161(3):265-73.
328. Constantin C, Quirce S, Poorafshar M, Touraev A, Niggemann B, Mari A, et al. Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis. *Allergy*. 2009;64(7):1030-7.
329. Enrique E, Cistero-Bahima A, Bartolome B, Alonso R, San Miguel-Moncin MM, Bartra J, et al. *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy*. 2002;57(4):351-6.
330. Lehrer SB, Reese G, Malo JL, Lahoud C, Leong-Kee S, Goldberg B, et al. Corn allergens: IgE antibody reactivity and cross-reactivity with rice, soy, and peanut. *International archives of allergy and immunology*. 1999;118(2-4):298-9.

331. Morales M, Lopez-Matas MA, Moya R, Carnes J. Cross-reactivity among non-specific lipid-transfer proteins from food and pollen allergenic sources. *Food chemistry*. 2014;165:397-402.
332. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy*. 2002;57(10):900-6.
333. Tordesillas L, Sirvent S, Diaz-Perales A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R, et al. Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(3):291-6.
334. Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2002;32(1):87-92.
335. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, 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. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(4):900-7.
336. Schulten V, Radakovics A, Hartz C, Mari A, Vazquez-Cortes S, Fernandez-Rivas M, et al. Characterization of the allergic T-cell response to Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein in peach. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(1):100-7.
337. Tordesillas L, Pacios LF, Palacin A, Quirce S, Armentia A, Barber D, et al. Molecular basis of allergen cross-reactivity: non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models. *Molecular immunology*. 2009;47(2-3):534-40.
338. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Detection of some safe plant-derived foods for LTP-allergic patients. *International archives of allergy and immunology*. 2007;144(1):57-63.
339. Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D, et al. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(5):790-6.
340. Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M, et al. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(2 Pt 1):371-7.
341. Lopez-Matas MA, Larramendi CH, Huertas AJ, Ferrer A, Moya R, Pagan JA, et al. Tomato nsLTP as an "In Vivo" Diagnostic Tool: Sensitization in a Mediterranean Population. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2015;25(3):196-204.
342. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, et al. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(3 Pt 1):520-6.
343. Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(3 Pt 1):514-9.
344. Ballmer-Weber BK, Scheurer S, Fritsche P, Enrique E, Cistero-Bahima A, Haase T, et al. Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(1):167-73.
345. Primavesi L, Brenna OV, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Influence of cultivar and processing on cherry (*Prunus avium*) allergenicity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(26):9930-5.

346. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, et al. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2001;756(1-2):95-103.
347. Zuidmeer L, Salentijn E, Rivas MF, Mancebo EG, Asero R, Matos CI, et al. The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2006;36(5):666-75.
348. Ramazzina I, Amato S, Passera E, Sforza S, Mistrello G, Berni R, et al. Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). *Gene*. 2012;491(2):173-81.
349. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(2):350-9.
350. Bernardi ML, Giangrieco I, Camardella L, Ferrara R, Palazzo P, Panico MR, et al. Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. *PLoS one*. 2011;6(11):e27856.
351. Le TM, Bublin M, Breiteneder H, Fernandez-Rivas M, Asero R, Ballmer-Weber B, et al. Kiwifruit allergy across Europe: clinical manifestation and IgE recognition patterns to kiwifruit allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(1):164-71.
352. Bolla M, Zenoni S, Scheurer S, Vieths S, San Miguel Moncin Mdel M, Olivieri M, et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) expresses several nsLTP isoforms characterized by different immunoglobulin E-binding properties. *International archives of allergy and immunology*. 2014;164(2):112-21.
353. Zoccatelli G, Dalla Pellegrina C, Consolini M, Fusi M, Sforza S, Aquino G, et al. Isolation and identification of two lipid transfer proteins in pomegranate (*Punica granatum*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(26):11057-62.
354. Ciardiello MA, Palazzo P, Bernardi ML, Carratore V, Giangrieco I, Longo V, et al. Biochemical, immunological and clinical characterization of a cross-reactive nonspecific lipid transfer protein 1 from mulberry. *Allergy*. 2010;65(5):597-605.
355. Ahrazem O, Ibanez MD, Lopez-Torrejón G, Sanchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, et al. Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *International archives of allergy and immunology*. 2005;137(3):201-10.
356. Martín-Pedraza L, Gonzalez M, Gomez F, Blanca-Gomez N, Arandia MG, Rodriguez R, et al. Two non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) from tomato seeds are associated to severe symptoms of tomato-allergic patients. *Molecular nutrition & food research*. 2016.
357. Gadermaier G, Hauser M, Egger M, Ferrara R, Briza P, Santos KS, et al. Sensitization prevalence, antibody cross-reactivity and immunogenic peptide profile of Api g 2, the non-specific lipid transfer protein 1 of celery. *PLoS one*. 2011;6(8):e24150.
358. Vejvar E, Himly M, Briza P, Eichhorn S, Ebner C, Hemmer W, et al. Allergenic relevance of nonspecific lipid transfer proteins 2: Identification and characterization of Api g 6 from celery tuber as representative of a novel IgE-binding protein family. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(11):2061-70.
359. Monzon Ballarin S, Lopez-Matas MA, Saenz Abad D, Perez-Cinto N, Carnes J. Anaphylaxis associated with the ingestion of Goji berries (*Lycium barbarum*). *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2011;21(7):567-70.
360. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Relationship between peach lipid transfer protein specific IgE levels and hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable foods in patients allergic to lipid transfer protein. *Annals of allergy, asthma &*

immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2004;92(2):268-72.

