



Universidad  
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES  
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: CASTILLO FERNANDEZ, MIRIAM

D.N.I./PASAPORTE: \*\*\*\*1627H

PROGRAMA DE DOCTORADO: 410-BIOLOGIA FUNCIONAL Y BIOTECNOLOGIA

DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: CIENCIAS DE LA VIDA

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 11/06/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **FERNANDO PINEDA DE LA LOSA // BENITO FRAILE LAIZ**.

Sobre el siguiente tema: *ASLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA ESPECIE ARACHIS HYPOGAEA. IMPLICACIÓN EN LA HIPERSENSIBILIDAD TIPO I.*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 11 de Junio de 2019

EL PRESIDENTE

Fdo.: MAR ROYUELA GARCIA

EL SECRETARIO

Fdo.: ALICIA ARMENTIA MEDINA

EL VOCAL

Fdo.: FELIX LORENTE TOLEDANO

Con fecha 24 de junio de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

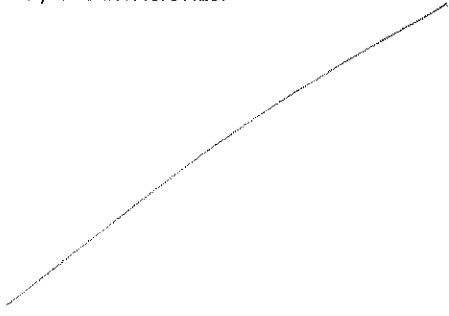
La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: CASTILLO FERNANDEZ, MIRIAM

<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de junio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por **CASTILLO FERNANDEZ, MIRIAM**, el día 11 de junio de 2019, titulada, **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA ESPECIE ARACHIS HYPOGAEA. IMPLICACIÓN EN LA HIPERSENSIBILIDAD TIPO I.** para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.


Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

**MENCIÓN "CUM LAUDE"**

Alcalá de Henares, 24 de junio de 2019  
 EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA  
 F. Javier de la Mata de la Mata

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: CASTILLO FERNANDEZ, MIRIAM  
 Secretario del Tribunal: ALICIA ARMENTIA MEDINA  
 Directores de Tesis: FERNANDO PINEDA DE LA LOSA // BENITO FRAILE LAIZ

<b>Código Seguro De Verificación:</b>	Mf0pqEFdYmNGUmQbJApcyA==	<b>Estado</b>	<b>Fecha y hora</b>	
<b>Firmado Por</b>	Francisco Javier De La Mata De La Mata - Vicerrector de Investigación Y Transferencia	Firmado	26/06/2019 09:09:42	
<b>Observaciones</b>		<b>Página</b>	1/14	
<b>Url De Verificación</b>	<a href="https://vfirma.uah.es/vfirma/code/Mf0pqEFdYmNGUmQbJApcyA==">https://vfirma.uah.es/vfirma/code/Mf0pqEFdYmNGUmQbJApcyA==</a>			





Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato:  soporte electrónico  impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Biología funcional y biotecnología

**Aislamiento y purificación de proteínas  
de la fracción lipídica de la especie  
*Arachis hypogaea*. Implicación en la  
hipersensibilidad tipo I.**

**Tesis Doctoral presentada por**

**MIRIAM CASTILLO FERNÁNDEZ**

**Director/a:**

**DR. FERNANDO PINEDA DE LA LOSA**

**DR. BENITO FRAILE LAIZ**

**Alcalá de Henares, 25 febrero de 2019**





### Informe del Director de Tesis

D. Fernando Pineda de la Losa, Doctor en Farmacia. por la Universidad Complutense de Madrid y Responsable del Laboratorio de Aplicaciones en DIATER Laboratorios, como Director de Tesis,

### CERTIFICA QUE

Doña Miriam Castillo Fernández, Graduada en Biología Sanitaria por la Universidad de Alcalá, ha realizado bajo mi dirección la presente memoria de tesis "Aislamiento y purificación de proteínas de la fracción lipídica de la especie *Arachis hypogaea*. Implicación en la hipersensibilidad tipo I".

Tras examinar y revisar dicho trabajo, considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi aceptación para su defensa y aprobación.

Para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, a 05 de marzo de 2019.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Pineda de la Losa".

Dr. Fernando Pineda de la Losa





**BENITO FRAILE LAIZ, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá**

**INFORMA** que **Dña. Miriam Castillo Fernández**, ha realizado bajo su codirección el trabajo correspondiente a la Tesis Doctoral, que lleva por título: **“Aislamiento y purificación de proteínas de la fracción lipídica de la especie *Arachis hypogaea*. Implicación en la hipersensibilidad tipo I”**, cumpliéndose todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa y aprobación

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares, a 26 de febrero de 2019



Fdo.: Benito Fraile Laiz



**LEONARDO CASANO MAZZA, Catedrático de Fisiología Vegetal y Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología de la Universidad de Alcalá**

**INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada: "**Aislamiento y purificación de proteínas de la fracción lipídica de la especie *Arachis hypogaea*. Implicación en la hipersensibilidad tipo I**", presentada por **Dña. Miriam Castillo Fernández**, bajo la dirección del Dr. Fernando Pineda de la Losa, Responsable del laboratorio de Aplicaciones DIATER Laboratorios, y la codirección del Dr. Benito Fraile Laiz, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Alcalá, reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares, a 8 de marzo de 2019



Fdo.: Leonardo Casano Mazza



***A mis padres y hermano***

***A mi familia***



## ***Agradecimientos***

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación científica y personal durante estos últimos años y que con ello han hecho posible la realización de esta Tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores Dr. Fernando Pineda y Dr. Benito Fraile, por dirigir esta Tesis. A ti Fernando, gracias por creer y confiar en mí desde el primer día, por ayudarme a crecer profesional y personalmente y por enseñarme que, con perseverancia y esfuerzo, todo se puede conseguir. A Benito por todo su apoyo, interés, aportaciones a lo largo del proyecto y por sus maravillosas clases durante la carrera.

En segundo lugar, quiero agradecer a los Laboratorios DIATER, especialmente al Dr. Ricardo Palacios por su continuo asesoramiento técnico y científico, y por haber permitido mi desarrollo profesional en el Departamento de Aplicaciones. También al Dr. David Rodríguez por su inestimable ayuda con la estadística.

A toda la gran familia que forma DIATER, especialmente a Montse, Ana, Rosa, Álvaro, Paloma, Vane, Inés, Pepa, Rafa, Patri y Loli. Al departamento comercial, Santos, Marina, Carol, por ayudar en la colaboración con el Dr. Luis Echeverría y todo su equipo del hospital Severo Ochoa de Leganés, a los que agradezco su experiencia y ayuda con la parte clínica en todo momento.

A mis amigos, Gema, Sandra, Silvia, Raquel y Alex que, de una forma u otra lo han hecho posible porque me han escuchado o, simplemente, han estado. A mis amigos de siempre, con los que decidí estudiar Biología Sanitaria, Carlos, David, Irene, hemos pasado por todo juntos y sois una parte primordial en este trabajo.

Para concluir quiero dar las gracias a mi familia. A *Los Castillo*, por escucharme hablar de “cosas raras” y hacerme reír. A mis tías, Rosi, Inma, gracias por pasar horas leyendo este trabajo, ayudándome, al igual que lo habéis hecho siempre. A mis abuelas, que tengo la suerte de disfrutar y a mis abuelos que, aunque no estén, también me acuerdo de ellos.

Un agradecimiento especial a mis padres. Por todo el esfuerzo que habéis dedicado a mi educación y formación, por apoyarme y escucharme siempre porque, sin vosotros, no hubiera llegado donde estoy hoy. A mi hermano, Kevin, gracias por tus discusiones sobre todas las cosas y por ser la persona más crítica que conozco, estoy orgullosa de ti. Mamá, papá, gracias por todo. Este trabajo es vuestro.

***A todos, ¡Gracias!***





# **ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XXIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>LA ENFERMEDAD ALÉRGICA.....</b>	<b>3</b>
PERSPECTIVA HISTÓRICA .....	3
DEFINICIÓN.....	5
INMUNOGLOBULINA E. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN.....	11
COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH) .....	15
TIPOS CELULARES.....	17
Mediadores inflamatorios.....	19
MECANISMOS .....	26
GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS .....	28
PREVALENCIA .....	30
Impacto en la sociedad.....	32
DIAGNÓSTICO .....	35
TRATAMIENTO.....	38
<b>ALERGIA ALIMENTARIA.....</b>	<b>43</b>
PREVALENCIA .....	45
MECANISMOS .....	48
DIAGNÓSTICO .....	50
TRATAMIENTO.....	51
ALERGIA A LOS FRUTOS SECOS.....	53

<b>ALERGIA AL CACAHUETE</b> .....	<b>62</b>
PREVALENCIA .....	65
ALÉRGENOS DEL CACAHUETE.....	66
ALERGENICIDAD DEL CACAHUETE .....	70
TRATAMIENTO. ESTUDIOS EN MARCHA.....	72
Estudio LEAP .....	73
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>75</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>79</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>83</b>
<b>OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA FUENTE ALERGÉNICA</b> .....	<b>85</b>
EXTRACCIÓN COMPLETA DE PROTEÍNAS .....	85
SELECCIÓN DE LA FUENTE SENSIBILIZANTE .....	86
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN AMBAS FRACCIONES: HIDROSOLUBLE Y LIPOSOLUBLE.....	87
DIÁLISIS.....	87
ESTABILIZACIÓN .....	88
<b>DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS</b> .....	<b>89</b>
EXTRACTO ALERGÉNICO.....	89
Humedad relativa.....	89
Contenido proteico.....	90
Solubilidad.....	91
pH.....	92
Determinación del perfil electroforético. SDS-PAGE. ....	93
Determinación del perfil electroforético. 2D-PAGE .....	98
Transferencia de proteínas a un soporte sólido. Western blot .....	101
Procedimiento de evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección .....	106
Transferencia de proteínas a un soporte sólido. Dot blot .....	106
Determinación de la actividad enzimática .....	108
ELISA inhibición .....	109

PRUEBA CUTÁNEA.....	110
Preparación de las pruebas cutáneas.....	111
Análisis de las pruebas cutáneas.....	111
<b>ESTUDIO CON PACIENTES.....</b>	<b>115</b>
POBLACIÓN ESTUDIADA .....	115
PRUEBAS CUTÁNEAS .....	115
PROVOCACIÓN ORAL CONTROLADA.....	117
DETERMINACIÓN DE IgE .....	119
Determinación de IgE total.....	119
Determinación de IgE específica.....	120
PRUEBA DE LIBERACIÓN DE HISTAMINA .....	123
Recolección y almacenaje de las muestras.....	124
Preparación de las muestras de sangre para método pasivo.....	124
Preparación de los reactivos .....	124
Concentración óptima del extracto alergénico.....	125
Procedimiento de la prueba.....	126
Control de calidad .....	126
Resultados .....	126
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>127</b>
Índices de validez .....	128
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>129</b>
<b>ALERGENICIDAD DE LA FRACCIÓN GRASA.....</b>	<b>131</b>
<b>SELECCIÓN DE LA FUENTE ALERGÉNICA.....</b>	<b>131</b>
SDS-PAGE .....	132
DOT BLOT.....	132
WESTERN BLOT .....	133
ELISA INHIBICIÓN.....	134

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA FUENTE SELECCIONADA.....</b>	<b>135</b>
EXTRACTO ALERGÉNICO: FRACCIÓN HIDROSOLUBLE .....	136
SDS-PAGE y 2D-PAGE .....	136
Western blot 1D y 2D con <i>pool</i> de sueros.....	137
Actividad enzimática .....	138
EXTRACTO ALERGÉNICO: FRACCIÓN LIPOSOLUBLE .....	138
SDS-PAGE y 2D-PAGE .....	139
Western blot 1D y 2D con <i>pool</i> de sueros.....	139
Actividad enzimática .....	140
<b>ANÁLISIS DE LA PRUEBA CUTÁNEA (<i>PRICK TEST</i>) .....</b>	<b>141</b>
<i>PRICK TEST</i> : fracción hidrosoluble .....	141
<i>PRICK TEST</i> : fracción liposoluble .....	142
<b>APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR FRACCIONES DEL CACAHUETE ...</b>	<b>143</b>
CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES .....	143
DIAGNÓSTICO <i>IN VIVO</i> : <i>PRICK TEST</i> Y PROVOCACIÓN ORAL.....	146
DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i> : DETERMINACIÓN IgE ESPECÍFICA .....	148
DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i> : PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN.....	153
DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i> : LIBERACIÓN DE HISTAMINA.....	155
RESUMEN PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	160
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>163</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>179</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

a.C:	antes de Cristo.
A:	amperios.
A3R:	receptor para adenosina.
ABTS:	ácido 2,2-azino-di-(3 etilbenzotiazolin) sulfónico.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
Ag:	antígeno.
AINE:	antiinflamatorio no esteroideo.
AMPc:	adenosín monofosfato cíclico.
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
BSA:	albúmina sérica bovina.
C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O:	4-aminoantipirina.
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> :	etilenglicol.
C3aR:	receptor para componente C3a del complemento.
C <sub>6</sub> N <sub>6</sub> FeK <sub>3</sub> :	ferricianuro de potasio.
CAPS:	ácido 3-ciclohexamino-1-propanosulfónico.
CD:	clúster de diferenciación.
CD23a/b:	clúster del receptor de baja afinidad de IgE (FcεRII).
CD4:	clúster de diferenciación antigénica de linfocitos T CD4.
CD8+:	clúster de diferenciación de linfocitos T citotóxicos.
CDR:	regiones constantes de complementariedad.
CGRP:	péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
cm:	centímetro.
cm <sup>2</sup> :	centímetro cuadrado.
CMH-I/II:	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I / II.
CO <sub>2</sub> :	dióxido de carbono.
CPA3:	carboxipeptidasa A3.
cys-LT:	cisteinil leucotrienos.
d.C:	después de Cristo.

## XVIII | ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Da:	dalton.
DMSO:	dimetilsulfóxido.
DP1,2:	receptor transmembrana acoplado a proteína G.
DTH:	respuesta de hipersensibilidad tardía.
DTT:	1,4-ditiotreitol.
EAACI:	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica.
ECP:	proteína catiónica del eosinófilo.
EDN:	neurotoxina derivada del eosinófilo.
EE. UU.:	Estados Unidos.
EET:	trampas extracelulares de ADN de eosinófilos.
ELISA:	enzimoinmunoensayo ( <i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i> ).
EPO:	peroxidasa del eosinófilo.
EVA:	escala visual analógica.
Fab:	región variable de la inmunoglobulina de unión al antígeno.
Fc:	región constante de la inmunoglobulina.
FcεRI:	receptor de alta afinidad para la IgE.
FcεRII:	receptor de baja afinidad para la IgE.
FN:	falso negativo.
FP:	falso positivo.
FU:	unidades de fluorescencia.
Fyn:	tirosina quinasa.
g:	gramo.
Ga <sup>2</sup> Len:	Red Global Europea de Alergia y Asma.
GM-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GPCRs:	receptores acoplados a proteína G.
H <sub>2</sub> O:	agua.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	agua oxigenada.
HCl:	ácido clorhídrico.
HCOOH:	ácido fórmico.
HDL:	lipoproteína de alta densidad.

HEP:	unidad histamino equivalente por prick.
HLA:	antígenos de leucocitos humanos.
HR <sub>1-2-3-4</sub> :	receptor para la histamina 1-2-3-4.
HRP:	peroxidasa de rábano.
HRT:	test de liberación de histamina.
I <sup>125</sup> :	yodo-125.
IC:	intervalo de confianza.
ICAM/VCAM-1:	molécula de adhesión intercelular 1.
IFN-γ:	interferón gamma.
Ig:	inmunoglobulina.
IgA:	inmunoglobulina A.
IgD:	inmunoglobulina D.
IgE:	inmunoglobulina E.
IgG:	inmunoglobulina G.
IgM:	inmunoglobulina M.
IL:	interleuquina.
IPG:	tiras de gradiente de pH inmovilizado.
ISAAC:	Estudio Internacional de Asma y Alergias pediátricas.
ITAM:	motivo de activación del inmunoreceptor vía tirosina.
ITEP/EPIT:	inmunoterapia específica con alérgeno por vía epicutánea.
ITO/OIT:	inmunoterapia específica con alérgeno por vía oral.
ITS/SIT:	inmunoterapia específica con alérgeno.
ITSC/SCIT:	inmunoterapia específica con alérgeno por vía subcutánea.
ITSL/SLIT:	inmunoterapia específica con alérgeno por vía sublingual.
IUIS:	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas.
kcal:	kilocaloría.
KCl:	cloruro potásico.
K <sub>d</sub> :	constante de disociación.
kDa:	kilodaltons.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	fosfato potásico.



## XX | ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

KIT:	receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa.
kU:	kilo unidades.
L:	litro.
LEAP:	estudio de Aprendizaje Temprano de la Alergia al cacahuete.
LTA <sub>4</sub> ,B <sub>4</sub> ,C <sub>4</sub> ,D <sub>4</sub> ,E <sub>4</sub> :	leucotrienos de clases A <sub>4</sub> , B <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> .
LTc:	linfocitos T CD8+.
LTP:	proteínas de transferencia de lípidos.
M:	molaridad.
mA:	miliamperio.
mBar:	milibar.
MBP:	proteína básica mayor.
MC <sub>T</sub> :	mastocitos T.
MC <sub>TC</sub> :	mastocitos TC.
mg:	miligramo.
MIP-1 $\alpha$ :	proteína inflamatoria macrofágica 1 $\alpha$ .
mL:	mililitro.
mm:	milímetro.
mM:	milimolar.
mm <sup>2</sup> :	milímetro cuadrado.
mV:	milivoltio.
N:	normalidad.
NaCl:	cloruro sódico.
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NaHCO <sub>3</sub> :	bicarbonato sódico.
NaIO <sub>4</sub> :	peróxido sódico.
NaOH:	hidróxido de sodio.
ng:	nanogramo.
nm:	nanómetro.
NO:	monóxido de nitrógeno.
n <sup>o</sup> :	número.

ns-LTP:	proteína transportadora de lípidos no específica.
°C:	grados centígrados.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
p/v:	peso / volumen.
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :	óxido de fósforo.
PAF:	factor activador de plaquetas.
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS:	tampón fosfato salino.
PES:	poliétersulfona.
pg:	picogramo.
PGD <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> :	prostaglandina D <sub>2</sub> , prostaglandina E <sub>2</sub> .
pH:	coeficiente de acidez o alcalinidad de una sustancia.
pl:	punto isoeléctrico.
PM:	peso molecular.
P.O.C:	provocación oral controlada.
PODCCP:	provocación oral doble ciego controlada con placebo.
PVDF:	difluoruro de polivinilideno.
RANTES:	quimiocina expresada y secretada por la activación de células T.
RAST:	enzimoinmunoensayo ( <i>Radio Allergo Sorbent Test</i> ).
ROC:	curva operador-respuesta.
rpm:	revoluciones por minuto.
S1PR:	esfingosina 1 fosfatasa.
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
SDS:	dodecil sulfato sódico.
SEAIC:	Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.
SIDA:	síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.
Syk:	tirosina quinasa.
TA:	temperatura ambiente.
TAB:	test de activación de basófilos.
TCA:	ácido tricloroacético.

## XXII | ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

TEMED:	tetrametiletilendiamina.
Th0/1/2:	linfocito Th0, Th1, Th2.
TLRs:	receptores Toll-like.
TNF- $\alpha$ / $\beta$ :	factor de necrosis tumoral alfa / beta.
Treg:	linfocito T regulador.
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano.
TSA:	agar triptona de soja.
Tween-20:	polioxietileno-sorbitan monolaurato.
UFC:	unidad formadora de colonias.
v/v:	volumen / volumen.
V:	voltio.
VIP:	péptido intestinal vasoactivo.
VN:	verdadero negativo.
VP:	verdadero positivo.
vs.:	versus, contra.
WAO:	organización mundial de alergia.
WFI:	agua para inyectables.
X g:	fuerza centrífuga relativa.
$\mu$ g:	microgramos.
$\mu$ L:	microlitro.
2D:	dos dimensiones

## ÍNDICE DE FIGURAS

- 10 | **Figura 1.** Hipersensibilidad tipo I. Modificada de Doan, *et al.*, 2007.
- 10 | **Figura 2.** Hipersensibilidad tipo IV. (A) Dermatitis de contacto, (B) Reacción tardía y (C) Respuesta de linfocitos T citotóxicos. Modificada de Doan, *et al.*, 2007.
- 12 | **Figura 3.** Estructura de la IgE. Modificada de Kenneth, 2016.
- 14 | **Figura 4.** Estructura del receptor FcεRI. Modificada de Abbas, *et al.*, 2014.
- 16 | **Figura 5.** Estructura de una molécula de clase I y clase II del CMH. Modificada de Abbas, *et al.*, 2014.
- 23 | **Figura 6.** Biosíntesis de leucotrienos. Modificado de Singh, *et al.*, 2013.
- 34 | **Figura 7.** Barreras potenciales para la implementación de programas de prevención y control de enfermedades. Modificada de *Global Atlas of Allergy*, 2014.
- 42 | **Figura 8.** Efectos de la inmunoterapia con alérgenos. Modificada de Casale, *et al.*, 2011.
- 45 | **Figura 9.** Reacciones adversas a alimentos. Modificada de Valenta, *et al.*, 2015.
- 46 | **Figura 10.** Hábitos genéticos, ambientales, dietéticos y los factores de riesgo relacionados con los alérgenos para la alergia alimentaria. Modificada de Benedé, *et al.*, 2017.
- 47 | **Figura 11.** Variación de la frecuencia de alergia alimentaria por edades y alérgenos más frecuentes. Modificado de Sánchez-López, *et al.*, 2017.
- 49 | **Figura 12.** Patogénesis y manifestaciones de la alergia alimentaria. Modificado de Valenta, *et al.*, 2015.
- 50 | **Figura 13.** Algoritmo de diagnóstico y manejo de las alergias alimentarias. Modificado de Jutel, *et al.*, 2014.

- 58 | **Figura 14.** Esquema de un cuerpo oleoso con sus componentes (izquierda) y determinación de la masa molecular de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (derecha). Modificada de Jappe y Schwager, 2017.
- 60 | **Figura 15.** Estructura tridimensional de oleosinas, caleosinas y esteroleosinas. Modificado de Tzen, 2012.
- 62 | **Figura 16.** A la izquierda inflorescencia, partes y secciones de *Arachis hypogaea*. Modificado de Zippel, Hermann (serie 'Ausländische Kulturpflanzen in farbigen Wandtafeln') - *Kennis als kunst: botanische onderwijsplaten 1870–1960*. A la derecha fotografías de diferentes partes del cacahuete.
- 63 | **Figura 17.** A la izquierda portada del libro de Francisco Tabares de Ulloa y a la derecha familia valenciana tamizando cacahuetes.
- 66 | **Figura 18.** Proteínas de cacahuete. Modificado de Lange, *et al.*, 2014.
- 69 | **Figura 19.** Estructura tridimensional de (A) Ara h 1, (B) Ara h 2 y (C) Ara h 8. Modificado de Mueller, *et al.*, 2014.
- 86 | **Figura 20.** Fotografía de las materias primas escogidas.
- 89 | **Figura 21.** Ley de Faraday.
- 90 | **Figura 22.** Resumen del análisis de la humedad – Easy H<sub>2</sub>O.
- 91 | **Figura 23.** Resumen del análisis del contenido proteico – Bradford.
- 92 | **Figura 24.** Resumen del análisis de pH.
- 97 | **Figura 25.** *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad).
- 104 | **Figura 26.** Disposición de los diferentes elementos de la transferencia.
- 107 | **Figura 27.** Esquema de montaje del aparato Bio-Dot. Modificada de Bio-Rad.
- 112 | **Figura 28.** Resumen del análisis del contenido de glicerol.
- 112 | **Figura 29.** Resumen del análisis del contenido de fenol.
- 131 | **Figura 30.** A) SDS-PAGE. 1 – Desengrasado; 2 – No desengrasado. (B) WESTERN BLOT. 1 – Desengrasado; 2 – No desengrasado.

- 132 | **Figura 31.** Perfil proteico de las diferentes materias primas testadas. (A) Cacahuete tostado 1; (B) Cacahuete tostado 2; (C) Cacahuete crudo 3; (D) Cacahuete crudo 4. H: Fracción hidrosoluble; L: Fracción liposoluble.
- 133 | **Figura 32.** Dot blot de las diferentes fracciones del cacahuete, incubadas con un *pool* de sueros de pacientes no alérgicos al cacahuete y con PBS-Tween 0,5%.
- 133 | **Figura 33.** Perfil alergénico de las diferentes materias primas testadas. (A) Cacahuete tostado 1; (B) Cacahuete tostado 2; (C) Cacahuete crudo 3; (D) Cacahuete crudo 4. H: Fracción hidrosoluble; L: Fracción liposoluble.
- 134 | **Figura 34.** ELISA inhibición cacahuete tostado fracción hidrosoluble 1 vs. cacahuete tostado fracción hidrosoluble 2 y cacahuete tostado fracción liposoluble 1 vs. cacahuete tostado fracción liposoluble 2.
- 135 | **Figura 35.** Una foto de los cuerpos oleosos del cacahuete que, purificados, flotan en la parte superior y forman una capa después de la centrifugación.
- 135 | **Figura 36.** Microscopía de luz de los cuerpos oleosos aislados de los cacahuetes. (A) 40x; (B) 120x.
- 137 | **Figura 37.** Perfil proteico de la fracción hidrosoluble. (A) SDS-PAGE y (B) 2D-PAGE.
- 137 | **Figura 38.** Antigenograma de la fracción hidrosoluble. (A) 1 dimensión y (B) 2 dimensiones.
- 138 | **Figura 39.** Actividad enzimática fracción hidrosoluble.
- 139 | **Figura 40.** Perfil proteico de la fracción liposoluble. (A) SDS-PAGE y (B) 2D-PAGE.
- 140 | **Figura 41.** Antigenograma de la fracción liposoluble. (A) 1 dimensión y (B) 2 dimensiones.

- 140 | **Figura 42.** Actividad enzimática fracción liposoluble.
- 143 | **Figura 43.** (A) Histograma de sensibilización de los pacientes a otros frutos secos. (B) Gráfico circular de tolerancia de los pacientes a los cacahuets.
- 145 | **Figura 44.** Histograma que muestra los síntomas de los pacientes tras la ingesta de cacahuets.
- 145 | **Figura 45.** Gráfico circular que muestra el motivo de la reacción de los pacientes a los cacahuets.
- 148 | **Figura 46.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana del ratio de la pápula obtenido con la prueba cutánea para la fracción hidrosoluble y liposoluble en los pacientes seleccionados y los controles. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con prueba positiva para cada fracción.
- 150 | **Figura 47.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana de la IgE específica de la fracción hidrosoluble y liposoluble en los pacientes seleccionados y los controles. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con IgE específica positiva para cada fracción.
- 151 | **Figura 48.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana de la IgE específica de los distintos componentes analizados del cacahuete en los pacientes seleccionados. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con IgE específica positiva para cada componente.
- 152 | **Figura 49.** En el eje de la izquierda, representación de la sensibilización (kUA/L) por edades frente a los componentes testados Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9, la fracción hidrosoluble y liposoluble. En el eje de la derecha, representación de los niveles de IgE total de dichos pacientes (kU/L).

- 153 | **Figura 50.** Representación de la mediana de los niveles de IgE específica de la fracción hidrosoluble y liposoluble dependiendo de la gravedad de la reacción.
- 154 | **Figura 51.** Western blot de todos los pacientes frente a la fracción hidrosoluble del cacahuete. Con un asterisco los pacientes que presentaron una reacción grave (4-5).
- 154 | **Figura 52.** Western blot de todos los pacientes frente a la fracción liposoluble del cacahuete. Con un asterisco los pacientes que presentaron una reacción grave (4-5).
- 155 | **Figura 53.** Inespecificidad de la técnica de liberación de histamina. (A) Fracción hidrosoluble y (B) Fracción liposoluble.
- 157 | **Figura 54.** Representación de la mediana de la liberación de histamina (ng/mL) de los pacientes y los controles para la fracción hidrosoluble y liposoluble.
- 158 | **Figura 55.** Curva ROC para las fracciones hidrosoluble y liposoluble entre los pacientes y el grupo control.
- 159 | **Figura 56.** Representación de la mediana de liberación de histamina de la fracción hidrosoluble y liposoluble, dependiendo de la gravedad de la reacción.





## ÍNDICE DE TABLAS

4		<b>Tabla 1.</b>	Hitos históricos en el conocimiento de la alergia.
6		<b>Tabla 2.</b>	Definición de algunos términos utilizados en alergia. Modificada de Akdis, <i>et al.</i> , 2014.
7		<b>Tabla 3.</b>	Tipos de hipersensibilidad - clasificación Gell y Coombs. Modificada de Doan, <i>et al.</i> , 2007.
13		<b>Tabla 4.</b>	Receptores de la IgE
16		<b>Tabla 5.</b>	Características de las moléculas de clase I y clase II del CMH.
25		<b>Tabla 6.</b>	Características y efectos de las interleuquinas más importantes.
26		<b>Tabla 7.</b>	Productos liberados por mastocitos y basófilos.
28		<b>Tabla 8.</b>	Cromosomas involucrados en la alergia. Modificado de Muñoz-López, 2011.
33		<b>Tabla 9.</b>	Algunas de las asociaciones de pacientes más activas en España.
35		<b>Tabla 10.</b>	Pruebas cutáneas en el diagnóstico de la alergia. Modificada de <i>Global Atlas of Allergy</i> , 2014.
37		<b>Tabla 11.</b>	Bases de datos de alérgenos/proteínas. Modificada de <i>Global Atlas of Allergy</i> , 2014.
39		<b>Tabla 12.</b>	Fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.
51		<b>Tabla 13.</b>	Definiciones de desensibilización, falta de respuesta sostenida, remisión y tolerancia oral. Modificada de Burks, <i>et al.</i> , 2018.
57		<b>Tabla 14.</b>	Alérgenos de los principales frutos secos.
61		<b>Tabla 15.</b>	Oleosinas registradas en la WHO/IUIS.
64		<b>Tabla 16.</b>	Nutrientes del cacahuete. Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

67		<b>Tabla 17.</b>	Lista de alérgenos del cacahuete registrados en la WHO/IUIS.
74		<b>Tabla 18.</b>	Ensayos clínicos con cacahuete. Modificada de Palladino, <i>et al.</i> , 2018.
86		<b>Tabla 19.</b>	Características de las materias primas a estudiar.
88		<b>Tabla 20.</b>	Protocolo de liofilización.
99		<b>Tabla 21.</b>	Protocolo Primera Dimensión 2D-PAGE.
108		<b>Tabla 22.</b>	Relación de aspecto tras una reacción enzimática positiva.
118		<b>Tabla 23.</b>	Indicaciones y contraindicaciones de la P.O.C.
120		<b>Tabla 24.</b>	Clasificación de las clases de los sueros.
122		<b>Tabla 25.</b>	Mezcla de reacción molecular de la biotina-7-NHS.
136		<b>Tabla 26.</b>	Propiedades físico-químicas de la fracción hidrosoluble.
138		<b>Tabla 27.</b>	Propiedades físico-químicas de la fracción liposoluble.
141		<b>Tabla 28.</b>	Características físico-químicas y microbiológicas del diagnóstico para <i>prick test</i> de la fracción hidrosoluble.
142		<b>Tabla 29.</b>	Características físico-químicas y microbiológicas del diagnóstico para <i>prick test</i> de la fracción liposoluble.
144		<b>Tabla 30.</b>	Características de los pacientes.
146		<b>Tabla 31.</b>	Características de los sujetos del grupo control.
147		<b>Tabla 32.</b>	Resultado de los <i>prick test</i> con histamina, fracción hidrosoluble y fracción liposoluble y resultado de la provocación oral controlada.
149		<b>Tabla 33.</b>	Determinación de IgE total (kU/L) y de IgE específica (kUA/L) de los diferentes componentes del cacahuete.
151		<b>Tabla 34.</b>	Significación estadística entre las IgE específicas de los distintos componentes.
156		<b>Tabla 35.</b>	Liberación de histamina con 2,5 ng/mL de alérgeno.

158	<b>Tabla 36.</b>	Datos de las curvas ROC de las fracciones hidrosoluble y liposoluble entre los pacientes y el grupo control.
160	<b>Tabla 37.</b>	Resumen de los resultados obtenidos con las diferentes pruebas diagnósticas realizadas.
161	<b>Tabla 38.</b>	Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción hidrosoluble del cacahuete.
161	<b>Tabla 39.</b>	Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción liposoluble del cacahuete.
162	<b>Tabla 40.</b>	Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción hidrosoluble y liposoluble del cacahuete.



# INTRODUCCIÓN





# **LA ENFERMEDAD ALÉRGICA**

## **PERSPECTIVA HISTÓRICA**

Las enfermedades alérgicas se conocen desde la antigüedad, pudiéndose encontrar referencias a su diagnóstico y tratamiento en textos de las culturas hebrea y greco-romana, incluso en escritos de la antigua China, Mesopotamia e India (Tabla 1).

El médico árabe Rhazes (865-932) realizó en su obra “*Una disertación sobre la causa del coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume*” [Lain Entralgo, 1982] la primera descripción en la historia de la medicina de la rinitis alérgica estacional producida por el polen. Esta misma relación entre floración, primavera y síntomas fue descrita por Lusitanus en el año 1556, el cual atribuyó la presencia de estornudos en algunos individuos al hecho de oler el perfume de las rosas.

En el año 1565, Botallus acuña el término catarro o mal de las rosas, para designar los síntomas que presentaban sus pacientes al oler determinadas flores, como las rosas: cefalea, prurito nasal y estornudos.

En el año 1819, el médico inglés Bostock introdujo en la literatura médica el término fiebre del heno, que desbancó al término catarro de las rosas, para definir una afección periódica de los ojos y los bronquios que presentaban sus pacientes, atribuyendo erróneamente la génesis del proceso a la exposición al calor y a la luz del sol [Bostock, 1828; Olaguibel Rivera, 2006].

Las primeras sospechas del polen como causa de la fiebre del heno fueron documentadas por Wyman en el año 1872 [Wyman, 1872], pero fue Blackley un año más tarde [Blackley, 1873] el que relacionó directamente la intensidad de sus síntomas, ya que era alérgico, con el recuento de polen atmosférico que él mismo realizaba.

La palabra “alergia” deriva del griego y significa capacidad de reacción modificada. El empleo de este término tal y como se conoce hoy en día se debe a Clemens von Pirquet, que lo utilizó por primera vez en 1906 en el *Münchener Medizinische Wochenschrift* [Pirquet, 1906] como una “reactividad específicamente alterada del organismo”.



## 4 | INTRODUCCIÓN

**Tabla 1**

*Hitos históricos en el conocimiento de la alergia.*

Año	Autor/es	Avances/Descripción
~3000 a.C	Egipto	Muerte del faraón Menes por la picadura de una avispa
~900 d.C	Rhazes	Primera descripción médica de la rinitis alérgica estacional
1556	Lusitanus	Descripción de estornudos al inhalar el perfume de las rosas
1565	Botallus	Descripción del catarro o mal de las rosas
1828	Bostock	Introducción del término fiebre del heno
1872	Wyman	El polen como posible causa de la fiebre del heno
1873	Blackley	Relación directa entre sintomatología alérgica y recuento de polen
1906	Von Pirquet	Introducción del término alergia
1921	Prausnitz & Küstner	Transferencia pasiva de la sensibilidad a personas sanas mediante el suero de individuos alérgicos
1923	Fernández-Coca	Introducción del término atopia
1966	Ishizaka <i>et al.</i> Johansson y Bennich	Identificación de los anticuerpos IgE

Von Pirquet propone el término alergia para definir las alteraciones clínicas temporales (cuantitativas o cualitativas) de la capacidad de reacción del organismo y así hacer una distinción entre los diferentes fenómenos inmunológicos, como pueden ser la inmunidad frente a trasplantes o la anafilaxia, descrita por Richet y Portier unos años antes [Portier y Richet, 1902]. Los conceptos de hipersensibilidad e inmunidad definidos por von Pirquet siguen en vigor.

En 1921, Prausnitz y Küstner observaron que la sensibilidad a determinados alérgenos podía ser transferida a una persona sana mediante la inyección del suero de un individuo alérgico [Prausnitz y Küstner, 1921]. A este factor sérico, capaz de ocasionar hipersensibilidad, se le dio el nombre de reagina y durante mucho tiempo la reacción de Prausnitz-Küstner fue el único método para detectar y medir la actividad reagínica del suero. Más tarde, hacia finales de la década de los 60, los trabajos pioneros de Ishizaka y colaboradores, junto con Johansson y Bennich identificaron este factor reagínico como un nuevo tipo de inmunoglobulina: la IgE (E, de eritema) [Ishizaka, *et al.*, 1966; Johansson y Bennich, 1967].

El descubrimiento de la IgE permitió el desarrollo de técnicas *in vitro* para medir la respuesta inmune en pacientes con alergia, cayendo en desuso la reacción de Prausnitz-Küstner debido al riesgo de transmisión de infecciones, como la hepatitis viral o el virus de la inmunodeficiencia humana.

En España, el gran impulsor del estudio de las enfermedades alérgicas fue Jiménez Díaz, que publicó en 1932 el tratado "*El asma y otras enfermedades alérgicas*" [Jiménez-Díaz, 1932]. En el año 1948 funda la Sociedad Española de Alergia, predecesora de la actual Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC, <http://www.seaic.org>) junto a los Doctores Lahoz Marqués y Farrerons Co.

## DEFINICIÓN

La función básica del sistema inmunitario es el reconocimiento y producción de defensas frente a moléculas o sustancias extrañas con capacidad para provocar daño al organismo. Así mismo, debe ser capaz de reconocer sustancias propias (autotolerancia) frente a las que no debe reaccionar. Existe un equilibrio constante entre estas dos respuestas. Cuando la autotolerancia se pierde se producen respuestas inmunitarias inadecuadas o deletéreas para el propio organismo, con la consiguiente aparición de enfermedades (autoinmunidad, alergia).

Existen varias definiciones para el término *alergia* y éstas han ido evolucionando a lo largo de los años. Tras la primera definición por parte de von Pirquet, tal y como se ha mencionado anteriormente, en el tercer Congreso de Alergología en París en 1958, Lund recoge el término de alergia como una capacidad adquirida, cualitativamente alterada del tejido vivo para reaccionar frente a un alérgeno específico.

Años más tarde, un consenso entre la mayoría de los autores definió la alergia como una alteración específica de la respuesta inmune que conduce a una hipersensibilidad patógena [Van Cauwenberge, *et al.*, 2000].

Finalmente, en 2004 y para garantizar una comunicación clara entre los profesionales de la salud, la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI) junto con la Organización Mundial de la Alergia (WAO) proponen como definición:

***“La alergia es una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos”*** [Johansson, *et al.*, 2001, 2004].

## 6 | INTRODUCCIÓN

Existen una serie de términos que se han utilizado a lo largo de los años para describir el fenómeno alérgico y que al igual que ocurrió con la alergia han sido estandarizados para su correcto uso (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Definición de algunos términos utilizados en alergia. Modificada de Akdis, et al., 2014.*

<b>Concepto</b>	<b>Definición</b>
Sensibilidad	Respuesta normal frente a un estímulo.
Hipersensibilidad	Fuerte respuesta anormal frente a un estímulo.
Sensibilización	Desarrollo de sensibilidad exagerada tras repetidos contactos.
Anafilaxia	Reacción de hipersensibilidad grave sistémica o generalizada que pone en peligro la vida.
Atopia	Tendencia a producir anticuerpos IgE contra sustancias ambientales que conducen a síntomas clínicos.

En general, los alérgenos son proteínas o glicoproteínas de baja masa molecular (5-200 kDa) con una elevada estabilidad y solubilidad en los fluidos corporales. Se encuentran presentes en diversas fuentes biológicas, como los pólenes, epitelios de animales, ácaros del polvo, venenos de insectos, alimentos, hongos o látex [Kay, 2008]. Los diferentes síntomas clínicos y tipos de alergias vienen determinados por la vía de acceso del alérgeno al organismo: el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, la piel y/o mediante la picadura de un insecto o la inyección de un fármaco [Kay, 2008].

Las manifestaciones clínicas, que se pueden presentar aisladas o en combinación, incluyen reacciones locales, asma, rinoconjuntivitis, sinusitis, trastornos gastrointestinales, dermatitis atópica, urticaria y angioedema, así como reacciones sistémicas severas como el shock anafiláctico, que puede comprometer la vida del paciente.

Si bien el término alergia engloba los cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad que inicialmente describieron y propusieron Gell y Coombs [Gell y Coombs, 1963; Doan, et al., 2007], cuando se utiliza dicho término se hace habitualmente para referirse a las reacciones de hipersensibilidad de tipo I y IV (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Tipos de hipersensibilidad - clasificación Gell y Coombs. Modificada de Doan, et al., 2007.*

Tipo	Sinónimos	Enfermedad	Mediadores
I	Atopia, anafilaxia, alergia.	Reacciones alérgicas, anafilaxia, asma.	Anticuerpos IgE
II	Citotóxica.	Anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia, eritroblastosis fetal, síndrome de Goodpasture y miastenia Gravis.	IgM o IgG ± complemento
III	Enfermedad del complejo inmune.	Enfermedad del suero, reacción de Arthus, lupus eritematoso sistémico.	IgG ± complemento
IV	Hipersensibilidad mediada por células.	Dermatitis de contacto, tuberculosis, rechazo crónico de injerto.	Células, anticuerpo-independiente.

La *hipersensibilidad de tipo I* también denominada hipersensibilidad inmediata (Figura 1) ocurre rápidamente, minutos después de la exposición al antígeno y siempre involucra una degranulación IgE mediada de basófilos y mastocitos. El resultado es una contracción del músculo liso, hipovolemia, vasodilatación de capilares y activación de leucocitos. Requiere la sensibilización previa a un alérgeno, es decir, la producción de anticuerpos IgE específicos frente a dicho alérgeno tras un contacto previo.