361. Mascheri A, Farioli L, Pravettoni V, Piantanida M, Stafylaraki C, Scibilia J, et al. Hypersensitivity to Tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Peach-Allergic Patients: rPrup 3 and rPrup 1 Are Predictive of Symptom Severity. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2015;25(3):183-9.

362. Pastorello EA, Farioli L, Stafylaraki C, Scibilia J, Giuffrida MG, Mascheri A, et al. Fennel allergy is a lipid-transfer protein (LTP)-related food hypersensitivity associated with peach allergy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(3):740-6.

363. Palacin A, Cumplido J, Figueroa J, Ahrazem O, Sanchez-Monge R, Carrillo T, et al. Cabbage lipid transfer protein Bra o 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(6):1423-9.

364. Armentia A, Garrido-Arandia M, Cubells-Baeza N, Gomez-Casado C, Diaz-Perales A. Bronchial Challenge With Tri a 14 as an Alternative Diagnostic Test for Baker's Asthma. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2015;25(5):352-7.

365. Palacin A, Bartra J, Munoz R, Diaz-Perales A, Valero A, Salcedo G. Anaphylaxis to wheat flour-derived foodstuffs and the lipid transfer protein syndrome: a potential role of wheat lipid transfer protein Tri a 14. *International archives of allergy and immunology*. 2010;152(2):178-83.

366. Beezhold DH, Hickey VL, Kostyal DA, Puhl H, Zuidmeer L, van Ree R, et al. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2003;90(4):439-45.

367. Zoccatelli G, Pokoj S, Foetisch K, Bartra J, Valero A, Del Mar San Miguel-Moncin M, et al. Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3). *Molecular immunology*. 2010;47(7-8):1561-8.

368. Javaloyes G, Goikoetxea MJ, Garcia Nunez I, Aranda A, Sanz ML, Blanca M, et al. Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(6):1432-4 e3.

369. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(10):1403-10.

370. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, et al. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(3):563-70.

371. Schocker F, Luttkopf D, Scheurer S, Petersen A, Cistero-Bahima A, Enrique E, et al. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(1):141-7.

372. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D, et al. Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(4):908-14.

373. Buhler S, Tedeschi T, Faccini A, Garino C, Arlorio M, Dossena A, et al. Isolation and full characterisation of a potentially allergenic lipid transfer protein (LTP) in almond. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2015;32(5):648-56.

374. Nicolaou N, Custovic A. Molecular diagnosis of peanut and legume allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2011;11(3):222-8.
375. Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF, Fernandez-Rivas M, et al. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2010;153(2):182-92.
376. Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, Garcia-Casado G, et al. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(9):1415-21.
377. Sanchez-Lopez J, Tordesillas L, Pascal M, Munoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, et al. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(4):1018-25.
378. Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, et al. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *International archives of allergy and immunology*. 2002;128(2):115-22.
379. Colombo P, Bonura A, Costa M, Izzo V, Passantino R, Locorotondo G, et al. The allergens of *Parietaria*. *International archives of allergy and immunology*. 2003;130(3):173-9.
380. Longo V, Costa MA, Cibella F, Cuttitta G, La Grutta S, Colombo P. Multiple IgE recognition on the major allergen of the *Parietaria* pollen Par j 2. *Molecular immunology*. 2015;63(2):412-9.
381. Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Gonzalez EM, Monsalve RI, Huecas S, et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*. 2002;57 Suppl 71:6-16.
382. Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(4 Pt 1):797-802.
383. Van Winkle RC, Chang C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(3):211-24.
384. Falak R, Sankian M, Tehrani M, Jabbari Azad F, Abolhasani A, Varasteh A. Clinical and laboratory investigation of oral allergy syndrome to grape. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 2012;11(2):147-55.
385. Gandolfo-Cano M, Bartra J, Gonzalez-Mancebo E, Feo-Brito F, Gomez E, Bartolome B, et al. Molecular characterization of contact urticaria in patients with melon allergy. *The British journal of dermatology*. 2014;170(3):651-6.
386. Romano A, Scala E, Rumi G, Gaeta F, Caruso C, Alonzi C, et al. Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2012;42(11):1643-53.
387. Matheu V, Zapatero L, Alcazar M, Martinez-Molero MI, Baeza ML. IgE-mediated reaction to a banana-flavored drug additive. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(6):1202-3.
388. Paulsen E, Andersen KE. Lettuce contact allergy. *Contact dermatitis*. 2016;74(2):67-75.
389. Paulsen E, Christensen LP, Andersen KE. Tomato contact dermatitis. *Contact dermatitis*. 2012;67(6):321-7.
390. van der Walt A, Singh T, Baatjies R, Lopata AL, Jeebhay MF. Work-related allergic respiratory disease and asthma in spice mill workers is associated with inhalant chili pepper and garlic exposures. *Occupational and environmental medicine*. 2013;70(7):446-52.