Las manifestaciones clínicas dependen del lugar donde se haya producido el contacto entre el alérgeno y el mastocito sensibilizado y será en ese tejido donde se liberen los mediadores y se manifieste la enfermedad, siendo las más frecuentes las siguientes:

- **Rinitis:** el contacto entre el alérgeno y el mastocito tiene lugar en las vías respiratorias superiores, induciendo edema en la mucosa, rinorrea, estornudos y conjuntivitis con o sin prurito ocular. El mediador más importante que actúa es la histamina [Bousquet, *et al.*, 2001].
- **Conjuntivitis:** habitualmente asociada a la rinitis, por lo que el término más correcto es rinoconjuntivitis y se caracteriza por lagrimeo, prurito, enrojecimiento, dolor, edema y escozor de los ojos [Bielory, 2000].

## 8 | INTRODUCCIÓN

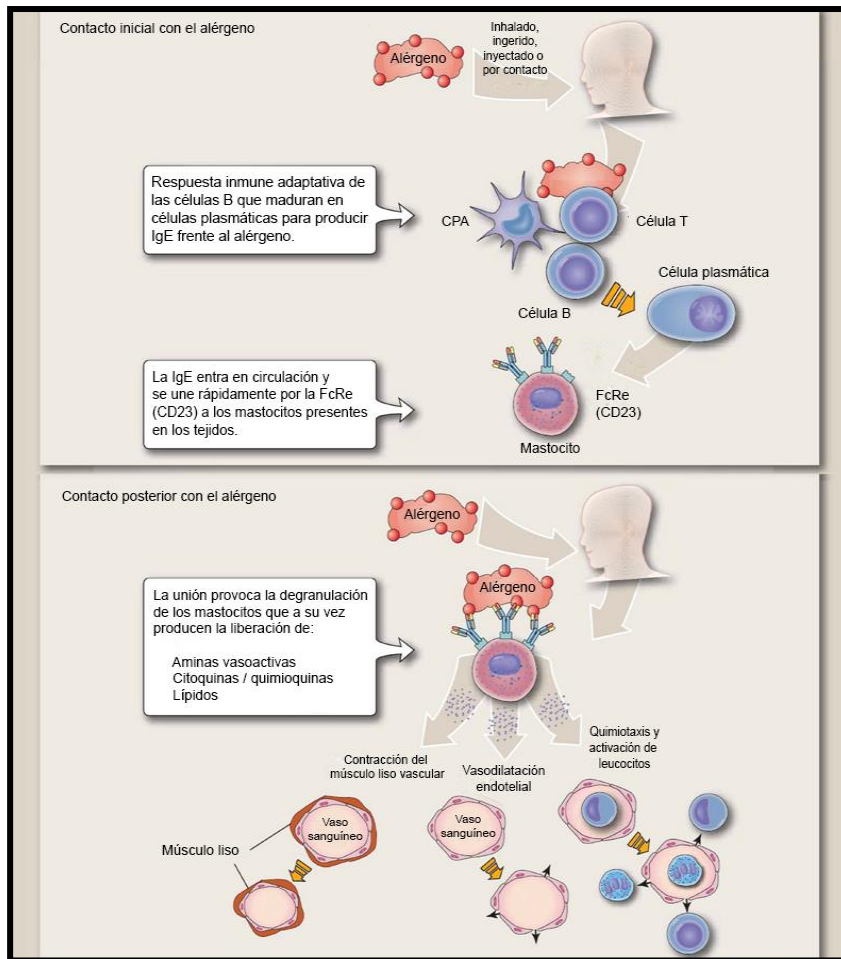
- **Asma:** consiste en inflamación y broncoconstricción reversible de las vías respiratorias inferiores con sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos. Su causa es la hipersecreción de moco, la hipertrofia de la musculatura lisa bronquial y la secreción de citoquinas que producen infiltración de linfocitos Th2 y eosinófilos en la submucosa [Aas, 1973; *Global Initiative for Asthma*, 2018].
- **Dermatitis:** engloba una serie de enfermedades relacionadas con la inflamación de la piel. En este caso, la que está mediada por IgE se conoce como eczema atópico o dermatitis atópica, aunque este último término no es el correcto. El mecanismo inmunológico implicado no se encuentra totalmente definido [Schmid, *et al.*, 2001; Darsow y Ring, 2002; Johansson y Bieber, 2002].
- **Alergia alimentaria:** se produce por alérgenos ingeridos que interaccionan con los mastocitos de la mucosa y la submucosa intestinal, liberando mediadores e incrementando el peristaltismo y la secreción de moco por las células caliciformes. Se manifiesta con vómitos, diarreas, edema de la mucosa e incluso reacciones sistémicas [Ortolani, *et al.*, 1999; Sampson, 2015].
- **Urticaria:** se produce por contacto directo de la piel con el alérgeno, por su ingestión y por inyección. El alérgeno entra en contacto con los mastocitos y se degranulan en el tejido conjuntivo produciendo habones o ronchas [Greaves, 2000].
- **Alergia a medicamentos:** este tipo de alergia mediada por IgE representa un bajo porcentaje del total de reacciones relacionadas con medicamentos, siendo las no alérgicas las más frecuentes. El mecanismo inmunológico es a menudo difícil de identificar dado que el alérgeno puede ser un producto de degradación de bajo peso molecular que actúa como un hapteno [Demoly, *et al.*, 2014].
- **Reacción sistémica:** también denominada anafilaxia. Se produce cuando el alérgeno contacta con los mastocitos de manera sistémica, es decir, en varios tejidos. Su degranulación provoca vasodilatación generalizada y edema con hipotensión arterial (shock anafiláctico). Para revertir esta situación, que puede llegar a ser mortal, se administra adrenalina [Ring y Behrendt, 1999].
- **Alergia por picadura o mordedura de insectos:** la gran cantidad de alérgenos presentes en el veneno inoculado tras una picadura es comparable a años de polen inhalado, lo que explica la gravedad de los síntomas, que pueden ser locales (lesiones dolorosas y a veces pruriginosas) o sistémicos [Tankersley y Ledford, 2015].

En la *hipersensibilidad de tipo IV*, el sistema inmunitario compromete a las células propias sin necesidad de anticuerpos. Estas reacciones incluyen dermatitis de contacto (Figura 2.A), reacciones tardías (Figura 2.B) y en ocasiones respuestas de los linfocitos T CD8+ (Figura 2.C). El resultado es destrucción de tejido y la lisis de células que están modificadas químicamente o que presentan diferentes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

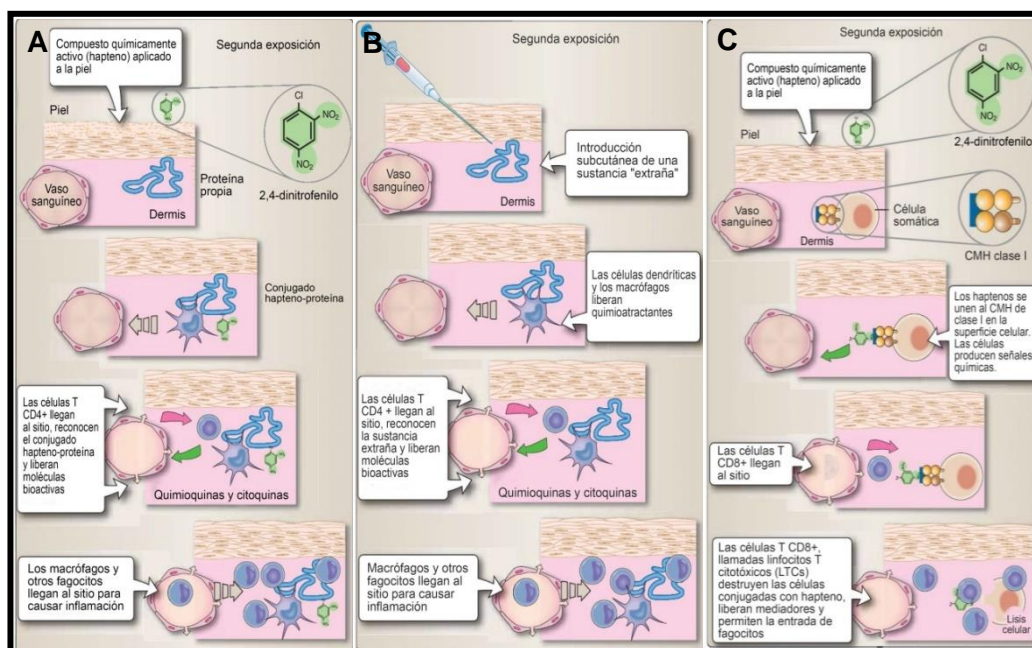
En la dermatitis de contacto, las sustancias químicamente reactivas pueden ser absorbidas a través de la epidermis, donde se unen a las proteínas. Como potenciales sensibilizadores de contacto se pueden incluir productos químicos sintéticos, productos vegetales y ciertos metales. En general, por sí mismos son demasiado pequeños (<10.000 Da) para ser reconocidos por el sistema inmune, por lo que suelen interactuar con proteínas del propio organismo para formar neoantígenos en estas proteínas. La primera exposición aguda a un sensibilizador de contacto a menudo ocurre sin incidente aparente. Después de siete o más días, la reexposición o exposición crónica provoca una inflamación localizada de la dermis.

Las respuestas de hipersensibilidad tardía (DTH por sus siglas en inglés) ocurren en personas sensibilizadas en un reencuentro no tóxico con el antígeno. En general, son estimuladas por parásitos intracelulares como bacterias, hongos y virus. La respuesta de hipersensibilidad ocurre tras una nueva exposición al antígeno estimulante. La reexposición generalmente debe ocurrir más de 1 semana después del primer encuentro antigénico. Al igual que las respuestas en la dermatitis de contacto, las respuestas ocurren 24-72 horas después de la re-estimulación. Las respuestas DTH no son limitadas a la dermis, pueden ocurrir en el resto del cuerpo.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV están mediadas por linfocitos T CD8+. Estos LT<sub>c</sub> responden frente a agentes químicos reactivos (haptenos) que pasan a través de la membrana celular y se unen a proteínas citoplásmicas para producir neoantígenos. Los péptidos derivados de las proteínas “haptenas” son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I para sensibilizar y provocar una respuesta de los linfocitos T citotóxicos.



**Figura 1.** Hipersensibilidad tipo I. Modificada de Doan, *et al.*, 2007.



**Figura 2.** Hipersensibilidad tipo IV. (A) Dermatitis de contacto, (B) Reacción tardía y (C) Respuesta de linfocitos T citotóxicos. Modificada de Doan, *et al.*, 2007.

## INMUNOGLOBULINA E. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN

La inmunoglobulina E es un tipo de anticuerpo presente exclusivamente en mamíferos [Aveskogh y Hellman, 1998; Vernerissson, *et al.*, 2002; Hellman, *et al.*, 2017], circula como un anticuerpo bivalente y normalmente está presente en concentraciones inferiores a 1 pg/mL (representa el 0,002% del total de las inmunoglobulinas circulantes).

En condiciones patológicas, como en las infecciones por helmintos y en la atopia grave, esta concentración puede aumentar por encima de 1000 pg/mL. Es uno de los principales componentes de la hipersensibilidad inmediata [Abbas, *et al.*, 2014].

La IgE sérica tiene una vida media muy corta, entre 2 y 3 días, sin embargo, una vez que se fija a los mastocitos, basófilos o a las células de Langerhans, su vida media aumenta hasta varias semanas. La capacidad de fijación del complemento a la IgE es muy limitada y, si se realiza, se hace mayoritariamente por la vía clásica.

La IgE en humanos se asocia a las superficies mucosas y en particular al tracto respiratorio, aunque se desconoce la existencia de un mecanismo de transporte activo de la inmunoglobulina hacia las superficies mucosas. Sin embargo, los datos de Johansson [Johansson y Deuschl, 1976] son muy significativos, revelando mayores concentraciones de IgE e IgG en muestras de exudados de lavados nasales que en muestra séricas.

La IgE tiene una estructura monomérica y, al igual que todas las inmunoglobulinas, está compuesta por cuatro cadenas glicoprotéicas idénticas dos a dos. Las cadenas pesadas o "H" con un peso molecular aproximado de entre 50 y 75 kDa y las cadenas ligeras o "L" con un peso molecular de unos 25 kDa.

La IgE es el isotipo de anticuerpos que contiene la cadena pesada  $\epsilon$ , en contraposición al resto de inmunoglobulinas, IgA, IgG, IgD e IgM cuyas cadenas pesadas son  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\mu$  respectivamente. Hay dos isotipos de cadena ligera,  $\lambda$  y  $\kappa$ , que con independencia de clases y subclases solo presentan un 30% de homología.

Cada una de las cadenas H o L está subdividida en una región amino-terminal variable (V) y una región carboxi-terminal constante (C). Los dominios V, tanto de la cadena pesada como de la ligera, presentan regiones con secuencias relativamente conservadas, denominadas regiones marco (FR) y regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de complementareidad (CDR). Las regiones FR y CDR están intercaladas a lo largo de la región V [Poljak, 1991].

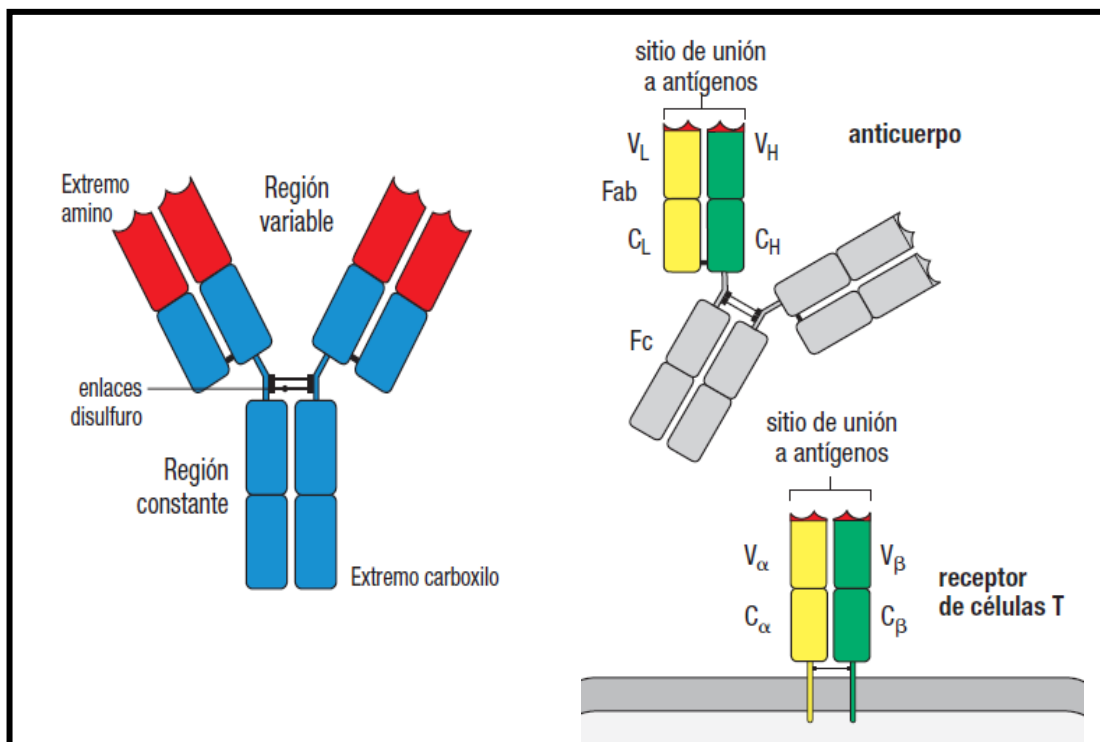


## 12 | INTRODUCCIÓN

En resumen, se puede decir que los determinantes isotípicos, que se localizan en las regiones carboxi-terminal constantes de las cadenas H y L, clasifican a las inmunoglobulinas en clases y subclases, según los diferentes tipos de cadena H encontrados en humanos.

La asociación entre las cadenas ligera y pesada implica tanto interacciones covalentes como no covalentes. Las interacciones covalentes son puentes disulfuro formados entre residuos de cisteínas del extremo carboxi-terminal de la cadena ligera y del dominio C<sub>H1</sub> de la cadena pesada. Las interacciones no covalentes constan principalmente de interacciones hidrófobas entre los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> y entre el dominio C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub> (Figura 3). Esta asociación de los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> produce una posición espacial tal que cada uno de los dominios V yuxtapuestos pueden contribuir a la unión del antígeno.

Cada molécula de IgE posee dos regiones de unión al antígeno, llamados Fab (*Fragment antigen-binding*), que corresponden a los fragmentos de inmunoglobulina formados por una cadena L completa y una porción V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> de una cadena H. El otro fragmento de inmunoglobulina es el llamado Fc (*Fragment crystallizable*), al que se le atribuyen las funciones efectoras de las inmunoglobulinas ya que presenta uno o varios sitios que se enlazan a proteínas del complemento y que es expuesto cuando ocurre la interacción antígeno-anticuerpo [Padlan, 1994; Han, *et al.*, 1995].



**Figura 3.** Estructura de la IgE. Modificada de Kenneth, 2016.

La IgE existe, tanto asociada a la membrana de las células B, como de manera libre en el plasma (IgE sérica). La principal función de la IgE es la fijación a sus receptores específicos. Los receptores han sido identificados y clasificados en tres tipos: Fc $\epsilon$ RI; Fc $\epsilon$ RII y  $\epsilon$ BP, cuya distribución es heterogénea (Tabla 4).

El receptor de la IgE mejor estudiado es el Fc $\epsilon$ RI, receptor de alta afinidad, que se expresa constitutivamente en la superficie de los mastocitos y basófilos. La constante de disociación ( $K_d$ ) del Fc $\epsilon$ RI para la IgE es aproximadamente de  $1 \times 10^{-10}$  M, esta unión es mucho más fuerte que la de cualquier otro receptor Fc para su ligando.

Por lo tanto, la concentración de IgE sérica, aunque bastante baja si se compara con otros isotipos de inmunoglobulinas en sujetos normales, es suficientemente alta para permitir la unión a los receptores Fc $\epsilon$ RI. Se estima que el número de receptores Fc $\epsilon$ RI de la superficie de los mastocitos puede llegar a los 100.000.

**Tabla 4**

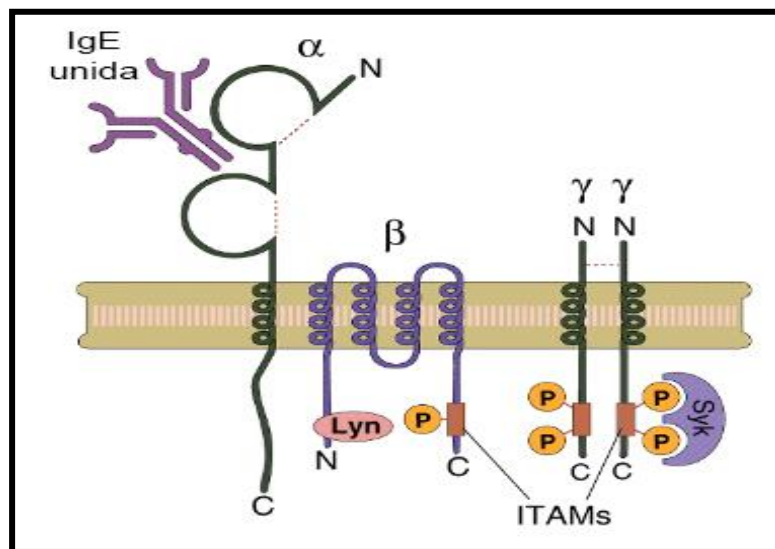
*Receptores de la IgE.*

Molécula	Denominación	Composición	Naturaleza de la unión	Tipos celulares
Fc $\epsilon$ RI	Receptor de alta afinidad	Cuatro cadenas polipeptídicas	La cadena se une a $\epsilon$ C <sub>H3</sub>	Mastocitos Basófilos C. Langerhans
Fc $\epsilon$ RII: $\alpha$ o $\beta$	CD23	Proteína de membrana de 30 kDa relacionada con la familia de las lectinas C de mamíferos	Se une a C <sub>H2-4</sub>	CD23a en células B CD23b en monocitos Eosinófilos
$\epsilon$ BP	Galectina 3	Lectina de 35 kDa	Se une a la cadena $\epsilon$ por los restos de los carbohidratos	Mastocitos Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos C. Langerhans

Cada molécula de Fc $\epsilon$ RI contiene cuatro polipéptidos separados, uno  $\alpha$ , uno  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$  idénticas. Las tres subunidades deben estar presentes para que el receptor se exprese en la superficie celular. La cadena  $\alpha$ , que media la unión con la IgE, tiene un tamaño de 25 kDa.

Cada cadena  $\alpha$  del Fc $\epsilon$ RI posee una secuencia hidrófoba de 20 aminoácidos, que se estima que atraviesa una vez la membrana celular, y aproximadamente unos 20 aminoácidos en el extremo carboxiterminal que forman un dominio citoplasmático [Al-Lazikani, *et al.*, 2000].

La cadena  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI es un polipéptido de 26 kDa cuya estructura atraviesa la membrana cuatro veces. Ambos, tanto el extremo aminoterminal como el carboxiterminal se localizan en el citoplasma. El extremo carboxiterminal contiene un único motivo de activación del inmunoreceptor vía tirosina (ITAM). Las dos cadenas polipeptídicas  $\gamma$  idénticas tienen sólo 7 kDa. Cada cadena atraviesa la membrana una sola vez, y cada una contiene un motivo ITAM (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura del receptor Fc $\epsilon$ RI. Modificada de Abbas, *et al.*, 2014.

El receptor Fc $\epsilon$ R2 o CD23 se le conoce como receptor de baja afinidad. Es una proteína de 30 kDa relacionada con las lectinas de tipo C de los mamíferos. En humanos existen dos formas, la a y la b, debido al procesamiento alternativo del ARNm a partir del mismo gen. El receptor CD23a es específico de las células B y se expresa constitutivamente. El receptor CD23b es inducido por la IL-4 en una gran variedad de células hematopoyéticas y en las células epiteliales. El CD23b media la fagocitosis dependiente de los anticuerpos IgE en los macrófagos. Tanto el CD23a como el CD23b pueden funcionar como moléculas de adherencia en el tráfico celular.

El tercer tipo de receptor  $\epsilon$ BP o Galectina 3 es otro receptor de baja afinidad. Es una lectina de 35 kDa. No es un receptor transmembrana, sino que se encuentra presente en el citoplasma de los fagocitos mononucleares y de otras células, y puede participar en la muerte mediada por macrófagos.

## COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o MHC por sus siglas en inglés) es una región de diferentes genes polimórficos cuyos productos, a los cuales se les denomina HLA por sus siglas en inglés (*Human Leukocyte Antigens*), se expresan en la superficie de varias células. Esta región se encuentra situada en el cromosoma 6p21.3<sup>17</sup> [Dunham, *et al.*, 1987]. Los genes del CMH desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos, ya que los linfocitos T específicos para un antígeno no lo reconocen en su forma libre ni en la soluble, sino que reconocen diferentes péptidos del antígeno que están unidos de forma no covalente a productos génicos del CMH.

Hay dos tipos diferentes de productos de los genes del CMH denominados moléculas de clase I y de clase II (Tabla 5). Las moléculas de clase I están formadas por una cadena  $\alpha$  (o pesada) unida de forma no covalente a un polipéptido no polimórfico denominado microglobulina  $\beta_2$ . Las moléculas de clase II contienen dos cadenas polimórficas codificadas por el CMH, una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Ambas clases de moléculas tienen una estructura similar y están constituidas por una hendidura de unión al péptidos, una región no polimórfica tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y una región citoplásmica [Penn y Potts, 1999; Marsh, *et al.*, 2010].

La hendidura de unión al péptido de las moléculas del CMH está formada por hélices  $\alpha$  laterales y por una lámina de ocho hebras antiparalelas plegadas en forma  $\beta$ . La hendidura de unión al péptido de las moléculas de clase I está formada por los segmentos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la cadena pesada, mientras que la hendidura de las moléculas de clase II está formada por los segmentos  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de las dos cadenas. Los dominios tipo Ig de las moléculas de clase I y clase II contienen los sitios de unión para los correceptores CD8 y CD4 de las células T, respectivamente (Figura 5).

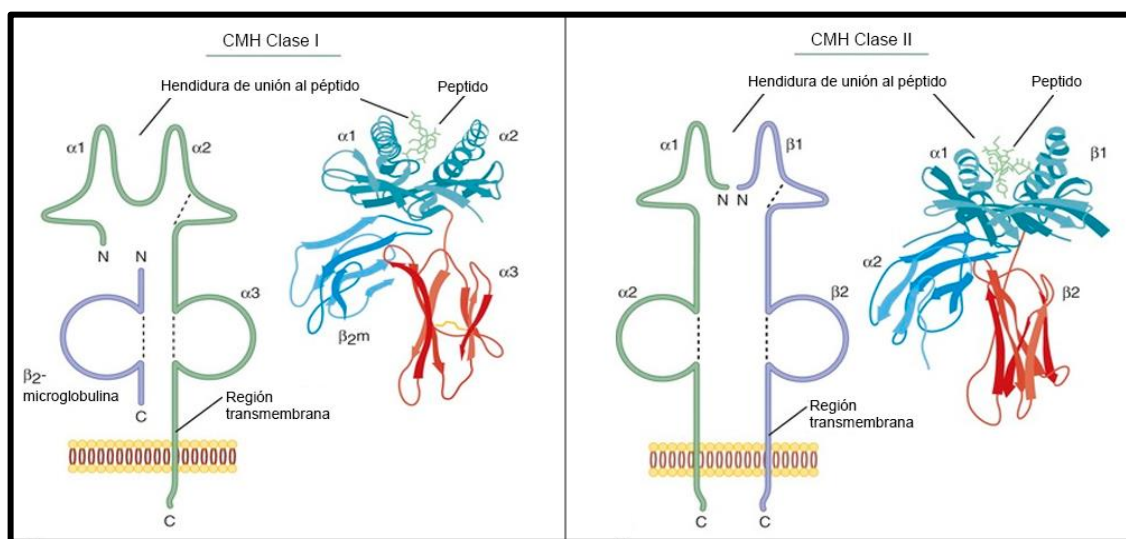
Las moléculas del CMH se unen a un único péptido cada vez, y todos los péptidos que se unen a una molécula del CMH concreta comparten motivos estructurales comunes. La unión al péptido es de baja afinidad ( $K_d \sim 10^{-6}$  M) y la velocidad de disociación es muy lenta, de manera que los complejos, una vez formados, persisten el tiempo suficiente para ser reconocidos por las células T [Buslepp, *et al.*, 2001].

Las moléculas de clase I se expresan en todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de clase II se expresan principalmente en células presentadoras de antígenos especializadas, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, y en algunos otros tipos celulares tales como las células endoteliales y las células epiteliales del timo.

**Tabla 5**

*Características de las moléculas de clase I y clase II del CMH.*

Característica	Clase I del CMH	Clase II del CMH
Cadenas polipeptídicas	$\alpha$ (44-47 kDa) Microglobulina $\beta_2$ (12 kDa)	$\alpha$ (32-34 kDa) $\beta$ (29-32 kDa)
Localización de los residuos polimórficos	Dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$	Dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$
Sitio de unión para el correceptor de las células T	La región $\alpha 3$ se une a CD8	La región $\beta 2$ se une a CD4
Tamaño de la hendidura de unión al péptido	Encajan péptidos de 8-11 residuos	Encajan péptidos de 10-30 residuos o más
Nomenclatura en el ser humano	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP
Ratón	H-2K, H-2D, H-2L	I-A, I-E



**Figura 5.** Estructura de una molécula de clase I y clase II del CMH. Modificada de Abbas, et al., 2014.

Otros genes incluidos dentro del CMH codifican componentes del complemento (por ejemplo, C2, C4 y factor B) y citoquinas (por ejemplo, el TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), con funciones importantes en la inmunidad. Estos genes se localizan en la llamada región del CMH de “clase III” [Alper, *et al.*, 2006; Kenneth, 2016].

## TIPOS CELULARES

Tal y como se ha descrito anteriormente, los receptores de alta afinidad para la IgE (Fc $\epsilon$ RI) se encuentran en la membrana de mastocitos, basófilos y eosinófilos.

Los mastocitos derivan de células madre pluripotenciales de la médula ósea, circulan por la sangre como precursores inmaduros y se diferencian en los diferentes tejidos periféricos por la acción de distintos factores de crecimiento locales. Están distribuidos por todo el organismo, fundamentalmente en lugares que tienen contacto con el exterior (piel y mucosas conjuntival, respiratoria y digestiva), adyacentes a los vasos sanguíneos y linfáticos y cerca de los nervios [Puxeddu, *et al.*, 2003].

Los mastocitos contienen histamina y heparina en sus gránulos y además se clasifican según las proteasas que contienen: los mastocitos T (MCT), que contienen exclusivamente triptasa y se encuentran en superficies mucosas, y los mastocitos TC (MCTC), que expresan triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A (CPA) y se sitúan en tejido conjuntivo de la piel y submucosa intestinal [Galli, *et al.*, 1993; Pejler, *et al.*, 2007].

Los basófilos son granulocitos sanguíneos que presentan semejanzas estructurales y funcionales con los mastocitos. Al igual que los mastocitos, derivan de células madre pluripotenciales de la médula ósea pero, a diferencia de los primeros, los basófilos maduran y se diferencian en la propia médula ósea para después entrar al sistema circulatorio. En condiciones normales no están presentes en los tejidos periféricos, pero son capaces de infiltrarse donde ocurra un proceso inflamatorio o inmunológico, contribuyendo a las reacciones de hipersensibilidad inmediata [Stone, *et al.*, 2010].

También secretan histamina y, a diferencia de los mastocitos, contienen menos heparina y triptasa. La expresión de citoquinas también es diferente, ya que los basófilos expresan fundamentalmente IL-4 (secretada rápidamente tras la activación del basófilo, lo que sugiere un papel amplificador de la respuesta Th2), IL-13 y GM-CSF [Schroeder, 2009].

## 18 | INTRODUCCIÓN

Los eosinófilos son granulocitos procedentes de la médula ósea que, tras su maduración, circulan en el torrente sanguíneo y se infiltran en los focos de inflamación de manera tardía. Contienen proteínas catiónicas en el interior de sus gránulos que contribuyen a mantener el fenómeno inflamatorio y a la producción de daño tisular. En condiciones normales se encuentran en los tejidos periféricos, sobre todo en las mucosas de los aparatos respiratorio, digestivo y urinario, y su número puede aumentar en un contexto inflamatorio [Uhm, *et al.*, 2012; Lacy, 2017].

Las proteínas liberadas de los gránulos de los eosinófilos son tóxicas para los parásitos y pueden dañar los tejidos normales. Dentro de los mediadores producidos por los eosinófilos se encuentran: la síntesis de mediadores lipídicos (PAF, prostaglandinas y leucotrienos) y citoquinas, además, dentro de sus gránulos específicos, contienen hidrolasas lisosómicas como la proteína básica mayor (MBP), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa del eosinófilo (EPO). La MBP es la más abundante y tóxica para helmintos, células tumorales y células del huésped. EDN y ECP son tóxicas para virus respiratorios incluyendo el sincitial y para parásitos. La EPO cataliza reacciones oxidativas que son tóxicas tanto para microorganismos como para células propias.

Otro mecanismo efector de los eosinófilos consiste en la liberación de las denominadas trampas extracelulares de ADN (EET por sus siglas en inglés), formadas por ADN mitocondrial liberado junto con proteínas de los gránulos citoplasmáticos, como la ECP y la MBP, en los espacios extracelulares. Si bien su papel en las enfermedades alérgicas sigue siendo incierto, se cree que las EET podrían regular la inflamación y ser estructuras protectoras en los tejidos de los pacientes alérgicos [Simon, *et al.*, 2011].

Este mecanismo no es exclusivo de los eosinófilos, sino que también se lleva a cabo por neutrófilos (NET) e incluso por monocitos y mastocitos. En el caso de los neutrófilos se ha demostrado que pueden iniciar o potenciar enfermedades autoinmunes [Dworski, *et al.*, 2011].

Es importante hablar también de los linfocitos ya que son las células protagonistas del sistema inmunitario. Son células pequeñas que se encuentran tanto alojadas en los tejidos linfoides como circulando por la sangre. Hay dos poblaciones de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. Ambas tienen funciones de reconocimiento, pero, fundamentalmente, de defensa contra las enfermedades infecciosas producidas por bacterias y virus respectivamente. Así, los linfocitos B se involucran en la producción de anticuerpos, y los linfocitos T en la secreción de linfoquinas.

Los linfocitos B producen las diferentes clases de anticuerpos y entre ellos la IgE, mientras que los linfocitos T, dependiendo de la subpoblación implicada, participan en enfermedades como la dermatitis de contacto al níquel (linfocitos Th1) o colaboran con los linfocitos B en las enfermedades alérgicas IgE mediadas (linfocitos Th2). Existe un tercer tipo de linfocitos T, muy importante, que es el de los reguladores del sistema inmunitario (linfocitos T reguladores) [Bohle, 2004]. Estos linfocitos amplifican o suprimen la respuesta inmunológica global, regulando los otros componentes del sistema inmunitario, a través del contacto celular y de la secreción de una gran variedad de linfoquinas.

## Mediadores inflamatorios

Las sustancias liberadas por las células que intervienen en las reacciones alérgicas son las responsables últimas de los síntomas que sufre el paciente alérgico.

La histamina es uno de los principales mediadores de la inflamación alérgica. Es una amina de bajo peso molecular sintetizada exclusivamente por la histidina descarboxilasa a partir de la L-histidina. Su nombre químico es 2-(4-imidazolil)etilamina. Es el producto más abundante, puesto que se encuentra en los gránulos de mastocitos (5  $\mu\text{g}/10^6$  células) y de basófilos (1  $\mu\text{g}/10^6$  células).

En la respuesta inmediata, tras la estimulación alérgica, produce picor cutáneo (prurito) por estimulación de los nervios; rubor y eritema en piel y mucosas por la dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos; edema por la extravasación de líquido de los tejidos colindantes y disnea e hipersecreción de moco en las vías respiratorias por la contracción de la musculatura de los bronquios [Jutel, *et al.*, 2009].

Sin embargo, también interviene modulando la fase crónica de la inflamación induciendo quimiotaxis de eosinófilos y neutrófilos a través del receptor HR<sub>1</sub>, incrementando la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, p-selectina) en las células endoteliales, suprimiendo la quimiotaxis de eosinófilos y neutrófilos a través del receptor HR<sub>2</sub> e induciendo la quimiotaxis de eosinófilos a través del receptor HR<sub>4</sub> [Akdis y Blaser, 2003].



## 20 | INTRODUCCIÓN

Existen 4 tipos de receptores de histamina, todos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G y distribuidos ampliamente por el organismo:

- a) HR<sub>1/2</sub>: se encuentran en células nerviosas, músculo liso, endotelio, hepatocitos, condrocitos, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B.
- b) HR<sub>3</sub>: localizados en neuronas histaminérgicas de los tubérculos mamilares del hipotálamo posterior, eosinófilos, células dendríticas, monocitos, con escasa expresión en tejidos periféricos.
- c) HR<sub>4</sub>: situados en médula ósea y células periféricas hematopoyéticas, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, células T, basófilos, mastocitos, y con escasa expresión en células nerviosas, hepatocitos, bazo, timo, pulmón, intestino delgado, colon y corazón.

Es muy importante destacar que la histamina juega un papel importante en el equilibrio entre las poblaciones linfocitarias Th1, Th2 y Treg y, por lo tanto, también se implica en la regulación de la producción de anticuerpos. Los distintos patrones de receptores presentes en cada célula determinarán los distintos tipos de respuesta. Los linfocitos Th1 expresan fundamentalmente HR<sub>1</sub>, mientras que los Th2 expresan HR<sub>2</sub>. La histamina a través del HR<sub>1</sub> incrementa las respuestas de tipo Th1, mientras que el HR<sub>2</sub> infrarregula tanto la respuesta de tipo Th1 como la Th2 [Jutel, *et al.*, 2001].

La triptasa es una proteasa de la familia de las serín-proteasas. Tiene un peso molecular de 134 kDa. Es una sustancia sintetizada por los mastocitos y basófilos, en éstos últimos en cantidades muy inferiores (300-700 veces menos), que se libera durante las reacciones alérgicas. Su determinación en la sangre u orina es utilizada para establecer la existencia de reacciones alérgicas debidas a la activación de estas células.

El mastocito humano contiene dos tipos de proteasas:  $\alpha$  y  $\beta$ -triptasa. La concentración de  $\alpha$ -triptasa en sangre es una medida del número de mastocitos, mientras que la  $\beta$ -triptasa es una medida de activación mastocitaria. Los valores normales de triptasa sérica oscilan entre 1-10 ng/mL. Si la  $\beta$ -triptasa se eleva por encima de 1 ng/mL indica activación de mastocitos. La presencia en suero tras una reacción es limitada en el tiempo, por lo que el intervalo idóneo para tomar una muestra sanguínea tras una reacción sistémica es de 30 minutos a 4 horas tras la misma. También puede medirse en lavado broncoalveolar, lavado nasal y en lágrimas [Hamilton, 2010].

Sus principales sustratos son el fibrinógeno, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la fibronectina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la lipoproteína de alta densidad (HDL), el colágeno tipo IV, el regulador de la activación de células T normalmente expresadas y secretadas (RANTES) y la eotaxina [Pejler, *et al.*, 2007].

La quimasa es una serín-proteasa de 30 kDa que se encuentra unida a proteoglicanos en el interior de los gránulos mastocitarios. Tras su liberación puede permanecer unida a los proteoglicanos heparínicos, o separarse y volverse a unir con otros, presentes en la matriz extracelular y la membrana basal. Esta unión le confiere protección frente a la degradación por parte de inhibidores circulantes endógenos como la  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina y  $\alpha$ 2-macroglobulina.

Tiene la capacidad de convertir la angiotensina I en angiotensina II con independencia de la enzima convertidora de angiotensina, contribuyendo adicionalmente a los fenómenos de ateromatosis, hipertensión, fibrosis cutánea en esclerosis sistémicas, degradación de la matriz extracelular junto a angiogénesis, adherencias peritoneales postoperatorias, reclutamiento de células inflamatorias (eosinófilos, neutrófilos, monocitos) y apoptosis de células musculares lisas [Pejler, *et al.*, 2007].

La carboxipeptidasa A3 (CPA3) es una metalo-exopeptidasa prácticamente específica de los mastocitos. Se expresa en los mismos gránulos en los que se expresan la triptasa y la quimasa, que actúan a nivel del carbono terminal de polipéptidos para liberar aminoácidos. Tiene preferencia por el carbono terminal fenilalanina o leucina. Colabora con la quimasa en la degradación de la apolipoproteína B y en la formación de angiotensina II. Mediante hidrólisis, inactiva los péptidos endógenos potencialmente letales como la neurotensina y la endotelina. Se ha descrito un papel detoxificador de venenos de serpiente del tipo sarafotoxinas [Pejler, *et al.*, 2007; Trivedi and Caughey, 2010].

Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por un núcleo proteico (serglicina) al que se unen covalentemente cadenas laterales de glucosaminoglicanos (heparina y condroitín sulfato). Son un componente importante de los gránulos mastocitarios y les confieren algunas de sus características especiales de tinción. Son claves en el almacenamiento y la estabilidad de algunas proteasas, histamina, serotonina y granzima B dentro del gránulo a la vez que regulan la morfología del mismo [Braga, *et al.*, 2007; Kolset y Tveit, 2008; Pejler, *et al.*, 2009].

El factor activador de plaquetas (PAF) es un mediador inflamatorio fosfolipídico implicado en enfermedades inflamatorias, alérgicas, cardiovasculares, neoplásicas, diabetes, renales, periodontales o SIDA. El PAF puede actuar como factor quimiotáctico de forma directa o indirecta a través de la liberación de otros mediadores inflamatorios. Es liberado por una amplia variedad de células: eosinófilos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales. Ejerce su acción mediante receptores transmembrana e intracelulares acoplados a proteína G y es regulado a través de acetilhidrolasas PAF específicas.

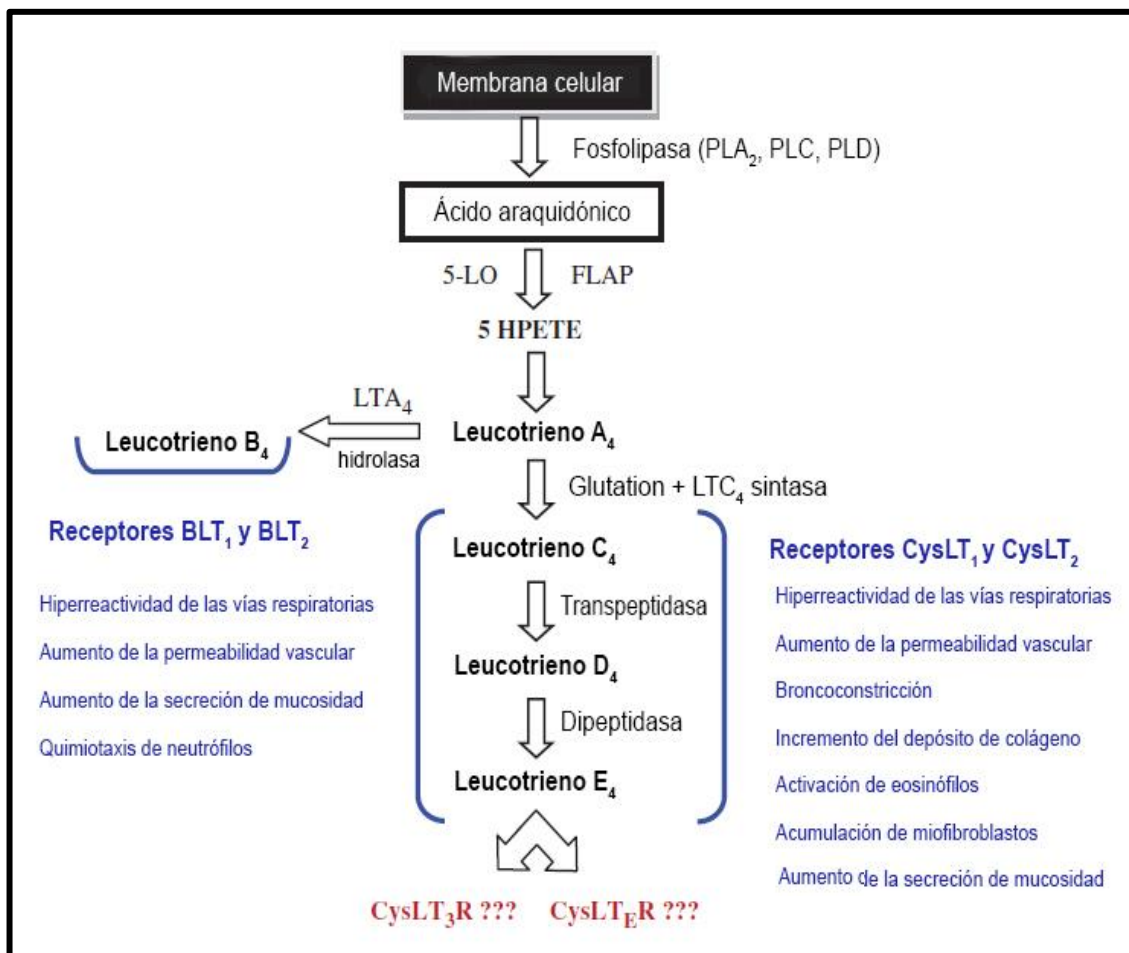
Estos receptores se encuentran en plaquetas, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Los pacientes asmáticos presentan niveles más elevados de ARNm del receptor del PAF en sus pulmones.