391. Gamboa PM, Caceres O, Antepará I, Sanchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, et al. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy*. 2007;62(4):408-14.
392. Mari A, Ballmer-Weber BK, Vieths S. The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005;5(3):267-73.
393. Mills EN, Mackie AR, Burney P, Beyer K, Frewer L, Madsen C, et al. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy*. 2007;62(7):717-22.
394. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;95(5 Pt 1):962-9.
395. Bohle B, Zwolfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, et al. Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(1):242-9.
396. Santos A, Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *International archives of allergy and immunology*. 2011;155(3):191-204.
397. Borghesan F, Mistrello G, Amato S, Giuffrida MG, Villalta D, Asero R. Mugwort-fennel-allergy-syndrome associated with sensitization to an allergen homologous to Api g 5. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2013;45(4):130-7.
398. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*. 2006;61(4):461-76.
399. van Ree R, Fernandez-Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden M, Aalberse RC. Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;95(3):726-34.
400. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008;63(11):1550-8.
401. Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Diaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G, et al. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2011;106(5):429-35.
402. M'Raihi L, Charpin D, Pons A, Bongrand P, Vervloet D. Cross-reactivity between latex and banana. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1991;87(1 Pt 1):129-30.
403. Blanco C, Diaz-Perales A, Collada C, Sanchez-Monge R, Aragoncillo C, Castillo R, et al. Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(3 Pt 1):507-13.
404. Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, et al. Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(3 Pt 1):681-7.
405. Ibero M, Castillo MJ, Pineda F. Allergy to cassava: a new allergenic food with cross-reactivity to latex. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2007;17(6):409-12.
406. Blanco C. Latex-fruit syndrome. *Current allergy and asthma reports*. 2003;3(1):47-53.
407. Blanco C, Carrillo T, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Annals of allergy*. 1994;73(4):309-14.
408. Brehler R, Theissen U, Mohr C, Luger T. "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy*. 1997;52(4):404-10.

409. Cabanes N, Igea JM, de la Hoz B, Agustin P, Blanco C, Dominguez J, et al. Latex allergy: Position Paper. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2012;22(5):313-30; quiz follow 30.
410. Beezhold DH, Sussman GL, Liss GM, Chang NS. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1996;26(4):416-22.
411. Yagami T. Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *International archives of allergy and immunology*. 2002;128(4):271-9.
412. Barre A, Culerrier R, Granier C, Selman L, Peumans WJ, Van Damme EJ, et al. Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3beta-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Molecular immunology*. 2009;46(8-9):1595-604.
413. Wagner S, Breiteneder H. The latex-fruit syndrome. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(Pt 6):935-40.
414. Blanco C, Sanchez-Garcia F, Torres-Galvan MJ, Dumpierrez AG, Almeida L, Figueroa J, et al. Genetic basis of the latex-fruit syndrome: association with HLA class II alleles in a Spanish population. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(5):1070-6.
415. Dechamp C, Bessot JC, Pauli G, Deviller P. First report of anaphylactic reaction after fig (*Ficus carica*) ingestion. *Allergy*. 1995;50(6):514-6.
416. Focke M, Hemmer W, Wohrl S, Gotz M, Jarisch R. Cross-reactivity between *Ficus benjamina* latex and fig fruit in patients with clinical fig allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(7):971-7.
417. Enberg RN, Leickly FE, McCullough J, Bailey J, Ownby DR. Watermelon and ragweed share allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1987;79(6):867-75.
418. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindeslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008-25.
419. Allen KJ, Turner PJ, Pawankar R, Taylor S, Sicherer S, Lack G, et al. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework? *The World Allergy Organization journal*. 2014;7(1):10.
420. Muraro A, Hoffmann-Sommergruber K, Holzhauser T, Poulsen LK, Gowland MH, Akdis CA, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy*. 2014;69(11):1464-72.
421. Walker MJ, Burns DT, Elliott CT, Gowland MH, Mills EN. Is food allergen analysis flawed? Health and supply chain risks and a proposed framework to address urgent analytical needs. *The Analyst*. 2016;141(1):24-35.
422. Pele M, Brohee M, Anklam E, Van Hengel AJ. Peanut and hazelnut traces in cookies and chocolates: relationship between analytical results and declaration of food allergens on product labels. *Food additives and contaminants*. 2007;24(12):1334-44.
423. Fernandez-Rivas M, Barreales L, Mackie AR, Fritsche P, Vazquez-Cortes S, Jedrzejczak-Czechowicz M, et al. The EuroPrevall outpatient clinic study on food allergy: background and methodology. *Allergy*. 2015;70(5):576-84.
424. Macchia D, Melioli G, Pravettoni V, Nucera E, Piantanida M, Caminati M, et al. Guidelines for the use and interpretation of diagnostic methods in adult food allergy. *Clinical and molecular allergy : CMA*. 2015;13:27.
425. Roberts G, Lack G. Food allergy--getting more out of your skin prick tests. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(11):1495-8.

426. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):291-307; quiz 8.
427. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy*. 1993;48(7):473-5.
428. Ciccarelli A, Calabro C, Imperatore C, Scala G. Prick by prick induced anaphylaxis in a patient with peanuts and lupine allergy: awareness of risks and role of component resolved diagnosis. *Case reports in medicine*. 2014;2014:892394.
429. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012;67(1):18-24.
430. Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, et al. ICON: food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(4):906-20.
431. Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(1):144-9.
432. Menardo JL, Bousquet J, Rodiere M, Astruc J, Michel FB. Skin test reactivity in infancy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1985;75(6):646-51.
433. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy*. 2008;63(3):310-26.
434. Filep S, Tsay A, Vailes LD, Gadermaier G, Ferreira F, Matsui E, et al. Specific allergen concentration of WHO and FDA reference preparations measured using a multiple allergen standard. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(5):1408-10.
435. Asero R, Jimeno L, Barber D. Component-resolved diagnosis of plant food allergy by SPT. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2008;40(4):115-21.
436. Lopez-Matas MA, Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, Pagan JA, Garcia-Abujeta JL, et al. Identification and quantification of tomato allergens: in vitro characterization of six different varieties. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2011;106(3):230-8.
437. Ferrer A, Huertas AJ, Larramendi CH, Pagan JA, Bartra J, Garcia-Abujeta JL, et al. Antigenic and allergenic differences between green and mature tomatoes. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2008;18(5):411-2.
438. Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests. *Allergy*. 1978;33(3):130-7.
439. Brighton WD, Topping MD, Henocq E. Activity units for allergen extracts. *Clinical allergy*. 1979;9(6):591-6.
440. Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: is it a necessity? *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1994;93(6):1068-70.
441. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Martinez A, Alvarez-Cuesta E, Figueredo E, Martinez J, et al. A method for quantitation of food biologic activity: results with peach allergen extracts. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(2):275-80.
442. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1989;83(3):683-90.

443. Kumar MN, Babu BN, Venkatesh YP. Higher histamine sensitivity in non-atopic subjects by skin prick test may result in misdiagnosis of eggplant allergy. *Immunological investigations*. 2009;38(1):93-103.
444. Asero R, Monsalve R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(6):1033-7.
445. Peeters KA, Koppelman SJ, van Hoffen E, van der Tas CW, den Hartog Jager CF, Penninks AH, et al. Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2007;37(1):108-15.
446. Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, Simpson A, Winell H, Kerry G, et al. Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(1):191-7 e1-13.
447. Diaz-Perales A, Sanz ML, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Lombardero M, et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(3):628-33.
448. Vieths S, Reese G, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Burney P, Fernandez-Rivas M, et al. The serum bank of EuroPrevall - the prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2008;46 Suppl 10:S12-4.
449. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE, and food challenges. *Allergy*. 1997;52(10):1031-5.
450. Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*. 1967;2(7526):1105-7.
451. Hamilton RG, Mudd K, White MA, Wood RA. Extension of food allergen specific IgE ranges from the ImmunoCAP to the IMMULITE systems. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2011;107(2):139-44.
452. Hamilton RG, Franklin Adkinson N, Jr. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(2):213-25; quiz 26.
453. Du Toit G, Santos A, Roberts G, Fox AT, Smith P, Lack G. The diagnosis of IgE-mediated food allergy in childhood. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2009;20(4):309-19.
454. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;107(5):891-6.
455. Dang TD, Tang M, Choo S, Licciardi PV, Koplin JJ, Martin PE, et al. Increasing the accuracy of peanut allergy diagnosis by using Ara h 2. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(4):1056-63.
456. Asero R, Arena A, Cecchi L, Conte ME, Crivellaro M, Emiliani F, et al. Are IgE levels to foods other than rosaceae predictive of allergy in lipid transfer protein-hypersensitive patients? *International archives of allergy and immunology*. 2011;155(2):149-54.
457. Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, Sicherer S, Teuber SS, Burks AW, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy

and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(6):1260-74.

458. Geroldinger-Simic M, Zelniker T, Aberer W, Ebner C, Egger C, Greiderer A, et al. Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):616-22 e1.

459. Mehl A, Verstege A, Staden U, Kulig M, Nocon M, Beyer K, et al. Utility of the ratio of food-specific IgE/total IgE in predicting symptomatic food allergy in children. *Allergy*. 2005;60(8):1034-9.

460. Kraft D, Ferreira F, Vrtala S, Breiteneder H, Ebner C, Valenta R, et al. The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *International archives of allergy and immunology*. 1999;118(2-4):171-6.

461. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Mascheri A, Borgonovo L, et al. Pru p 3-sensitized Italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presenting IgE antibodies to Pru p 1 and Pru p 4. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(4):362-72.

462. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(10):1443-9.

463. Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, et al. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Experimental & molecular medicine*. 2002;34(2):152-8.

464. Bublin M, Dennstedt S, Buchegger M, Antonietta Ciardiello M, Bernardi ML, Tuppo L, et al. The performance of a component-based allergen microarray for the diagnosis of kiwifruit allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(1):129-36.

465. Sampson HA, Broadbent KR, Bernhisel-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *The New England journal of medicine*. 1989;321(4):228-32.

466. Gomez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G, et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(8):1217-24.

467. MacGlashan D, Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(9):1365-77.

468. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1999;82(1):33-40.

469. Mayorga C, Gomez F, Aranda A, Koppelman SJ, Diaz-Perales A, Blanca-Lopez N, et al. Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients. *Allergy*. 2014;69(7):964-8.

470. Wolanczyk-Medrala A, Gogolewski G, Liebhart J, Gomulka K, Litwa M, Panaszek B, et al. A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2009;19(6):465-73.

471. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clinical and*

- experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2009;39(8):1234-45.
472. Chinuki Y, Kaneko S, Dekio I, Takahashi H, Tokuda R, Nagao M, et al. CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(5):1404-6.
473. Ford LS, Bloom KA, Nowak-Wegrzyn AH, Shreffler WG, Masilamani M, Sampson HA. Basophil reactivity, wheal size, and immunoglobulin levels distinguish degrees of cow's milk tolerance. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(1):180-6 e1-3.
474. Raap U, Wieczorek D, Schenck F, Kapp A, Wedi B. The basophil activation test is a helpful diagnostic tool in anaphylaxis to sesame with false-negative specific IgE and negative skin test. *Allergy*. 2011;66(11):1497-9.
475. Worm M, Hompes S, Fiedler EM, Illner AK, Zuberbier T, Vieths S. Impact of native, heat-processed and encapsulated hazelnuts on the allergic response in hazelnut-allergic patients. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(1):159-66.
476. Rentzos G, Lundberg V, Lundqvist C, Rodrigues R, van Odijk J, Lundell AC, et al. Use of a basophil activation test as a complementary diagnostic tool in the diagnosis of severe peanut allergy in adults. *Clinical and translational allergy*. 2015;5:22.
477. Gamboa PM, Sanz ML, Lombardero M, Barber D, Sanchez-Monje R, Goikoetxea MJ, et al. Component-resolved in vitro diagnosis in peach-allergic patients. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2009;19(1):13-20.
478. Santos AF, Douiri A, Becares N, Wu SY, Stephens A, Radulovic S, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(3):645-52.
479. Rubio A, Vivinus-Nebot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*. 2011;66(1):92-100.
480. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(1):179-86.
481. Glaumann S, Nopp A, Johansson SG, Borres MP, Nilsson C. Oral peanut challenge identifies an allergy but the peanut allergen threshold sensitivity is not reproducible. *PloS one*. 2013;8(1):e53465.
482. Glaumann S, Nilsson C, Johansson SG, Asarnoj A, Wickman M, Borres MP, et al. Evaluation of basophil allergen threshold sensitivity (CD-sens) to peanut and Ara h 8 in children IgE-sensitized to Ara h 8. *Clinical and molecular allergy : CMA*. 2015;13(1):5.
483. Homsak M, Silar M, Berce V, Tomazin M, Skerbinjek-Kavalari M, Celesnik N, et al. The relevance of basophil allergen sensitivity testing to distinguish between severe and mild peanut-allergic children. *International archives of allergy and immunology*. 2013;162(4):310-7.
484. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70(11):1393-405.
485. May CD. Objective clinical and laboratory studies of immediate hypersensitivity reactions to foods in asthmatic children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1976;58(4):500-15.

486. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 2004;59(7):690-7.
487. Caffarelli C, Petroccione T. False-negative food challenges in children with suspected food allergy. *Lancet*. 2001;358(9296):1871-2.
488. Niggemann B, Lange L, Finger A, Ziegert M, Muller V, Beyer K. Accurate oral food challenge requires a cumulative dose on a subsequent day. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(1):261-3.
489. Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(5):1164-8.
490. Flinterman AE, Knulst AC, Meijer Y, Bruijnzeel-Koomen CA, Pasmans SG. Acute allergic reactions in children with AEDS after prolonged cow's milk elimination diets. *Allergy*. 2006;61(3):370-4.
491. Miller MM, Miller MM. Beta-blockers and anaphylaxis: are the risks overstated? *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(4):931-3; author reply 3-6.
492. Crevel RW, Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, Hourihane JO, Knulst AC, Mackie AR, et al. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy*. 2008;63(5):597-609.
493. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS, et al. Work Group report: oral food challenge testing. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(6 Suppl):S365-83.
494. Bird JA, Lack G, Perry TT. Clinical management of food allergy. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2015;3(1):1-11; quiz 2.
495. Cochrane SA, Salt LJ, Wantling E, Rogers A, Coutts J, Ballmer-Weber BK, et al. Development of a standardized low-dose double-blind placebo-controlled challenge vehicle for the EuroPrevall project. *Allergy*. 2012;67(1):107-13.
496. Vlieg-Boerstra BJ, Herpertz I, Pasker L, van der Heide S, Kukler J, Jansink C, et al. Validation of novel recipes for double-blind, placebo-controlled food challenges in children and adults. *Allergy*. 2011;66(7):948-54.
497. Wood RA. The natural history of food allergy. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 3):1631-7.
498. Hancock DB, Romieu I, Chiu GY, Sienra-Monge JJ, Li H, Estela Del Rio-Navarro B, et al. STAT6 and LRP1 polymorphisms are associated with food allergen sensitization in Mexican children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(6):1673-6.
499. Muraro A, Halken S, Arshad SH, Beyer K, Dubois AE, Du Toit G, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy*. 2014;69(5):590-601.
500. de Silva D, Geromi M, Halken S, Host A, Panesar SS, Muraro A, et al. Primary prevention of food allergy in children and adults: systematic review. *Allergy*. 2014;69(5):581-9.
501. Garcia-Boyano M, Pedrosa M, Quirce S, Boyano-Martinez T. Household almond and peanut consumption is related to the development of sensitization in young children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015.
502. Longo G, Berti I, Burks AW, Krauss B, Barbi E. IgE-mediated food allergy in children. *Lancet*. 2013;382(9905):1656-64.
503. Sampson HA, Scanlon SM. Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *The Journal of pediatrics*. 1989;115(1):23-7.
504. Peters RL, Allen KJ, Dharmage SC, Koplin JJ, Dang T, Tilbrook KP, et al. Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1257-66 e1-2.