Entre sus funciones está la inducción de la liberación de histamina por parte de los basófilos, inducción de la activación mastocitaria, inducción de la broncoconstricción no mediada por la liberación de histamina, quimiotaxis de eosinófilos, activación de la degranulación de eosinófilos y neutrófilos, inducción de la adhesión leucocitaria a las células endoteliales, así como un incremento de la metaloproteinasa 9 de la matriz extracelular y la activación de linfocitos T para la producción de IL-4 [Kasperska-Zajac, *et al.*, 2008; Tsoupras, *et al.*, 2009; Yost, *et al.*, 2010].

Los leucotrienos son mediadores inflamatorios lipídicos sintetizados a partir del ácido araquidónico por una amplia variedad de células incluyendo mastocitos, basófilos, eosinófilos y macrófagos. Pertenecen a una familia de moléculas llamada eicosanoides. Se originan en los leucocitos a partir de un precursor inestable que es el  $LT_{A4}$ , el cual mediante la  $LT_{A4}$  hidrolasa que está presente en mastocitos, neutrófilos y macrófagos se transforma en  $LT_{B4}$ , que es un potente agente quimiotáctico para los neutrófilos.

Por otro lado, también partiendo desde el  $LT_{A4}$ , mediante la  $LT_{C4}$  sintetasa, se sintetiza  $LT_{C4}$ , perteneciente a la familia de los cisteinil leucotrienos (cys-LT). Las fuentes más importantes de cys-LT son los eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos.  $LT_{C4}$  se convierte extracelularmente a  $LT_{D4}$  tras disgregarse el ácido glutámico mediante la gamma-glutamyl-transpeptidasa o por la gamma-glutamyl-leucotrienasa. Tras esto, una dipeptidasa es la encargada de formar  $LT_{E4}$  a partir de  $LT_{D4}$  tras disgregar la glicina de la molécula. El  $LT_{E4}$  es el cys-LT más estable y es un agonista débil de los receptores cys-LT<sub>1</sub> y LT<sub>2</sub> (Figura 6).

Los cys-LT y el  $LT_{B_4}$ , como acciones comunes, tienen la capacidad de incrementar la hiperreactividad bronquial, la secreción de moco y la permeabilidad capilar. Los cys-LT además incrementan el depósito de colágeno en la vía aérea, son quimiotácticos y activadores de los eosinófilos, participan en el remodelado de la vía aérea mediante el acúmulo de miofibroblastos y la hiperplasia muscular lisa [Hallstrand y Henderson, 2010; Singh, *et al.*, 2010; Takasugi, *et al.*, 2017].



**Figura 6.** Biosíntesis de leucotrienos. Modificado de Singh, *et al.*, 2013.

La prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) es el prostanoides más importante liberado por los mastocitos tras la activación mediada por IgE. En el caso de los mastocitos está sintetizada por la PGD<sub>2</sub> sintetasa hematopoyética. Esta enzima se expresa fundamentalmente en placenta, pulmón, tejido adiposo e hígado fetal, así como en mastocitos, linfocitos T CD4+ Th2, CD8+ Tc2, histiocitos, megacariocitos, células de Kupffer y células dendríticas.

## 24 | INTRODUCCIÓN

Este mediador inflamatorio actúa mediante receptores transmembrana llamados DP<sub>1</sub> y DP<sub>2</sub> (también CRTh2).

- DP<sub>1</sub> se expresa en células caliciformes de mucosas nasal y colónica, glándulas serosas nasales, endotelio vascular, células Th2, células dendríticas y eosinófilos. Su estimulación activa la adenilciclase y con ello se produce un incremento del AMPc. Sus funciones son: incrementar la supervivencia de los eosinófilos, secreción de moco, vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular y reducción en la secreción de citosinas.
- DP<sub>2</sub> está expresado en linfocitos T fundamentalmente en CD4+ Th2, así como en CD8+ Tc2, basófilos y eosinófilos. Su estimulación reduce la concentración de AMPc intracelular. Sus diversas funciones incluyen: quimiotaxis y activación de linfocitos T CD4+ Th2, CD8+ Tc2, basófilos y eosinófilos, liberación de eosinófilos desde la médula ósea incrementando su respuesta a otras quimiocinas como la eotaxina favoreciendo su degranulación, incremento de la permeabilidad microvascular, reducción de células caliciformes y vasoconstricción coronaria [Pérez-Novo, *et al.*, 2010; Pettipher y Hansel, 2010].

Las linfoquinas, interleuquinas o citoquinas son unos productos solubles, de tiempo de acción corto, responsables de la comunicación intercelular. Son las responsables de la regulación de la respuesta inmunológica general y de la alérgica, en particular.

Las linfoquinas son producidas por diferentes tipos de células que participan en la respuesta inmune, principalmente por los linfocitos T. Se han identificado un gran número de citoquinas (Tabla 6). Muchas de ellas son cruciales para el desarrollo de los linfocitos y del tipo de respuesta inmune. Así, los individuos atópicos presentan una alteración del equilibrio de los linfocitos Th1/Th2 a favor de una respuesta de tipo Th2, produciéndose un incremento de Interleuquina-4 (IL-4), que va a favorecer el desarrollo de la respuesta alérgica. Por el contrario, los linfocitos Th1 producen principalmente interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que neutraliza la respuesta de la IL-4 y de los linfocitos Th2 [Romagnani, 2004].

Los productos tóxicos que se encuentran dentro de los gránulos de los mastocitos y basófilos, y que se liberan en las reacciones de hipersensibilidad, tienen como principal función producir inflamación (Tabla 7).

**Tabla 6***Características y efectos de las interleuquinas más importantes.*

<b>Interleuquina</b>	<b>Célula productora</b>	<b>Funciones</b>
<b>IL-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos</li> <li>• Células endoteliales</li> <li>• Epitelios y fibroblastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de linfocitos T.</li> <li>• Síntesis de prostaglandinas por el endotelio.</li> <li>• Proliferación y diferenciación de linfocitos B.</li> <li>• Síntesis de GM-CSF e IL-4 por linfocitos T.</li> </ul>
<b>IL-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T activados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferación y diferenciación de linfocitos T y B.</li> <li>• Síntesis de inmunoglobulinas.</li> <li>• Estímulos para linfocitos T citotóxicos.</li> </ul>
<b>IL-3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T</li> <li>• Mastocitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematopoyesis de células mieloides.</li> </ul>
<b>IL-4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos Th2/Th0</li> <li>• Mastocitos y basófilos</li> <li>• Linfocitos B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciación de linfocitos T a Th2.</li> <li>• Crecimiento y diferenciación de linfocitos B.</li> <li>• Inducción de síntesis de IgE.</li> <li>• Estímulo de endotelio y fibroblastos.</li> </ul>
<b>IL-5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T</li> <li>• Fibroblastos</li> <li>• Endotelio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento y diferenciación de eosinófilos.</li> <li>• Quimiotaxis y activación de eosinófilos.</li> <li>• Proliferación de linfocitos B.</li> </ul>
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T</li> <li>• Fibroblastos</li> <li>• Endotelio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de megacariocitos.</li> <li>• Diferenciación de linfocitos B a plasmacitos.</li> <li>• Síntesis hepática de proteínas de fase aguda.</li> </ul>
<b>IL-9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos Th2/Th0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estímulo de mastocitos y linfocitos T.</li> </ul>
<b>IL-10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T</li> <li>• Algunos linfocitos B</li> <li>• Monocitos</li> <li>• Células dendríticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la presentación del antígeno.</li> <li>• Activación de linfocitos B.</li> <li>• Inhibición de la secreción de citosinas proinflamatorias.</li> </ul>
<b>IL-11</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibroblastos</li> <li>• Estroma de médula ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinergia para hematopoyesis.</li> <li>• Síntesis de proteínas en fase aguda.</li> <li>• Estimulación de los fibroblastos y de la fibrosis.</li> </ul>
<b>IL-12</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células dendríticas</li> <li>• Linfocitos B</li> <li>• Macrófagos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación de la diferenciación a Th1.</li> <li>• Inducción de la síntesis de IFN-gamma.</li> <li>• Activación de las células NK.</li> </ul>
<b>IL-13</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos T</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• Basófilos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de IgG4 e IgE.</li> <li>• Crecimiento y diferenciación de linfocitos B.</li> <li>• Inhibición de citosinas proinflamatorias.</li> </ul>
<b>IL-18</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fagocitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de la síntesis de IFN-gamma sinérgicamente con IL-12.</li> </ul>

Tabla 7

*Productos liberados por mastocitos y basófilos.*

	<b>Mastocitos</b>	<b>Basófilos</b>	<b>Efecto biológico</b>
<b>Beta-glucuronidasa</b>	No	Sí	Degradación de glucurónidos.
<b>Carboxipeptidasa</b>	Sí	No	Degradación de proteínas.
<b>Catepsina</b>	Sí	Sí	Degradación de proteínas.
<b>Condroitín sulfato</b>	Sí	Sí	Anticoagulación, estabilización de gránulos, efecto anticomplemento.
<b>Elastasa</b>	No	Sí	Degradación de elastina
<b>Hidrolasa ácida</b>	Sí	No	Degradación lisosómica de partículas.
<b>Heparina</b>	Sí	Sí	Anticoagulación, estabilización de gránulos, efecto anticomplemento.
<b>Proteasas neutras</b>	Sí	Sí	Fibrinogenolisis, activación de colagenasas.
<b>Triptasa</b>	Sí	No	Activación de colagenasas y degradación de neuropéptidos.
<b>Factores atrayentes de neutrófilos</b>	Sí	Sí	Quimiotácticos de eosinófilos.
<b>Factor activador de plaquetas</b>	Sí	Sí	Agregación de las plaquetas, vasodilatación, aumento de la permeabilidad, broncoconstricción.

## MECANISMOS

En la hipersensibilidad tipo I, las moléculas de IgE específica se fijan en la superficie externa de la membrana de los mastocitos tisulares y de los basófilos circulantes mediante su unión a receptores de alta afinidad (FcεRI). Cuando el paciente vuelve a exponerse al alérgeno, éste se une a las moléculas de IgE de superficie [Akdis, 2006].

La unión (*cross-linking*) de dos moléculas de IgE provoca la agregación de los receptores de alta afinidad y múltiples tirosina-quinazas, incluyendo Lyn, Syk y Fyn, que se activan y ejercen regulación tanto positiva como negativa sobre la cascada de traducción de la señal.

Para la degranulación mastocitaria también es necesaria la entrada de calcio a la célula, controlada tanto positiva como negativamente mediante los canales de calcio [Peavy y Metcalfe, 2008; Metcalfe, *et al.*, 2009]. Estos acontecimientos conducen a la activación y degranulación celular y a la liberación de sus mediadores citoplasmáticos.

Si bien este es el mecanismo clásico, recientes estudios demuestran que existen otros mecanismos capaces de inducir la activación y la degranulación, y que son diferentes a la unión tradicional de alérgeno – FcεRI, en los que los mastocitos expresan en su superficie celular multitud de receptores adicionales al FcεRI que pueden actuar sinérgicamente en la degranulación. Estos receptores se pueden dividir en tres tipos:

- Receptores acoplados a proteína G (GPCRs): adenosina (A3R), proteína inflamatoria 1α macrofágica (MIP-1α), componente C3a del complemento (C3aR), esfingosina 1-fosfatasa (S1PR) y prostaglandina E2.
- Toll-like receptores (TLRs): TLR 2, 3 y 4.
- Receptores para factores de crecimiento: *stem cell factor* (SCF) *receptor* y el receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa (KIT).

Por tanto, debe tenerse en cuenta que, por ejemplo, C3a y S1P pueden inducir activación y degranulación independientemente de la presencia de un alérgeno [Gilfillan, *et al.*, 2009; Simons, 2010]. Una vez activada, la respuesta mastocitaria se regulará mediante el balance entre los eventos intracelulares que favorecen y suprimen la misma, que incluirá todo lo anteriormente referido y que va más allá de los mecanismos clásicos.

La degranulación mastocitaria producirá la liberación inmediata de los mediadores preformados que son la histamina, las proteasas como triptasa, quimasa, carboxipeptidasa A3 y proteoglicanos (heparina, condroitín sulfato), la liberación temprana (entre 5-30 minutos tras la exposición antigénica) de mediadores lipídicos sintetizados *de novo* como el factor activador de plaquetas (PAF), prostaglandinas (PGD2) y leucotrienos (LT<sub>c4</sub>), y por último, la síntesis y secreción de citoquinas y quimiocinas en la fase tardía (2-6 horas tras la exposición antigénica), como son IL-5, IL-6, IL-13, IL-33 y, en menor medida IL-4, así como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), siendo éste último también un mediador preformado [Hitomi, *et al.*, 2010; Simons, 2010].

La activación de esta cadena de reacciones celulares y moleculares es la responsable de las manifestaciones clínicas que conforman la enfermedad alérgica.



## GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

A menudo se observan en familias niveles anormalmente elevados de síntesis de IgE y atopia asociada. Aunque el patrón completo de herencia probablemente sea multigénico, los estudios de familias han demostrado que hay una clara transmisión autosómica de la atopia. Diversos estudios de población con técnicas de clonación posicional y cartografía genética han identificado genes o locus candidatos para la alergia (Tabla 8).

**Tabla 8**

*Cromosomas involucrados en la alergia. Modificado de Muñoz-López, 2011.*

<b>Cromosoma</b>	<b>Mediadores de atopia</b>
1q23	IgE total
2q12	Eosinófilos
2q33	CD28: actividad células T
3p24.2p22	Receptor de quimiocinas
4q35	Factor regulador de interferón
5q23.q33	IL-4, IL-13, IL-3, IL-5, IL-9, factor estimulador de colonias, CD14 (ligando lipopolisacáridos bacterianos)
6p21.1-p23	TNF- $\alpha$
7p15.2	Ag HLA clase II
9q24	Eosinofilia. IL-33, ligando IL-1
11q13	Receptor de células T, IL-6
12q14-q24.23	Cadena $\beta$ del receptor IgE de alta afinidad (Fc $\epsilon$ RI- $\beta$ )
13q14.3	Factor de células madre IFN- $\gamma$
14q32	Cadena pesada IgG
16p12.1	Receptor de células $\alpha$ / $\delta$
17p11.1-q11.2	Receptor IL-4
17q-12, 17q21	Proteína transmembrana ligada al retículo endoplásmico
19q13	Receptor de quimiocinas
20p13	Metaloproteasa
Xq28-Xq28-q29	CD22 (células B maduras). Receptor de IL-9

Uno de estos posibles *locus* para la atopia está en el cromosoma 5q, cerca de la región del grupo de genes que codifican las citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y el receptor para IL-4. Esta región es de gran interés debido a la conexión entre varios de los genes localizados en ella, los mecanismos de regulación de la IgE, y el crecimiento y diferenciación de mastocitos y eosinófilos.

Además, los polimorfismos del gen de la IL-9 se han asociado al asma bronquial humana, y esta citoquina induce inflamación de las vías respiratorias en modelos experimentales de asma. Por otro lado, la región cromosómica homóloga en los ratones, se ha relacionado en modelos *in vitro* con una mayor diferenciación de las células T CD4+ de algunas cepas endogámicas de ratones a células Th2 en respuesta frente a antígenos proteicos.

La base genética de la predisposición a sintetizar IgE, se encuentra influenciada por varios genes [Potaczek y Kabesch, 2012], mediante un probable patrón multigénico, de transmisión claramente autosómica. Otro *locus* asociado a atopia/asma está localizado en el cromosoma 12q14, región en la que está situado el gen que codifica la cadena  $\beta$  del receptor de alta afinidad para la IgE. Se ha demostrado que la genética subyacente a la propensión al desarrollo de enfermedades alérgicas es muy compleja y que podrían estar implicados numerosos genes.

Dentro de la misma familia, el órgano diana de la enfermedad atópica es variable. Así, la fiebre del heno, el asma y el eccema pueden presentarse en diferentes grados en los distintos miembros de una misma familia. Sin embargo, todos estos individuos mostrarán niveles plasmáticos de IgE más elevados que la media normal. Además de esta tendencia general a sintetizar IgE, también se hereda la capacidad para sintetizar anticuerpos IgE específicos frente a ciertos antígenos, como el polen de ambrosía, la cual puede estar ligada a determinados alelos del CMH de clase II [Costa, *et al.*, 1997; Kinet, 1999].

En resumen, la enfermedad alérgica se caracteriza por una herencia multifactorial muy compleja unida a una exposición medioambiental siempre necesaria, determinando todo ello un fenotipo alérgico que también puede mostrar distintas particularidades en cada paciente concreto: forma de presentación clínica, severidad, edad de aparición o respuesta al tratamiento.

## PREVALENCIA

Las enfermedades alérgicas, tales como la rinitis/conjuntivitis, asma bronquial, alergia alimentaria, urticaria y eccema se encuentran entre las causas más frecuentes de enfermedades crónicas en el mundo y en el primer lugar del ranking en Europa [WHO, 2007].

La prevalencia crece a un ritmo constante y la tendencia indica que aproximadamente el 50% de la población europea sufrirá una enfermedad alérgica en el 2020 [De la Hoz, *et al.*, 2012]. Los últimos estudios realizados muestran que la enfermedad alérgica alcanza una prevalencia de entre el 20 y el 35% en la población europea en edad laboral [Bousquet, *et al.*, 2009], con elevados costes directos e indirectos. Las posibles causas de este aumento son muy variadas:

- Existen factores genéticos predisponentes.
- El modo de vida occidental (tabaquismo, sedentarismo, obesidad, cambios en los hábitos alimenticios...).
- Inviernos más suaves.
- El efecto invernadero.
- La contaminación ambiental.
- La teoría de la higiene, según la cual los niños viven en ambientes más limpios, con medidas higiénicas adecuadas, están vacunados de numerosas enfermedades, utilizan antibióticos y están libres de enfermedades parasitarias [Maizels, 2005].

A su vez, los pacientes alérgicos sufren algún tipo de impacto en su calidad de vida, tanto laboral como escolar, así como en su tiempo de ocio y en muchos casos encontrando dificultad para dormir [Bousquet, *et al.*, 2001; Mullol, *et al.*, 2008].

Sin embargo, según el último informe de Alergológica 2015 [Sastre, *et al.*, 2017], en el que se utiliza el cuestionario de salud EQ-5D-5L, un cuestionario genérico de calidad de vida validado en población española y en el que se tienen en cuenta movilidad, auto-cuidado, actividades cotidianas, dolor/malestar, ansiedad/depresión y escala visual analógica (EVA) se encuentra que los sujetos de este estudio presentan un mejor perfil de movilidad, auto-cuidado y la media de la EVA que la población general mientras que tienen un peor perfil en actividades cotidianas, dolor o malestar y ansiedad o depresión.

Lo más importante y la conclusión de este estudio, fue confirmar que la enfermedad alérgica, aunque no limitante como otras enfermedades crónicas, supone una importante carga de molestias, alteraciones de la vida diaria y afectan a la salud mental.

La enfermedad alérgica con mayor prevalencia en la consulta de alergología en España es la rinitis/conjuntivitis suponiendo un 62%, seguida del asma bronquial con un 23,4% [Sastre, *et al.*, 2017]. La rinitis tiene una prevalencia en la población mundial que varía entre un 2-25% en niños y entre un 17-28,5% en adultos, estando frecuentemente asociada al asma en un 15-38% en los pacientes con rinitis alérgica [Brozek, *et al.*, 2017]. De acuerdo con los datos de la encuesta *European Community Health Survey* [Janson, *et al.*, 2001], realizada a principios de los noventa, un 4,5% de la población de 20 a 44 años tenía asma (con valores extremos entre el 2% y el 11,9%), mientras que el asma en niños oscila entre un 3-21% según diferentes países en el estudio ISAAC [Mallol, *et al.*, 2013; Asher y Pearce, 2014].

La alergia alimentaria tiene una prevalencia algo confusa según los datos globales que existen actualmente, con tasas que varían desde el 0,5 hasta el 15% en población infantil [Dunlop y Keet, 2018] y del 0,1 al 1% en adultos [Woods, *et al.*, 2002; Patriarca, *et al.*, 2009]. Esta variación es mayor dependiendo de la población estudiada. Hay indicios de que los países menos industrializados (u "occidentalizados") como Tailandia y Turquía pueden tener tasas más bajas de alergia a alimentos pero, en muchos de estos estudios, solo se examinó un conjunto muy concreto de alimentos, y podrían tener algún tipo de sesgo metodológico [Osborne, *et al.*, 2011; Prescott, *et al.*, 2013]. Es necesario un examen más exhaustivo de las tendencias de prevalencia para poder comprender mejor las diferencias que existen a nivel geográfico.

La dermatitis atópica tiene una prevalencia del 7,2% en adultos residentes en Estados Unidos (EE. UU.) [Dinulos, *et al.*, 2017], 3% en Canadá, 4% en Europa y 1,7% en Japón. La prevalencia es generalmente más baja en hombres frente a mujeres y se va reduciendo con la edad [Barbarot, *et al.*, 2018].

La urticaria crónica es una enfermedad que afecta del 0,5 al 1% de la población [Dias, *et al.*, 2016], con lesiones eritematosas y papulosas que persisten durante más de 6 semanas provocando una reducción en la calidad de vida de quien la padece similar a la producida por una enfermedad coronaria de tres vasos [Ferrer y Kaplan, 2007].

Las reacciones adversas a medicamentos con frecuencia ocurren en pacientes infantiles hospitalizados (10,2%) y pacientes ambulatorios (1,5%). En los niños, existe una sobreestimación de la hipersensibilidad a medicamentos y, en comparación con los adultos, es 1,5 veces menos probable que se confirme, siendo particularmente más baja en aquellos con exantema maculopapular [Fernández, *et al.*, 2014].

En un estudio [Zambonino, *et al.*, 2014] que evaluó una gran población de niños con reacciones de hipersensibilidad a los fármacos, los más frecuentes fueron los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (44,53%), los betalactámicos (42,97%) y los macrólidos (1,56%). Estos datos son similares a los encontrados en adultos de la misma población, aunque en adultos las reacciones inmediatas a betalactamas fueron más frecuentes [Doña, *et al.*, 2012].

La alergia al veneno de himenópteros hace referencia a la reacción alérgica que se produce después de la picadura de una abeja, avispa u hormiga. El riesgo es mayor en adultos que en los niños debido al aumento de la exposición, las comorbilidades y el uso concomitante de medicamentos. Se han notificado hasta un 3% de reacciones sistémicas en adultos y menos de 1% para los niños [Golden, 2015; Dhami, *et al.*, 2017].

Todos estos datos descritos anteriormente demuestran la importancia y las consecuencias de la enfermedad alérgica, no sólo en términos de elevada prevalencia, sino del impacto en la calidad de vida de los pacientes alérgicos y sus familiares, así como del riesgo de sufrir reacciones graves que, en última instancia pueden resultar mortales.

### **Impacto en la sociedad**

El incremento de la prevalencia a nivel mundial de la rinitis, el asma y la dermatitis atópica, ha sido definido como “epidemia alérgica”. Las alergias respiratorias aparecieron primero entre los más ricos, luego dentro de la clase media y, finalmente, también afectaron a la población con más necesidades. En los últimos años, las alergias alimentarias están volviéndose más prevalentes en las poblaciones con estilo de vida occidental. Esta “segunda ola” [Prescott y Allen, 2011] de alergia epidémica está generando una pesada carga en los sistemas de salud que no están bien preparados para afrontar este desafío.

Las autoridades sanitarias de los países desarrollados empiezan a concienciarse del gran impacto económico y social que tienen las enfermedades alérgicas en la actualidad, y están facilitando el desarrollo de programas e iniciativas para mejorar su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, apenas existen estrategias comunes. La más notable es la Ga<sup>2</sup>LEN (*Global Allergy and Asthma European Network*) que se ha planteado como red de investigación y está financiada por la Comunidad Europea.

La financiación pública también ha apostado fuerte por el estudio de la historia natural del asma y de los factores que pueden favorecer o dificultar el desarrollo de esta enfermedad. Especialmente notorio es el estudio ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), que estudia la prevalencia de las enfermedades alérgicas en la infancia, con la participación de más de cien países y unos dos millones de niños en todo el mundo, a lo largo de los últimos 20 años.

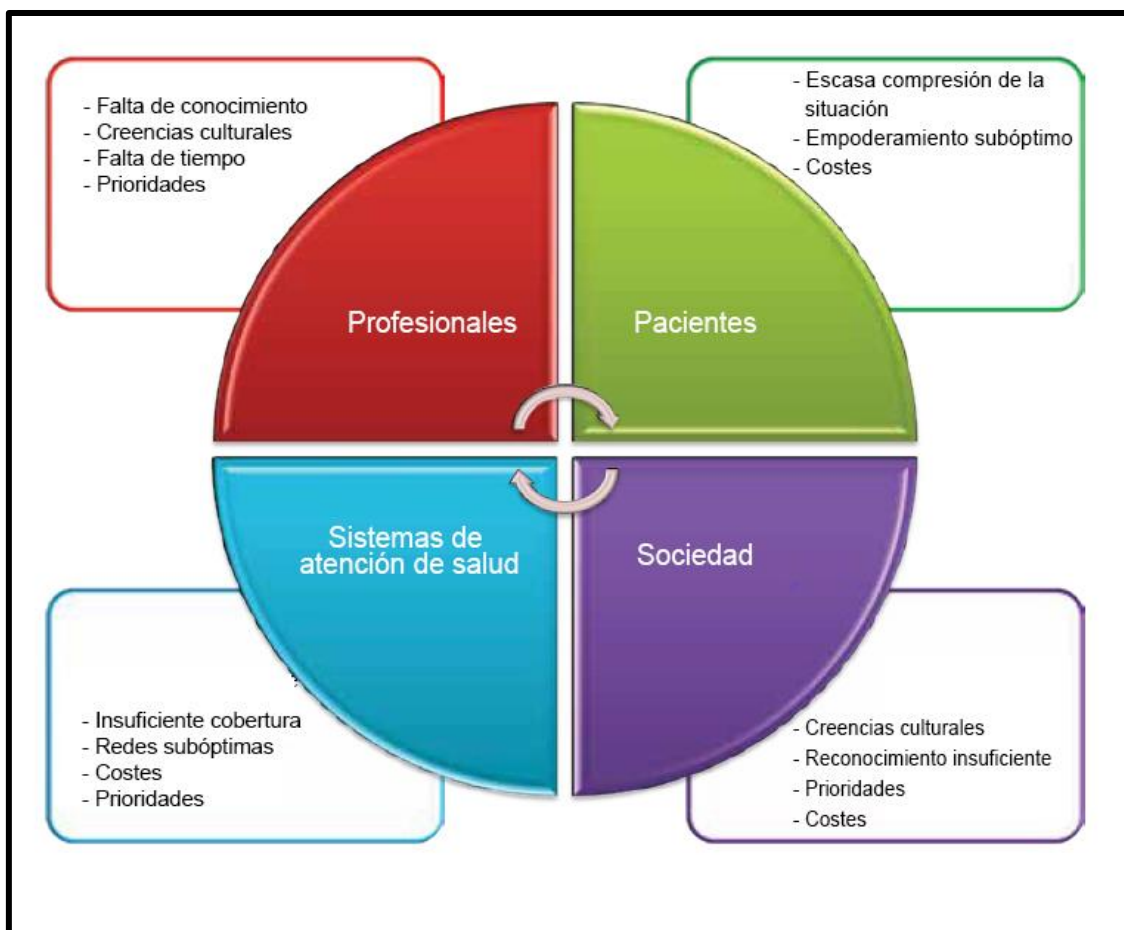
En España, existen diferentes asociaciones de pacientes alérgicos (Tabla 9) que potencian la investigación y el apoyo a dichos pacientes y a sus familiares [Chivato, *et al.*, 2012].

**Tabla 9**

*Algunas de las asociaciones de pacientes más activas en España.*

Nombre	Página web
Asociación Española de Alérgicos a Alimentos y Látex (AEPNAA)	<a href="http://www.aepnaa.org">www.aepnaa.org</a>
Asociación Gallega de Asmáticos y Alérgicos (ASGA)	<a href="http://www.accesible.org/asga">www.accesible.org/asga</a>
Asociación de Familiares y Pacientes de Dermatitis Atópica (ADEA)	<a href="http://www.adeaweb.org">www.adeaweb.org</a>
Asociación de Asmáticos Madrileños	<a href="http://www.asmamadrid.org">www.asmamadrid.org</a>
Asociación Española de Alérgicos al Látex	<a href="http://www.alergialatex.com">www.alergialatex.com</a>
Asociación Asmatológica Catalana	<a href="http://www.asmatics.org">www.asmatics.org</a>
Asociación de Alérgicos a las Picaduras de Himenópteros (ADAPHI)	<a href="http://www.scaic.cat/scaic/adaphi.htm">www.scaic.cat/scaic/adaphi.htm</a>
Asociación Madrileña de Alergias Alimentarias	<a href="http://www.histasan.com">www.histasan.com</a>
Asociación de Alérgicos y Asmáticos de Jaén (ALERJA)	<a href="http://www.alerja.es">www.alerja.es</a>

Las barreras para la implementación de programas de prevención y control parecen ser similares para muchas enfermedades, y la alergia no es una excepción (Figura 7).



**Figura 7.** Barreras potenciales para la implementación de programas de prevención y control de enfermedades. Modificada de *Global Atlas of Allergy*, 2014.

Como ejemplos de estas estrategias, el Programa Finlandés de Alergia 2008-2018, liderado por el Dr. Tari Haatela, que está logrando una reducción de la carga de la alergia con medios relativamente simples [Haahtela, *et al.*, 2008, 2012]. Este programa está dirigido a reducir la carga de las alergias tanto a nivel individual como social. Se hace mediante el aumento de la tolerancia tanto inmunológica como psicológica, y cambiando actitudes para apoyar la salud en lugar del sobret ratamiento de síntomas de alergia leves y comunes. Las formas graves de alergia tienen una atención especial, por ejemplo, los ataques de asma se previenen proactivamente mejorando el control de la enfermedad de manera supervisada.

En conclusión, cada vez hay más conciencia y evidencia de los efectos psicológicos y sociales de la alergia en los pacientes y sus familias [Cummings, *et al.*, 2010].

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las enfermedades alérgicas se lleva a cabo con los diferentes extractos alérgicos, *in vivo* mediante la exposición del alérgeno al paciente, e *in vitro* mediante la unión de los anticuerpos IgE específicos del paciente al alérgeno [Cramer, 2013].

Las pruebas *in vivo* son herramientas fundamentales en el diagnóstico de alergias mediadas por IgE (tipo I) y, dentro de ellas, las pruebas cutáneas tipo *prick test* son las más utilizadas debido a que son fáciles de realizar, económicas y de rápida lectura [Hoffmann-Sommergruber, *et al.*, 2015].

Las pruebas intradérmicas, también llamadas intracutáneas, son más exigentes, pero permiten, por titulación de varias concentraciones de alérgenos, una obtención muy exacta de los niveles de sensibilización. Las pruebas epicutáneas son utilizadas en pacientes con sospecha de dermatitis por contacto (alergias tipo IV) o hipersensibilidad tardía para medicamentos. Debido a su potencial capacidad de producir cicatrices, las pruebas cutáneas por escarificación están limitadas a algunos tipos especiales de medicamentos o alérgenos ocupacionales (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Pruebas cutáneas en el diagnóstico de la alergia. Modificada de Global Atlas of Allergy, 2014.*

	<b>Prick test</b>	<b>Prueba intradérmica</b>	<b>Parches epicutáneos</b>	<b>Parches atópicos</b>
<b>Alergia a inhalantes</b>	+++ Estándar	Raramente útiles, pocos alérgenos disponibles	N.A	Algunas formas de dermatitis atópica
<b>Alergia alimentaria</b>	++ Extractos comerciales disponibles y comida fresca	+++ Titulación	N.A	¿Esofagitis eosinofílica? Algunas formas de dermatitis atópica
<b>Alergia a venenos</b>	+ Sensibilidad reducida	+++ Titulación	N.A	N.A
<b>Hipersensibilidad a drogas</b>	+ hasta ++	+++ Con algunas drogas solubles; Titulación	++ Hipersensibilidad tardía a drogas	N.A
<b>Alérgenos de contacto</b>	+ Dermatitis a proteína de contacto	N.A	+++	N.A

N.A: no aplica.



También es importante mencionar las pruebas de exposición/provocación, ya sea a nivel bronquial, conjuntival, nasal, con alimentos y con fármacos, ya que estas pruebas asemejan la situación natural y son útiles para entender los mecanismos que están interviniendo en la reacción.

Dentro de las pruebas *in vitro* el prototipo para la determinación de IgE (*Radioallergobent test*, RAST) fue descrito por primera vez en 1967 [Wide, *et al.*, 1967]. Esta técnica utilizaba un disco de papel como fase sólida donde se inmovilizaba de manera covalente el alérgeno para después administrar el suero del paciente. Tras subsecuentes lavados para eliminar proteínas y anticuerpos no adheridos, la IgE unida se detectaba con una anti-IgE humana policlonal marcada con I<sup>125</sup>.

En 1989 se lanzó un nuevo inmunoensayo con una fase sólida hidrofílica, totalmente automatizado que permitía una mejor unión covalente entre el antígeno y la interacción de éste con los anticuerpos específicos, en el que la IgE específica unida se detectaba con una anti-IgE humana monoclonal marcada con un fluorocromo. Los resultados se expresan en kilounidades por litro (kU/L) y están armonizados con el estándar de IgE de la Organización Mundial de la Salud (1 kU/L = 2,42 ng/mL) [Bousquet, *et al.*, 1990].

Actualmente, el sistema más común para detectar IgE específica es el denominado ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico *in vitro* de las enfermedades alérgicas.

En los últimos años, la investigación se ha dirigido a la obtención de alérgenos purificados con mayor relevancia clínica [Hiller, *et al.*, 2002]. La disponibilidad de estos alérgenos abre nuevas oportunidades diagnósticas mediante la aplicación de los llamados *microarrays*, capaces de detectar un elevado número de posibles agentes causantes de alergia con cantidades muy pequeñas de material biológico.

La mayor parte de las moléculas alergénicas disponibles se han obtenido mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante, lo que ha permitido la clonación y la producción de alérgenos a gran escala [Mari, 2008]. Este conocimiento está depositado en diferentes bases de datos (Tabla 11).

Por último, dentro de las técnicas *in vitro* se encuentran las pruebas celulares en las que se induce la respuesta alérgica dentro de un tubo de ensayo. Como cualquier prueba *in vitro* tiene la ventaja de cuantificar la respuesta alérgica sin ningún riesgo para el paciente.

Entre las técnicas celulares más comunes están el test de liberación de histamina (HRT por sus siglas en inglés) [Siraganian, 1974; Stahl Skov, *et al.*, 1985] y el test de activación de basófilos (TAB) [Knol, *et al.*, 1991] que exploran la reactividad del basófilo tras un estímulo antigénico específico, valorando tanto la liberación de mediadores (HRT) como la presencia de marcadores especiales o moléculas, que sólo se expresan en la membrana de esta célula tras su activación por parte del antígeno responsable de la reacción (TAB), y que no se encuentran presentes en la membrana celular cuando ésta se encuentra en reposo.

Estas técnicas se usan cuando la historia del paciente, la IgE específica o los test cutáneos son discordantes, cuando no hay una IgE específica o una prueba cutánea confiable, o si la historia del paciente indica que la prueba cutánea puede provocar una respuesta sistémica.

Con base en el conocimiento actual, es importante tener en cuenta no solamente la determinación de niveles séricos de IgE, sino permitir que éstos, junto con la historia clínica y las pruebas de provocación, conduzcan hacia un diagnóstico completo y preciso antes de considerar intervenciones inmunoterapéuticas.

**Tabla 11**

*Bases de datos de alérgenos/proteínas. Modificada de Global Atlas of Allergy, 2014.*

Bases de datos	URL	Objetivo / Función
WHO/IUIS	<a href="http://www.allergen.org/">http://www.allergen.org/</a>	Responsable de mantener y desarrollar una nomenclatura única, no ambigua y sistemática, para las proteínas alergénicas.
ALLERGOME	<a href="http://www.allergome.org/">http://www.allergome.org/</a>	Sitio web diseñado para proveer información, en moléculas alergénicas (alérgenos), para médicos clínicos e investigadores.
AllergenOnline	<a href="http://www.allergenonline.org/">http://www.allergenonline.org/</a>	Provee acceso a la lista de alérgenos calificadamente revisados, y una base de datos para búsqueda de secuencias.
AllFam	<a href="http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/">http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/</a>	La base de datos AllFam es un recurso para clasificar los alérgenos en familias de proteínas (basado en Allergome).
Uniprot	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	Es una base de datos más general, no sólo contiene proteínas alergénicas.

## TRATAMIENTO

El tratamiento de las enfermedades alérgicas se sustenta en tres pilares fundamentales: el control ambiental y del entorno, mediante la identificación y evitación del alérgeno causante de la enfermedad, el tratamiento farmacológico preventivo o sintomático y la inmunoterapia específica.

Las personas alérgicas deben ser informadas sobre dónde se pueden encontrar los alérgenos a los que están sensibilizados y qué medidas deben seguir para evitarlos [Holgate y Polosa, 2008]. Las fuentes alérgicas que se pueden evitar son las derivadas de pólenes, ácaros, epitelios de animales, hongos y alimentos. En el caso de las alergias alimentarias, este tipo de medidas requiere una supervisión y monitorización continuada por parte del médico, sobre todo en los niños o en casos de alergias múltiples, ya que se corre el riesgo de provocar deficiencias alimentarias [Koletzko y Koletzko, 2009].

En el mercado, hay disponibles numerosos medicamentos útiles en la prevención y tratamiento de las enfermedades alérgicas. En general, reducen temporalmente los síntomas al neutralizar tanto las células implicadas en la inflamación alérgica como los mediadores y otros factores producidos por éstas. La problemática asociada con este tipo de terapias es que todas son paliativas, es decir, reducen los síntomas asociados con la enfermedad sin modificar el curso natural de la misma (Tabla 12).

La inmunoterapia específica con alérgeno (ITS/SIT, por sus siglas en inglés) representa, hoy en día, según el informe emitido en 1998 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), *“el único tratamiento que puede alterar el curso natural de las enfermedades alérgicas y que también puede impedir el desarrollo del asma en los pacientes con rinitis alérgica”* [Bousquet, *et al.*, 1998] cuando la administración es por vía subcutánea (SCIT). Además de ser específica de antígeno y modificar el curso natural de la enfermedad alérgica, sus beneficios clínicos perduran después de suspender el tratamiento [Larché, *et al.*, 2006]. Sin embargo, la SIT presenta algunos inconvenientes, como el riesgo de que se produzcan reacciones sistémicas graves que pueden llegar a comprometer la vida del paciente [Williams, *et al.*, 2004]. En 2009 la WAO amplía a la vía sublingual (SLIT) la eficacia y seguridad de la SCIT [Canonica, *et al.*, 2009].

Las vías anteriormente descritas (subcutánea y sublingual) son las más frecuentes y estudiadas, pero no las únicas, y cabe destacar la existencia de inmunoterapia por otras vías como la oral, intradérmica, nasal, intraganglionar y bronquial [Casale y Stokes, 2011].

**Tabla 12***Fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.*

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Síntomas a tratar / Efectos</b>
Antihistamínicos de 1ª generación (clásicos o sedantes)	Antagonistas del receptor HR <sub>1</sub> de histamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de los síntomas de la respuesta inmediata</li> </ul>
Antihistamínicos de 2ª generación (no sedantes)	Antagonista del receptor H de histamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de los síntomas de la respuesta inmediata</li> </ul>
Glucocorticoides (sistémicos, inhalados, nasales o tópicos)	Inhibidores de la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en células Th2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reagudizaciones asmáticas</li> <li>• Asma persistente</li> <li>• Rinitis alérgica</li> <li>• Dermatitis atópica</li> </ul>
Simpaticomiméticos (naturales y β <sub>2</sub> -miméticos)	Antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Broncoconstricción</li> <li>• Vasoconstricción</li> <li>• Urticaria y angioedema</li> </ul>
Antileucotrienos	Agonistas de leucotrienos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Broncoconstricción</li> <li>• Inflamación de las vías aéreas</li> <li>• Episodios de asma</li> <li>• Rinoconjuntivitis</li> </ul>
Cromonas	Inhibidores de la degranulación de mastocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma</li> <li>• Rinoconjuntivitis</li> </ul>
Anticolinérgicos	Inhibidores de receptores muscarínicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Broncoconstricción</li> <li>• Secreción de moco</li> <li>• Crisis asmáticas</li> </ul>
Xantinas	Inhibidores de las fosfodiesterasas de AMP <sub>c</sub> , antagonistas de los receptores de adenosina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Broncoconstricción</li> </ul>
Inmunomoduladores	Inhibidores de la calcineurina (inhibición de la activación de células T)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dermatitis atópica</li> </ul>
Anticuerpo monoclonal anti-IgE	Bloqueo de los anticuerpos IgE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crisis asmáticas</li> <li>• Rinoconjuntivitis</li> </ul>

En 1935, más de 30 años antes del descubrimiento de la IgE, Robert A. Cooke documentó su experiencia acerca de los mecanismos de inmunoterapia inyectada. La transfusión de sangre de un paciente tratado con inmunoterapia sobre un paciente que padecía fiebre de heno, le proporcionó una mejoría considerable.