505. Flicker S, Valenta R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2003;132(1):13-24.
506. Wang J, Lin J, Bardina L, Goldis M, Nowak-Wegrzyn A, Shreffler WG, et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(3):695-702, e1- e6.
507. Fleischer DM. The natural history of peanut and tree nut allergy. *Current allergy and asthma reports*. 2007;7(3):175-81.
508. Flinterman AE, Knol EF, Lencer DA, Bardina L, den Hartog Jager CF, Lin J, et al. Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(3):737-43 e10.
509. Lin J, Sampson HA. The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2009;9(4):357-63.
510. Asero R. In patients with LTP syndrome food-specific IgE show a predictable hierarchical order. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2014;46(4):142-6.
511. Savage J, Johns CB. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2015;35(1):45-59.
512. Hourihane JO, Roberts SA, Warner JO. Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ*. 1998;316(7140):1271-5.
513. Sicherer SH. New insights on the natural history of peanut allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2000;85(6 Pt 1):435-7.
514. Al-Ahmed N, Alsowaidi S, Vadas P. Peanut allergy: an overview. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;4(4):139-43.
515. Neuman-Sunshine DL, Eckman JA, Keet CA, Matsui EC, Peng RD, Lenehan PJ, et al. The natural history of persistent peanut allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2012;108(5):326-31 e3.
516. Busse PJ, Nowak-Wegrzyn AH, Noone SA, Sampson HA, Sicherer SH. Recurrent peanut allergy. *The New England journal of medicine*. 2002;347(19):1535-6.
517. De Knop KJ, Verweij MM, Grimmeliikhuijsen M, Philipse E, Hagendorens MM, Bridts CH, et al. Age-related sensitization profiles for hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(1 Pt 2):e139-49.
518. Savage JH, Kaeding AJ, Matsui EC, Wood RA. The natural history of soy allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(3):683-6.
519. Ballmer-Weber BK, Vieths S. Soy allergy in perspective. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2008;8(3):270-5.
520. Keet CA, Matsui EC, Dhillon G, Lenehan P, Paterakis M, Wood RA. The natural history of wheat allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2009;102(5):410-5.
521. Fisher HR, du Toit G, Lack G. Specific oral tolerance induction in food allergic children: is oral desensitisation more effective than allergen avoidance?: a meta-analysis of published RCTs. *Archives of disease in childhood*. 2011;96(3):259-64.
522. Brough HA, Turner PJ, Wright T, Fox AT, Taylor SL, Warner JO, et al. Dietary management of peanut and tree nut allergy: what exactly should patients avoid? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(5):859-71.

523. Le TM, Zijlstra WT, van Opstal EY, Knol MJ, L'Hoir MP, Knulst AC, et al. Food avoidance in children with adverse food reactions: influence of anxiety and clinical parameters. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(7):650-5.
524. Mikkelsen A, Borres MP, Bjorkelund C, Lissner L, Oxelmark L. The food hypersensitivity family impact (FLIP) questionnaire - development and first results. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(6):574-81.
525. Marrs T, Lack G. Why do few food-allergic adolescents treat anaphylaxis with adrenaline?--Reviewing a pressing issue. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(3):222-9.
526. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Morisset M, Flabbee J, Guenard L, Beaudouin E, et al. Food anaphylaxis in schools: evaluation of the management plan and the efficiency of the emergency kit. *Allergy*. 2001;56(11):1071-6.
527. Fleming JT, Clark S, Camargo CA, Jr., Rudders SA. Early treatment of food-induced anaphylaxis with epinephrine is associated with a lower risk of hospitalization. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2015;3(1):57-62.
528. Simons FE, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, Thong BY, Worm M, Tanno LK, et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *The World Allergy Organization journal*. 2015;8(1):32.
529. Campbell RL, Bellolio MF, Knutson BD, Bellamkonda VR, Fedko MG, Nestler DM, et al. Epinephrine in anaphylaxis: higher risk of cardiovascular complications and overdose after administration of intravenous bolus epinephrine compared with intramuscular epinephrine. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2015;3(1):76-80.
530. Lieberman P, Nicklas RA, Randolph C, Oppenheimer J, Bernstein D, Bernstein J, et al. Anaphylaxis--a practice parameter update 2015. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2015;115(5):341-84.
531. Vickery BP, Scurlock AM, Jones SM, Burks AW. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):576-84; quiz 85-6.
532. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(11):1567-75.
533. Antunez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2008;19(3):210-8.
534. Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, et al. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1997;27(9):1007-15.
535. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *The World Allergy Organization journal*. 2015;8(1):17.
536. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International consensus on allergy immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(3):556-68.

537. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. The Cochrane database of systematic reviews. 2007(1):CD001936.
538. Winther L, Arnved J, Malling HJ, Nolte H, Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy: a prospective multi-centre study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2006;36(3):254-60.
539. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Historical document. *Annals of allergy*. 1960;18:287-91.
540. Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;99(6 Pt 1):744-51.
541. Allam JP, Wurtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen KW, et al. Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(3):638-45 e1.
542. Kopac P, Rudin M, Gentinetta T, Gerber R, Pichler C, Hausmann O, et al. Continuous apple consumption induces oral tolerance in birch-pollen-associated apple allergy. *Allergy*. 2012;67(2):280-5.
543. Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, Di Rienzo V, Nucera E, et al. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergologia et immunopathologia*. 1984;12(4):275-81.
544. Vickery BP, Scurlock AM, Kulis M, Steele PH, Kamilaris J, Berglund JP, et al. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):468-75.
545. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(2):292-300, e1-97.
546. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, et al. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(5):1120-5 e2.
547. Mayumi S, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, et al. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2016.
548. Anagnostou K, Clark A. Peanut immunotherapy. *Clinical and translational allergy*. 2014;4:30.
549. Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1275-82 e1-6.
550. Scadding GK, Brostoff J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. *Clinical allergy*. 1986;16(5):483-91.
551. Mempel M, Rakoski J, Ring J, Ollert M. Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(6):1406-9.
552. de Boissieu D, Dupont C. Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy*. 2006;61(10):1238-9.
553. Fernandez-Rivas M, Garrido Fernandez S, Nadal JA, Diaz de Durana MD, Garcia BE, Gonzalez-Mancebo E, et al. Randomized double-blind, placebo-controlled

- trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*. 2009;64(6):876-83.
554. Kim EH, Bird JA, Kulis M, Laubach S, Pons L, Shreffler W, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: clinical and immunologic evidence of desensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):640-6 e1.
555. Burks AW, Wood RA, Jones SM, Sicherer SH, Fleischer DM, Scurlock AM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Long-term follow-up of a randomized multicenter trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1240-8 e1-3.
556. Gastaminza G, Algorta J, Uriel O, Audicana MT, Fernandez E, Sanz ML, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of sublingual immunotherapy in natural rubber latex allergic patients. *Trials*. 2011;12:191.
557. Horak F, Ziegler P, Ziegler R, Lemell P, Devillier P, Montagut A, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3):471-7, 7 e1.
558. Van Overtvelt L, Baron-Bodo V, Horiot S, Moussu H, Ricarte C, Horak F, et al. Changes in basophil activation during grass-pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy. *Allergy*. 2011;66(12):1530-7.
559. Fleischer DM, Burks AW, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, Jones SM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(1):119-27 e1-7.
560. Chin SJ, Vickery BP, Kulis MD, Kim EH, Varshney P, Steele P, et al. Sublingual versus oral immunotherapy for peanut-allergic children: a retrospective comparison. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(2):476-8 e2.
561. Le UH, Burks AW. Oral and sublingual immunotherapy for food allergy. *The World Allergy Organization journal*. 2014;7(1):35.
562. Marcucci F, Sensi L, Frati F, Senna GE, Canonica GW, Parmiani S, et al. Sublingual tryptase and ECP in children treated with grass pollen sublingual immunotherapy (SLIT): safety and immunologic implications. *Allergy*. 2001;56(11):1091-5.
563. Yepes-Nunez JJ, Zhang Y, Roque i Figuls M, Bartra Tomas J, Reyes JM, Pineda de la Losa F, et al. Immunotherapy (oral and sublingual) for food allergy to fruits. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015;11:CD010522.
564. Garcia BE, Gonzalez-Mancebo E, Barber D, Martin S, Tabar AI, Diaz de Durana AM, et al. Sublingual immunotherapy in peach allergy: monitoring molecular sensitizations and reactivity to apple fruit and *Platanus* pollen. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2010;20(6):514-20.
565. Kinaciyan T, Jahn-Schmid B, Radakovics A, Zwolfer B, Schreiber C, Francis JN, et al. Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(4):937-43.
566. Mutyambizi K, Berger CL, Edelson RL. The balance between immunity and tolerance: the role of Langerhans cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(5):831-40.
567. Jay DC, Nadeau KC. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy. *Current allergy and asthma reports*. 2014;14(11):473.
568. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(3):707-13.

569. Suarez-Fueyo A, Ramos T, Galan A, Jimeno L, Wurtzen PA, Marin A, et al. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(1):130-8 e1-2.
570. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(4):735-46; quiz 47-8.
571. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(5):961-8; quiz 9.
572. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(2):358-68.
573. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(12):1679-88.
574. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(6):1025-34; quiz 35.
575. Sin BA, Akdis M, Zumkehr J, Bezzine S, Bekpen C, Lambeau G, et al. T-cell and antibody responses to phospholipase A2 from different species show distinct cross-reactivity patterns. *Allergy*. 2011;66(12):1513-21.
576. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(9):1226-34.
577. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(9):1392-7.
578. Herman J, Thelen N, Smargiasso N, Mailleux AC, Luxen A, Cloes M, et al. Der p 1 is the primary activator of Der p 3, Der p 6 and Der p 9 the proteolytic allergens produced by the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(3):1117-24.
579. Kulis M, Li Y, Lane H, Pons L, Burks W. Single-tree nut immunotherapy attenuates allergic reactions in mice with hypersensitivity to multiple tree nuts. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(1):81-8.
580. Siebeneicher S, Reuter S, Wangorsch A, Krause M, Foetisch K, Heinz A, et al. Epicutaneous immunotherapy with a hypoallergenic Bet v 1 suppresses allergic asthma in a murine model. *Allergy*. 2015;70(12):1559-68.
581. Mondoulet L, Dioszeghy V, Thebault C, Benhamou PH, Dupont C. Epicutaneous immunotherapy for food allergy as a novel pathway for oral tolerance induction. *Immunotherapy*. 2015;7(12):1293-305.
582. Prickett SR, Voskamp AL, Dacumos-Hill A, Symons K, Rolland JM, O'Hehir RE. Ara h 2 peptides containing dominant CD4+ T-cell epitopes: candidates for a peanut allergy therapeutic. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):608-15 e1-5.
583. Gomez-Casado C, Garrido-Arandia M, Gamboa P, Blanca-Lopez N, Canto G, Varela J, et al. Allergenic characterization of new mutant forms of Pru p 3 as new immunotherapy vaccines. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:385615.
584. Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, Neubauer A, Asturias J, Blom L, et al. FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. *Clinical and translational allergy*. 2012;2(1):5.