Este procedimiento de inmunización pasiva, reveló que el factor transferido a través de la sangre era la inmunoglobulina IgG (IgG4 en humanos), que tenía la capacidad de inhibir las reacciones inmediatas que eran provocadas por el alérgeno causante [Cooke, *et al.*, 1935]. Este hecho hizo que dicha inmunoglobulina se denominara como una inmunoglobulina bloqueadora [Loveless, 1940].

Los primeros ensayos clínicos empleando extractos alérgicos resultaron ser poco eficaces, además de tener efectos adversos sobre la salud de los pacientes (reacciones alérgicas locales, urticaria, asma y, en algunos casos, anafilaxia). Así, los primeros intentos para solventar estos problemas se centraron en el uso de adyuvantes, como el hidróxido de aluminio [Zoss, A, *et al.*, 1937]. De esta forma, los alérgenos se adsorben al adyuvante, y una vez que el preparado es administrado, se genera una liberación sostenida de los mismos, lo que reduce la aparición de reacciones anafilácticas.

Años más tarde, se realizaron los primeros intentos para disminuir la actividad alérgica de los extractos, bien mediante hidrólisis para generar un complejo de péptidos cortos (haptenos) [Malley y Perlman, 1969], o bien por modificación química, mediante el uso de formaldehído o glutaraldehído [Marsh, *et al.*, 1970]. La modificación química genera los denominados alergoides, capaces de inducir IgG bloqueantes (mantienen la inmunogenicidad) y de reducir la capacidad fijadora de IgE (alergenicidad).

En la década de los 80, con el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante y la caracterización molecular de las proteínas, se asentaron las bases necesarias para el conocimiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los alérgenos [Chua, *et al.*, 1988]. Estas técnicas permitieron la producción recombinante a gran escala de los principales alérgenos, así como el diseño de derivados hipoalérgicos, cuya actividad alérgica se encuentra disminuida mientras que mantienen su capacidad inmunogénica [Pauli, *et al.*, 1999; Van Hage-Hamsten, *et al.*, 1999].

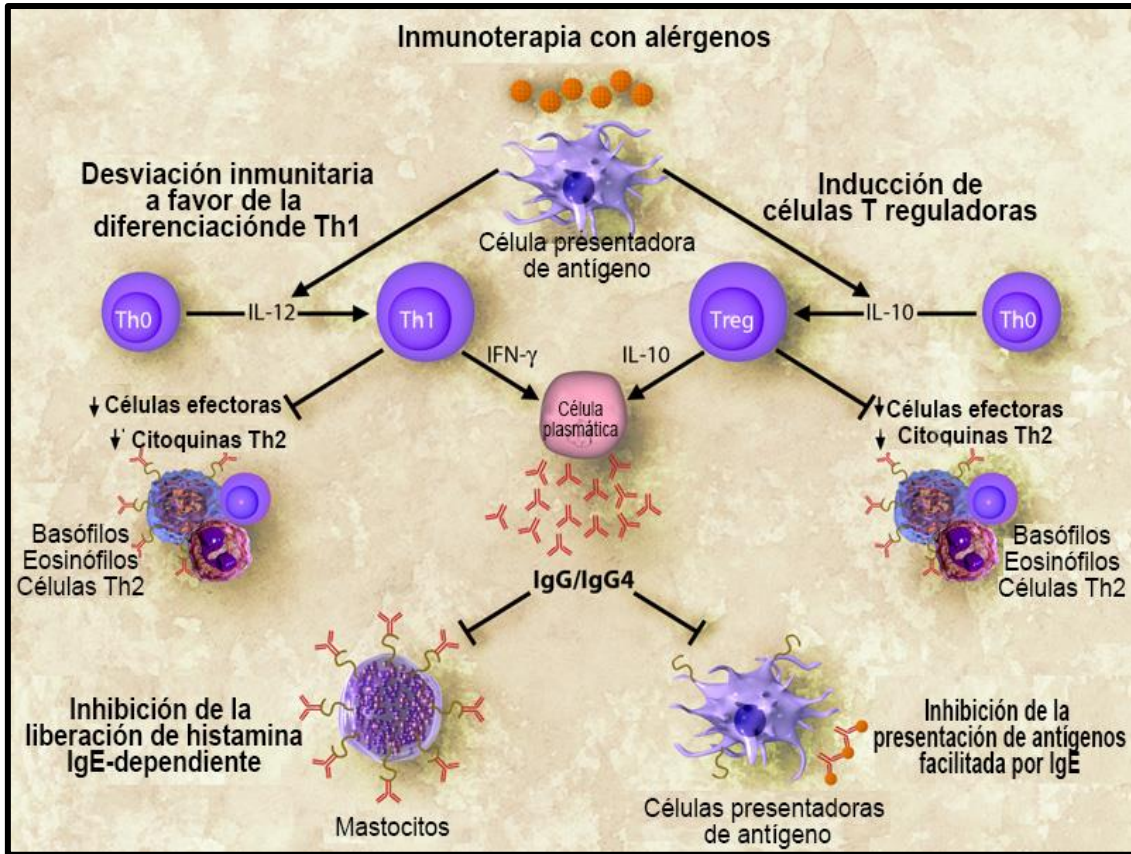
Estas moléculas parecían que solventarían parte de la problemática asociada con el uso de extractos alérgicos naturales en inmunoterapia, tales como sensibilización *de novo* debido a la presencia de contaminantes, inestabilidad del extracto, o falta de estandarización del mismo [Valenta, *et al.*, 2010].

La primera vacuna basada en alérgenos recombinantes fue administrada en pacientes alérgicos empleando dos derivados hipoalérgicos de Bet v 1, alérgeno principal del polen de abedul [Niederberger, *et al.*, 2004].

En este sentido también se desarrollaron técnicas de purificación de alérgenos naturales nativos, con la ventaja de obviar las posibles modificaciones post-traduccionales, que podrían afectar a la estructura y función de la proteína recombinante. El primer tratamiento basado en alérgenos naturales nativos purificados fue administrado empleando Alt a 1, alérgeno mayor del hongo *Alternaria alternata* [Prieto, *et al.*, 2010; Pineda, 2017].

Los mecanismos por los cuales la ITS ejerce su funcionamiento en las enfermedades alérgicas son complejos, no se conocen con exactitud y continúan siendo materia de estudio [Larché, *et al.*, 2006; Casale y Stokes, 2011]. La farmacodinamia de la inmunoterapia ha mostrado diferentes mecanismos (Figura 8):

- Efectos tempranos que se relacionan con la desensibilización de los mastocitos y basófilos, que conlleva a una reducción de los síntomas clínicos que caracterizan la respuesta inmediata de la reacción alérgica [Eberlein-König, *et al.*, 1995; Jutel, *et al.*, 1996; Plewako, *et al.*, 2006].
- Efectos a medio plazo por modificación de la respuesta mediada por las células Th2, ya sea por anergia, delección clonal o activación de las células T reguladoras (Treg), que producen IL-10 y/o TGF- $\beta$ . Estos eventos van acompañados de una disminución de la secreción de citoquinas de tipo Th1 y de la proliferación de las células Th2 [Akdis, *et al.*, 1996, 1998; Jutel, *et al.*, 2003].
- Efectos tardíos, asociados con la actividad de las células B. Tras el incremento transitorio de los niveles séricos de los anticuerpos IgE específicos [Gleich, *et al.*, 1982; Van Ree, *et al.*, 1997], éstos disminuyen gradualmente, a la vez que se incrementan los niveles de IgG, particularmente de IgG4 [Jutel, *et al.*, 2005; Reisinger, *et al.*, 2005].



**Figura 8.** Efectos de la inmunoterapia con alérgenos. Modificada de Casale, *et al.*, 2011.

## **ALERGIA ALIMENTARIA**

***“El diagnóstico de alergia a alimentos en un niño es una situación que tiene un impacto sobre cada minuto y sobre cada día de la vida del niño, de su familia y como extensión de toda la trama social”.***

Anne Muñoz-Furlong [Muñoz-Furlong, 2003].

Fundadora - *The Food Allergy & Anaphylaxis Network* (FAAN), actual FARE.

Los alimentos presentan gran capacidad para provocar respuestas en el sistema inmunológico. Son sustancias altamente complejas, constituidas por dos tipos de compuestos: nutrientes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales) y no nutrientes (sustancias naturales, aditivos, contaminantes y productos derivados de los procesos a los que se someten los alimentos).

Un alimento puede estar constituido por cientos de compuestos no nutrientes, lo que explica la complejidad del estudio etiológico de las reacciones alimentarias adversas.

Las reacciones adversas que se producen en relación con alimentos ingeridos se conocen desde la antigüedad. Así, Hipócrates de Cos (460-437 a.C) relató los primeros problemas gastrointestinales y habones inducidos por la ingestión de leche en el *“Corpus Hipocraticum”*. Estas observaciones llevaron a escribir a Tito Lucrecio Caro (98-55 a.C) en *“de Rerum Natura”* que lo que es alimento para algunos, es veneno para otros [Panzani, 1985].

La primera reacción anafiláctica al huevo fue aportada a la literatura médica por Marcello Donati en el siglo XVI y, posteriormente, al pescado, en el siglo XVII por Philipp Sachs. En 1912 el pediatra Oscar Menderson Schloss fue el primero en diagnosticar alergia alimentaria por pruebas cutáneas [Schloss, 1912] y demostró un caso de alergia a huevo con una prueba de escarificación (*scratch test*) [Cohen, 2008; Sampson, 2015].

En 1921, dos médicos austríacos, Prausnitz y Küstner [Prausnitz y Küstner, 1921] publicaron los resultados de la transferencia pasiva local, inyectando el suero de Küstner (alérgico a pescado) en la piel de Prausnitz que no era alérgico. Tras inyectar localmente, por vía intradérmica, el extracto de pescado sobre los puntos de transferencia, se obtuvo a los 15 minutos una prueba positiva.



En 1950, Loveless utilizó por primera vez provocaciones orales administrando de manera enmascarada los alimentos, para determinar la veracidad de la clínica referida por el paciente [Loveless, 1950] y en 1976, May introdujo el uso de provocaciones orales doble ciego controladas con placebo (PODCCP), estableciéndola como prueba definitiva o *gold standard* para el diagnóstico de las reacciones adversas a alimentos [May, 1976].

Las alergias alimentarias mediadas por IgE se manifiestan tras la exposición al alérgeno alimentario, habitualmente por ingestión, en un individuo que se encuentra previamente asintomático y que continúa estándolo una vez que se resuelve el episodio. Estos alimentos son bien tolerados por los individuos no alérgicos, e incluso son considerados alimentos saludables y convenientes para una buena alimentación.

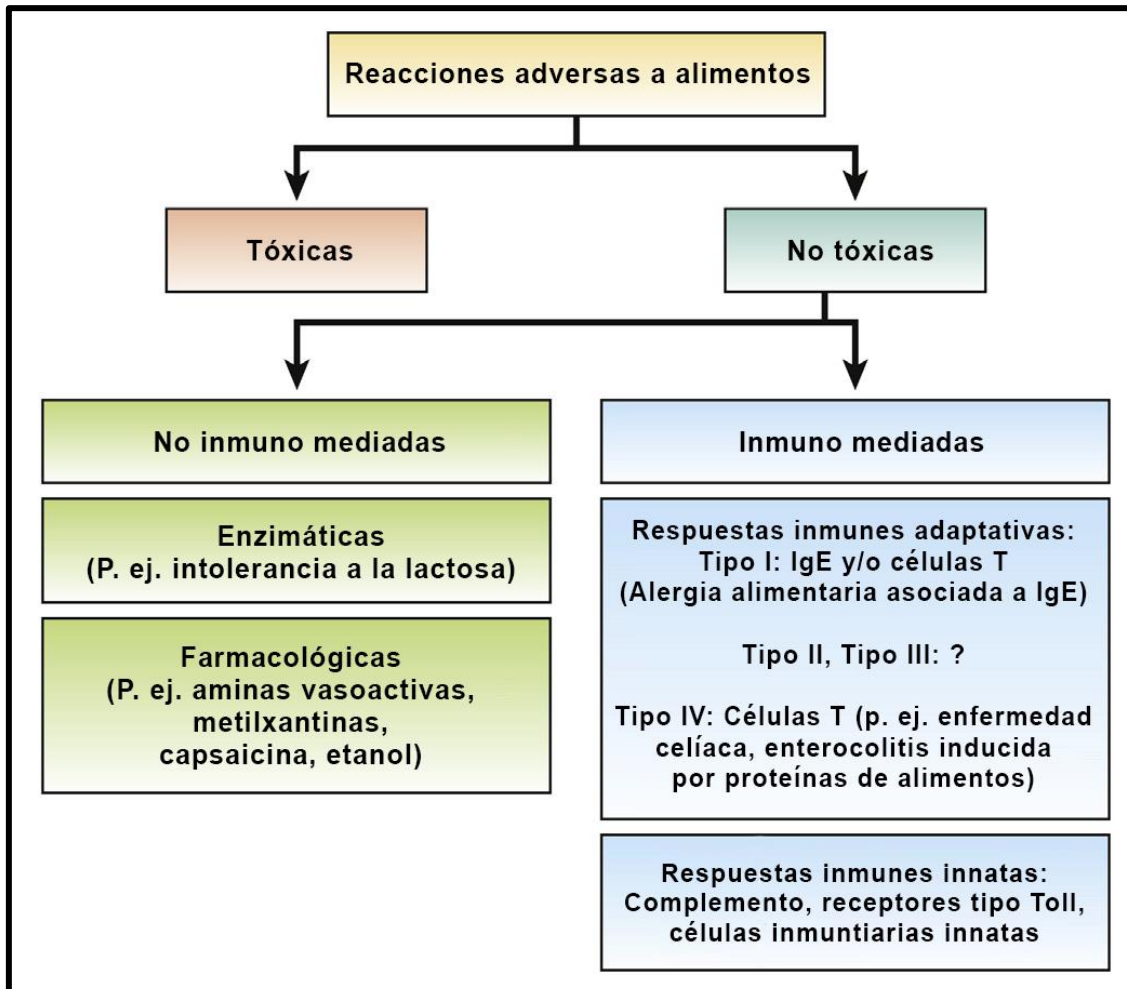
Las reacciones mediadas por IgE ocurren dentro de las dos horas siguientes a ingestión del alimento e involucran la piel, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y, con menor frecuencia, el sistema cardiovascular [Berin y Sampson, 2013]. En el caso más grave de anafilaxia, los sistemas de órganos múltiples están involucrados y pueden incluir colapso cardiovascular.

Existen varios mecanismos por los cuales las personas desarrollan reacciones adversas a los alimentos. Estas reacciones pueden considerarse tóxicas o no tóxicas (Figura 9) y entre las reacciones no tóxicas están aquellas que no son inmuno-mediadas, como las que involucran defectos enzimáticos o reacciones a ciertas sustancias, y son mucho más comunes que las reacciones inmunitarias [Spergel, 2006; Gultekin y Doguc, 2013].

Las formas más comunes de reacciones adversas a los alimentos mediadas por factores inmunes (reacciones de tipo I), siempre se caracterizan por el desarrollo de IgE frente a los alérgenos alimentarios. Puede ir acompañado de inflamación, inducida por componentes celulares, y mediada por células T y eosinófilos [Longo, *et al.*, 2013].

Hay estudios que barajan la hipótesis de la existencia de antígenos alimentarios IgG específicos, que pueden causar reacciones adversas a través de anticuerpos diferentes a la IgE o hipersensibilidad tipo II o tipo III, aunque no existe evidencia experimental sólida que respalde la relevancia de estas reacciones, por ello existen varios documentos de posicionamiento de la EAACI que recomiendan no analizar la IgG en el diagnóstico de alergia a alimentos [Stapel, *et al.*, 2008; Bock, 2010].

La hipersensibilidad tipo IV principalmente involucra respuestas de células T y puede dañar el intestino de la mucosa. Se asocia con trastornos como la enfermedad celíaca, que se caracteriza por una reacción de hipersensibilidad contra la fracción de gluten de trigo que comprende gliadinas y gluteninas [Green, *et al.*, 2015].



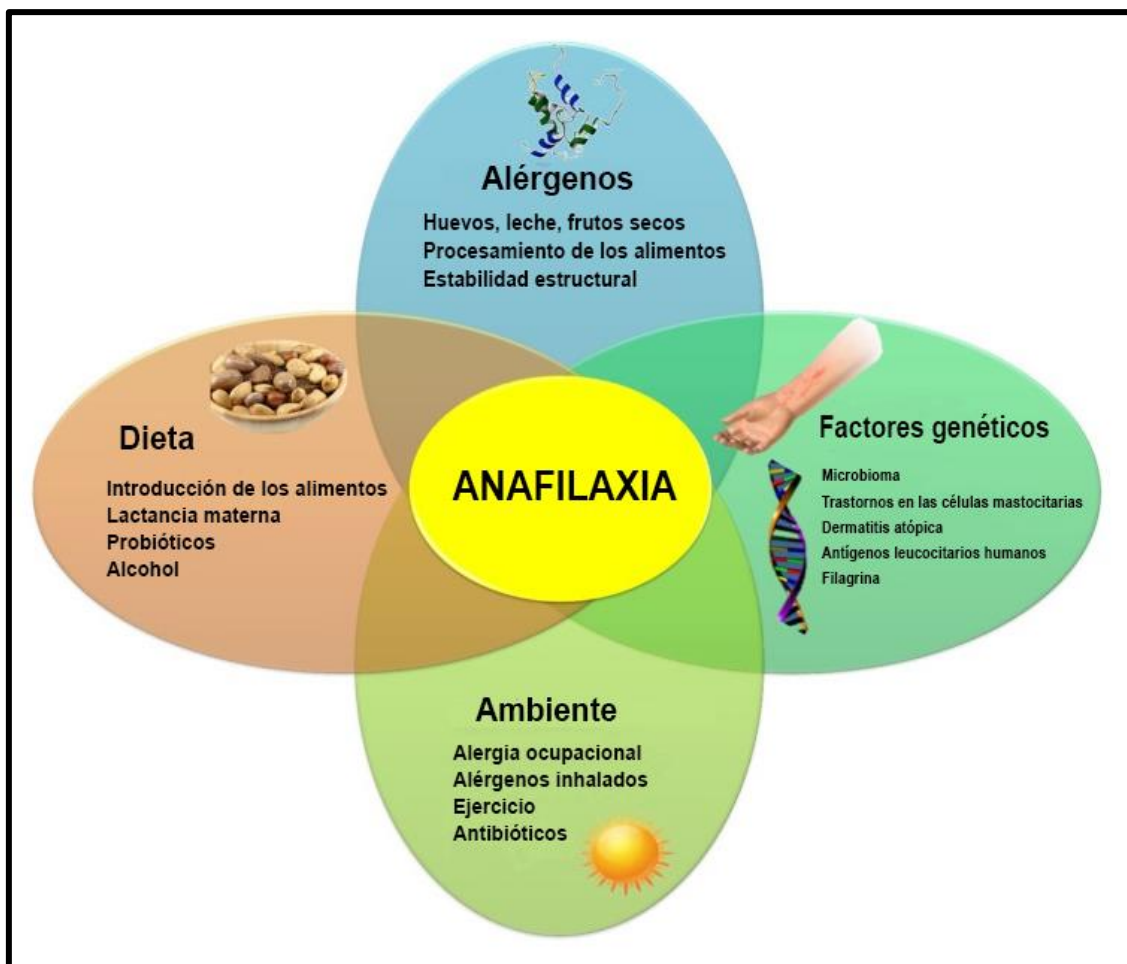
**Figura 9.** Reacciones adversas a alimentos. Modificada de Valenta, *et al.*, 2015.

## PREVALENCIA

Estimar la tasa de alergia a los alimentos en una población es un desafío, porque establecer la alergia a los alimentos a gran escala es difícil. La verdadera alergia a los alimentos se define por una respuesta clínica específica, reproducible e inmunológicamente mediada, tras la exposición al alérgeno. Sólo la provocación alimentaria evalúa directamente la respuesta clínica ante la exposición alérgica, pero el riesgo inherente para los pacientes de la provocación, combinado con el hecho de que requiere mucho tiempo y personal, lo hace insostenible para estudios a gran escala de prevalencia [Dunlop y Keet, 2018].

La subjetividad de la información suministrada por parte del propio paciente (“auto-informe”) o por parte de los padres, es más fácil de obtener en amplias encuestas de población pero, en general, tienden a sobreestimar la prevalencia porque es fácil confundir las intolerancias, como la intolerancia a la lactosa, u otras condiciones con la alergia alimentaria [McGowan, *et al.*, 2016].