585. Lauer I, Dueringer N, Pokoj S, Rehm S, Zoccatelli G, Reese G, et al. The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(9):1427-37.
586. Grabenhenrich LB, Dolle S, Moneret-Vautrin A, Kohli A, Lange L, Spindler T, et al. Anaphylaxis in children and adolescents: The European Anaphylaxis Registry. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016.
587. Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, Smith B, Kumar R, Pongratic J, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011;128(1):e9-17.
588. Fernandez-Rivas M. Fruit and vegetable allergy. *Chemical immunology and allergy*. 2015;101:162-70.
589. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1998;81(5):401-5.
590. Theodoropoulos DS, Lockey RF. Allergen immunotherapy: guidelines, update, and recommendations of the World Health Organization. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 2000;21(3):159-66.
591. Sindher S, Fleischer DM, Spergel JM. Advances in the Treatment of Food Allergy: Sublingual and Epicutaneous Immunotherapy. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2016;36(1):39-54.
592. Pitsios C, Demoly P, Bilo MB, Gerth van Wijk R, Pfaar O, Sturm GJ, et al. Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy*. 2015;70(8):897-909.
593. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69(1):76-86.
594. Joint Task Force on Practice P, American Academy of Allergy A, Immunology, American College of Allergy A, Immunology, Joint Council of Allergy A, et al. The diagnosis and management of anaphylaxis: an updated practice parameter. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(3 Suppl 2):S483-523.
595. Santos AF, James LK, Bahnson HT, Shamji MH, Couto-Francisco NC, Islam S, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1249-56.
596. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(4):1109-18.
597. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(8):2538-44.
598. Gomez E, Diaz-Perales A, Tordesillas L, Dona I, Torres MJ, Blazquez AB, et al. Effect of Pru p 3 on dendritic cell maturation and T-lymphocyte proliferation in peach allergic patients. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2012;109(1):52-8.
599. Hodgkin PD, Chin SH, Bartell G, Mamchak A, Doherty K, Lyons AB, et al. The importance of efficacy and partial agonism in evaluating models of B lymphocyte activation. *International reviews of immunology*. 1997;15(1-2):101-27.

600. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):147-54.
601. Lyons AB, Hasbold J, Hodgkin PD. Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, a stably integrated fluorescent probe. *Methods in cell biology*. 2001;63:375-98.
602. Fernandez-Rivas M, Vazquez-Cortes S, Fernandez Perez C. Tratado de Alergología. In: Ergon, editor. SEAIC. III2015. p. 959-68.
603. Garrido-Fernandez S, Garcia BE, Sanz ML, Echechipia S, Lizaso MT, Tabar AI. Are basophil activation and sulphidoleukotriene determination useful tests for monitoring patients with peach allergy receiving sublingual immunotherapy with a Pru p 3-enriched peach extract? *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2014;24(2):106-13.
604. Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor ML, Rizzo M, Castello F, Martinelli N, et al. Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(5):1103-10, 10 e1-4.
605. Marcucci F, Sensi L, Incorvaia C, Dell'Albani I, Di Cara G, Frati F. Specific IgE response to different grass pollen allergen components in children undergoing sublingual immunotherapy. *Clinical and molecular allergy : CMA*. 2012;10(1):7.
606. Ciepiela O, Zawadzka-Krajewska A, Kotula I, van Overveld F, Kulus M, Demkow U. Sublingual Immunotherapy for Asthma: Affects T-Cells but Does not Impact Basophil Activation. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. 2014;27(1):17-23.
607. Schmid JM, Wurtzen PA, Dahl R, Hoffmann HJ. Early improvement in basophil sensitivity predicts symptom relief with grass pollen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(3):741-4 e5.
608. Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(2):448-55, 55 e1-5.
609. Gorelik M, Narisety SD, Guerrero AL, Chichester KL, Keet CA, Bieneman AP, et al. Suppression of the immunologic response to peanut during immunotherapy is often transient. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1283-92.
610. Swamy RS, Reshamwala N, Hunter T, Vissamsetti S, Santos CB, Baroody FM, et al. Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(1):215-24 e7.
611. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, et al. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*. 2013;68(2):161-70.
612. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
613. Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Current opinion in immunology*. 2001;13(3):291-8.
614. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology*. 2002;23(9):445-9.
615. Yao W, Tepper RS, Kaplan MH. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(6):1357-60 e5.
616. Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM. Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(4):1000-10 e3.

617. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clinical immunology*. 2006;118(1):1-10.
618. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, et al. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *European journal of immunology*. 2004;34(6):1715-22.
619. Chaves P, Torres MJ, Aranda A, Lopez S, Canto G, Blanca M, et al. Natural killer-dendritic cell interaction in lymphocyte responses in hypersensitivity reactions to betalactams. *Allergy*. 2010;65(12):1600-8.
620. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):1204-12.
621. Fernandez TD, Gomez E, Dona I, Campo P, Rondon C, Gonzalez M, et al. Differential Plasma-cell evolution is linked with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy response. *Scientific reports*. 2015;5:14482.