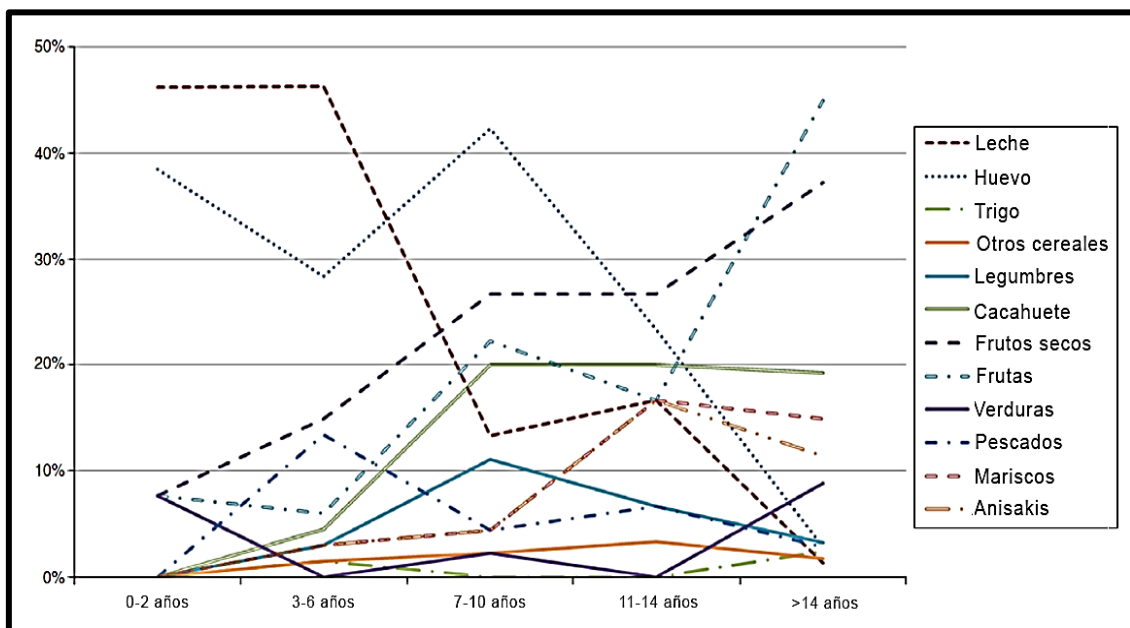
La prevalencia de la alergia alimentaria está creciendo a un ritmo alarmante, y no es sencillo conocer con precisión las razones de este crecimiento. Factores como un ambiente estéril libre de patógenos, cambios en los hábitos alimenticios, deficiencia de vitamina D, composición de la microbiota intestinal, propiedades de estabilidad de ciertos alérgenos, o el consumo de alcohol pueden jugar un papel en este aumento [Sicherer y Sampson, 2014; Benedé, *et al.*, 2017] (Figura 10).



**Figura 10.** Hábitos genéticos, ambientales, dietéticos y los factores de riesgo relacionados con los alérgenos para la alergia alimentaria. Modificada de Benedé, *et al.*, 2017.

En EE. UU. la alergia alimentaria afecta a 15 millones de americanos, incluyendo a 5,9 millones de niños de menos de 18 años [Stallings y Oria, 2016], en Europa afecta al 6% de la población [Nwaru, *et al.*, 2014] y en Asia los trabajos realizados muestran una baja prevalencia [Arakali, *et al.*, 2017]. Todos los estudios epidemiológicos llevados a cabo, y referenciados anteriormente, demuestran un incremento de la prevalencia en las dos últimas décadas.

Las alergias más prevalentes son debidas al cacahuete, leche de vaca, huevo de gallina, marisco, frutos secos, trigo, pescados y soja, y se estima que suman más del 90% de las alergias alimentarias [Allen y Koplin, 2012; Nwaru, *et al.*, 2014; Verrill, *et al.*, 2015]. Es evidente que el perfil alergénico es diferente dependiendo de la edad de la población estudiada y, en el caso de los alérgenos más prevalentes, tendría una distribución similar a la observada en la Figura 11.



**Figura 11.** Variación de la frecuencia de alergia alimentaria por edades y alérgenos más frecuentes. Modificado de Sánchez-López, *et al.*, 2017.

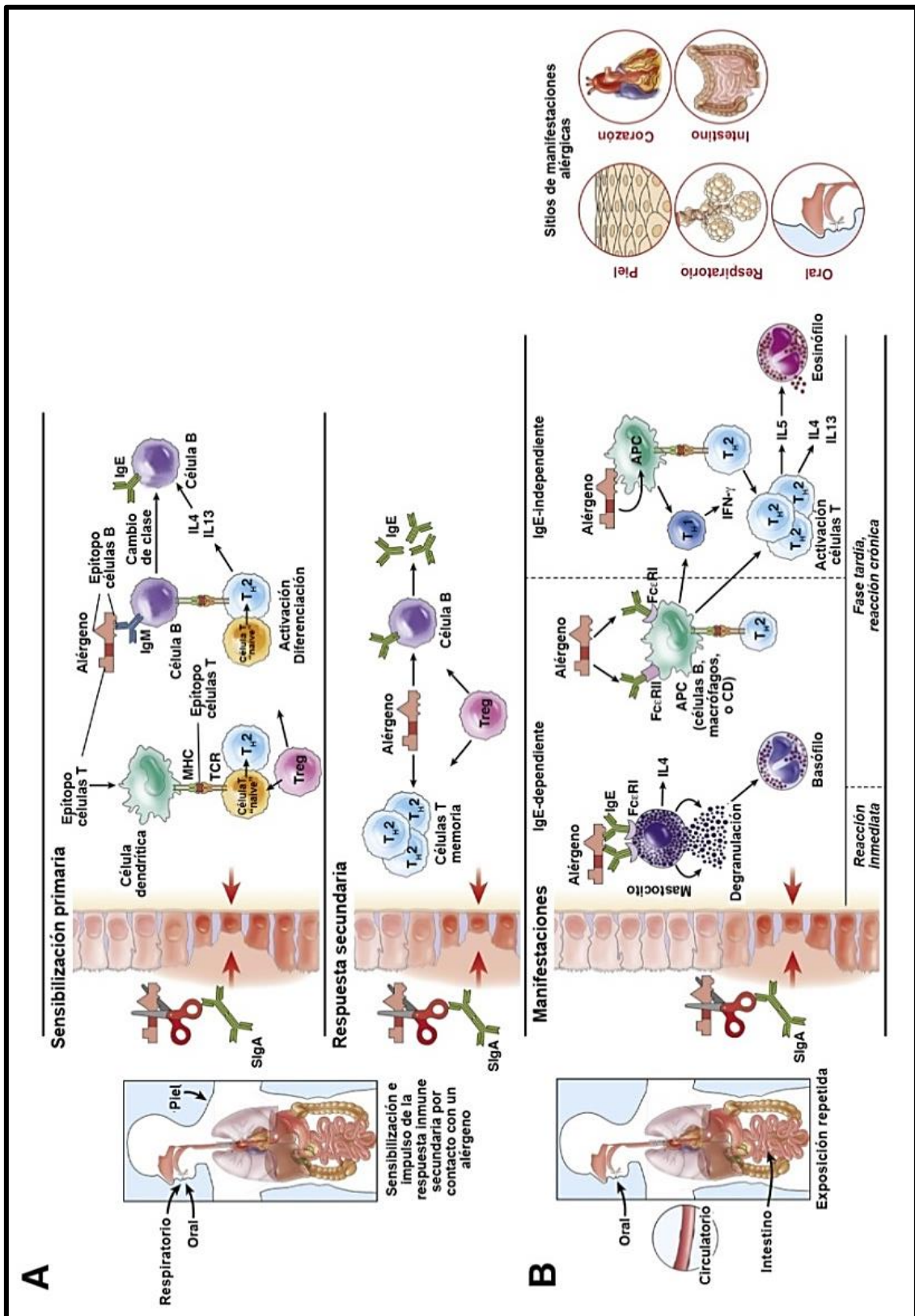
## MECANISMOS

El término sensibilización alérgica describe la primera inducción de una respuesta alérgica tras el contacto con un alérgeno. Existen dos rutas de sensibilización alérgica bien establecidas (Figura 12). Los alérgenos alimentarios de clase 1 (como la leche, el huevo o el cacahuete) que son alérgenos orales y causan sensibilización a través del tracto gastrointestinal [Han, *et al.*, 2012], y los alérgenos alimentarios de clase 2 que son aero-alérgenos (como el alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1) que causan sensibilización a través del tracto respiratorio, y cuyas respuestas inmunes contra estos alérgenos pueden reaccionar de forma cruzada con alérgenos alimentarios homólogos (por ejemplo con el principal alérgeno de manzana Mal d 1) [Ortolani, *et al.*, 1988; Ebner, *et al.*, 1991; Valenta y Kraft, 1996].

Entre los factores determinantes para la sensibilización, existen características de la barrera epitelial, el alérgeno en sí mismo (estabilidad o degradación por el ambiente y/o tracto gastrointestinal), componentes no alergénicos de la matriz alimentaria y sustancias que actúan como adyuvantes [Astwood, *et al.*, 1996; Breiteneder y Mills, 2005]. Se pueden clasificar en factores intrínsecos (genéticos, como mutaciones en el gen de filagrina) y factores exógenos (alcohol, fármacos antiinflamatorios, patógenos o estrés) y se han propuesto como factores que reducen la función de barrera del epitelio intestinal y facilitan la sensibilización. Por otro lado, los anticuerpos secretores, particularmente la IgA secretora (sIgA), tienen papeles importantes en el refuerzo de la barrera epitelial [Groschwitz y Hogan, 2009; Irvine, *et al.*, 2011; Perrier y Corthésy, 2011].

Los alérgenos alimentarios ingresan a la sangre a través del tracto gastrointestinal por lo que los síntomas pueden desarrollarse directamente en los sitios de contacto como por ejemplo en la boca, esófago y/o intestino, o en otros órganos. Las reacciones sistémicas ocurren cuando los alérgenos pasan la barrera de la mucosa a la circulación. La absorción de alérgenos también puede afectar los sistemas circulatorio y nervioso. Entre los factores que contribuyen al tipo y a la gravedad de las reacciones se pueden incluir la cantidad de alérgeno ingerido, la estabilidad de éste frente a la digestión, y la permeabilidad de la barrera epitelial.

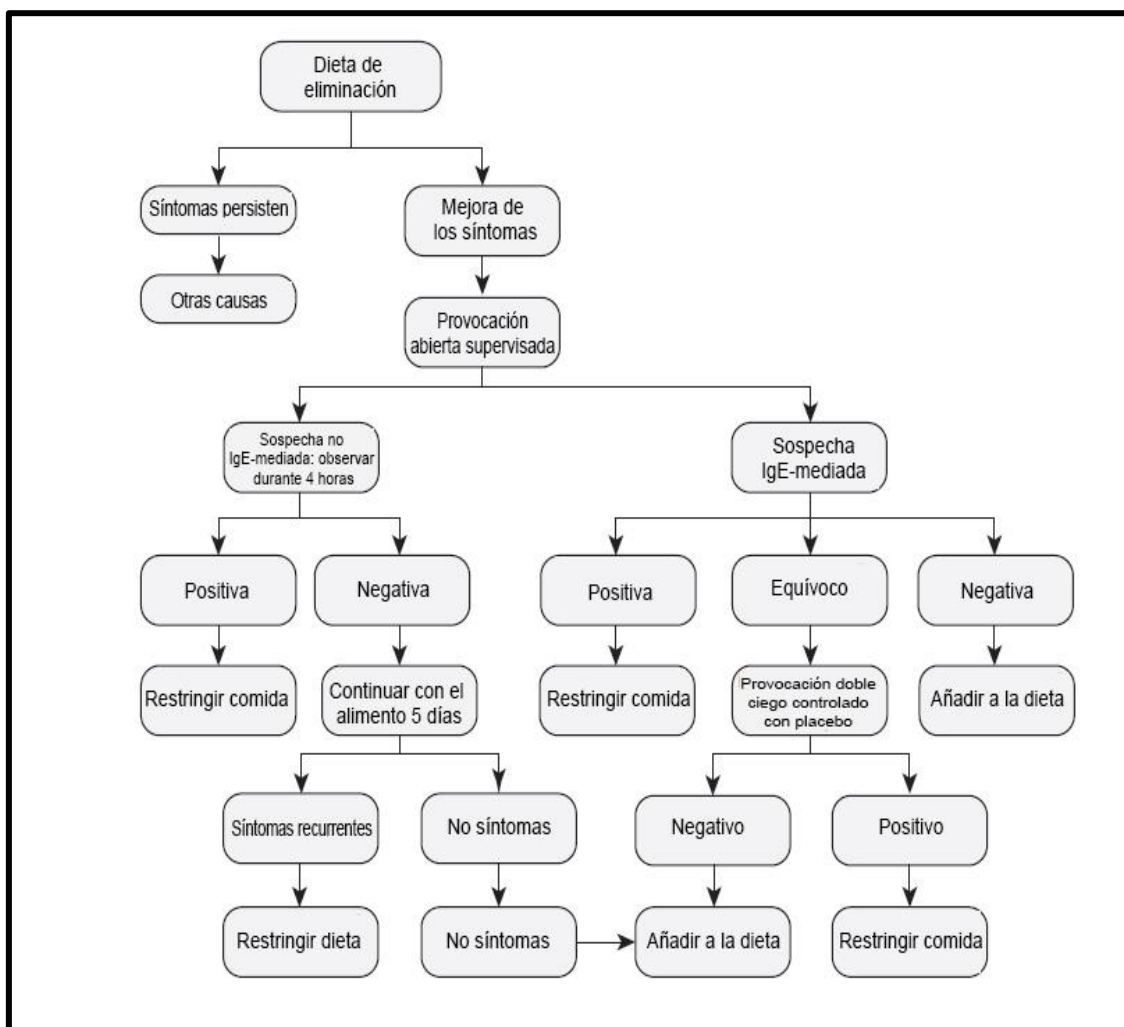
Es importante tener en cuenta los alérgenos que pueden pasar a través de la leche materna durante la lactancia. Aunque sus resultados son controvertidos todavía, hay estudios que demuestran el factor protector que ejerce sobre la posibilidad de desarrollar alergias en el futuro [Oddy, 2017; Pitt, *et al.*, 2017; van Ginkel, *et al.*, 2018].



**Figura 12.** Patogénesis y manifestaciones de la alergia alimentaria. Modificado de Valenta, *et al.*, 2015.

## DIAGNÓSTICO

Siempre que haya sospecha de reacción grave a un alimento, la evaluación diagnóstica debe realizarse inmediatamente. El diagnóstico de alergia alimentaria integra historia clínica, síntomas clínicos, detección de IgE específica, endoscopia con biopsia y, cuando sea necesario, dieta de eliminación y provocación oral con el alimento sospechoso (Figura 13) [Jutel, *et al.*, 2014].



**Figura 13.** Algoritmo de diagnóstico y manejo de las alergias alimentarias. Modificado de Jutel, *et al.*, 2014.

La historia clínica es el pilar del diagnóstico, definiendo los alimentos involucrados, el tiempo de reacción, los cofactores (aspirina, ejercicio y alcohol) y los umbrales que definen la cantidad necesaria para producir la reacción [Hoffmann-Sommergruber, *et al.*, 2015].

La producción de los extractos comerciales, mediante procesos térmicos o enzimáticos, puede destruir proteínas lábiles que contribuyen a la alergenicidad de los alimentos, produciendo falsos negativos [Carrard, *et al.*, 2015], por lo que, en ocasiones, es importante que la prueba cutánea emplee alimentos frescos, especialmente en frutas y verduras.

La endoscopia y/o biopsia se deben realizar ante síntomas gastrointestinales sugestivos de alergia alimentaria cuando hay ausencia de IgE específica frente a alimentos, con el objetivo de diagnosticar esofagitis eosinofílica [Chehade y Aceves, 2010].

## TRATAMIENTO

El actual tratamiento estándar es la evitación estricta del alimento o alimentos implicados. Hasta la fecha no hay ningún tratamiento regulado y aprobado para la alergia alimentaria. El tratamiento de las ingestiones accidentales implica el uso de un auto-inyector de adrenalina que, por su complejidad en el manejo, produce ansiedad y afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes [Primeau, *et al.*, 2000; Chad, *et al.*, 2013; Pajno, *et al.*, 2018]. Es importante conocer los términos que hacen referencia a las diferentes etapas del tratamiento (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Definiciones de desensibilización, falta de respuesta sostenida, remisión y tolerancia oral. Modificada de Burks, et al., 2018.*

Concepto	Definición
<b>Desensibilización</b>	Se define como un aumento en el umbral de reacción a un alérgeno alimentario mientras recibe terapia activa, y podría servir como protección ante la ingestión accidental. La desensibilización puede lograrse después de meses de terapia y, lo que es más importante, solo continúa durante la terapia.
<b>Falta de respuesta sostenida</b>	Se define como la falta de reacción clínica a un alérgeno alimentario, después de suspender el tratamiento activo durante un período de tiempo. Actualmente, se cree que se requiere algún nivel de exposición continuada a alérgenos para mantener la falta de respuesta.
<b>Remisión</b>	Definido como un estado temporal de falta de respuesta después de la inmunoterapia. La pérdida de reacciones clínicas, después de varias formas de inmunoterapia, ocurre en la inmunoterapia de alergia a los alimentos de la misma manera que en la inmunoterapia frente a alérgenos ambientales.
<b>Tolerancia oral</b>	Se define como una falta completa de reactividad clínica ante un alérgeno alimentario ingerido, generalmente ocurre de manera natural. No se cree que este estado de tolerancia clínica dependa de la exposición continua a alérgenos alimentarios.



En la actualidad muchos tipos de inmunoterapia que incluyen la oral y la sublingual (ver página 38) están bajo investigación para el tratamiento de la alergia alimentaria [Pfaar, *et al.*, 2018].

La inmunoterapia oral ha sido una de las más estudiadas con varios alimentos, centrándose sobre todo en cacahuete, leche y huevo [Blumchen, *et al.*, 2010; Varshney, *et al.*, 2011; Burks, *et al.*, 2012; Keet, *et al.*, 2013; Vickery, *et al.*, 2014, 2017; Jones, *et al.*, 2016]. Esta forma de inmunoterapia requiere la ingestión diaria de dosis crecientes del alérgeno con la esperanza de inducir lentamente la desensibilización.

El mecanismo del tratamiento implica la modificación de la respuesta inmune, incluyendo el cambio en la producción de IgE específica de alérgeno a IgG4 y la activación reducida de basófilos con un aumento en el número de células T reguladoras [Kulis, *et al.*, 2011; Thyagarajan, *et al.*, 2012; Fuentes-Aparicio, *et al.*, 2014].

Es importante mencionar las terapias que combinan la inmunoterapia oral con tratamientos anti-IgE. En este sentido, se utiliza el omalizumab para permitir dosis de escalado más rápidas y con menos efectos alérgicos secundarios. El omalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que se une de forma específica a la inmunoglobulina IgE, bloqueando su acción e impidiendo su unión con el receptor de alta afinidad (FcεRI) de la superficie del mastocito y del basófilo. Por lo tanto, disminuye la cantidad circulante de IgE e interrumpe la cascada de fenómenos bioquímicos que desencadenan los síntomas alérgicos [Hofmann, *et al.*, 2009; Schneider, *et al.*, 2013; MacGinnitie, *et al.*, 2017].

La inmunoterapia sublingual requiere diariamente la aplicación de un extracto alérgico en el espacio sublingual (sostenido debajo de la lengua durante 2-3 minutos y después tragado), durante el tiempo que dure el tratamiento. Esta inmunoterapia es bien tolerada, con efectos secundarios mínimos que típicamente están limitados a picor u hormigueo orofaríngeo [Enrique, *et al.*, 2005, 2008; De Boissieu y Dupont, 2006; Fernández-Rivas, *et al.*, 2009].

En cuanto a la prevención, dado que una barrera cutánea alterada puede contribuir a la sensibilización y al posterior desarrollo de alergia alimentaria, también es importante prevenir la dermatitis atópica como un medio para prevenir la alergia alimentaria, aunque este vínculo no se ha demostrado directamente. Otras estrategias que incluirían pro y prebióticos, dietas de restricción materna, lactancia materna y el uso de fórmulas específicas, han mostrado resultados variables, por lo que necesitan más investigación [Meng, *et al.*, 2018].

## ALERGIA A LOS FRUTOS SECOS

Los frutos secos son una fuente de alérgenos importante y frecuente, que inducen reacciones alérgicas mediadas por IgE, que pueden causar reacciones graves y, a veces incluso fatales. La alergia a los frutos secos se ha reportado en todo el mundo con una prevalencia de hasta el 4,9% de la población general [McWilliam, *et al.*, 2015]. Los frutos secos, como grupo, son una de las ocho alergias más comunes, y las reacciones que producen pueden ser fatales [Sicherer y Sampson, 2018].

Entre lo que se considera fruto seco está el anacardo, la nuez, el pistacho, la almendra, la nuez de Brasil, la nuez de pino, la avellana y la nuez de macadamia [McWilliam, *et al.*, 2015]. Los frutos secos que más comúnmente causan reacciones alérgicas son la nuez, la avellana, el anacardo y la almendra [Sicherer, *et al.*, 2001]. Aunque los cacahuets a menudo se consideran frutos secos (presentan entre un 20 y un 68% de reactividad cruzada), crecen bajo tierra y, por tanto, pertenecen a la familia de las leguminosas.

A los efectos de las leyes de etiquetado, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los EE. UU. considera adicionalmente las siguientes sustancias dentro del grupo de los frutos secos: hayuco, nuez moscada, castaña, coco, nuez de ginkgo, nuez de lichi, nuez o almendra de pili y nuez de karité [US Food and Drug Administration (FDA), 2004].

Botánicamente, un fruto seco se compone de una cáscara seca dura que protege la semilla. La definición botánica estricta no siempre está en línea con lo que generalmente se acepta como un fruto seco: “una semilla comestible que se origina de un árbol”. Por lo general, estas semillas contienen una gran cantidad de nutrientes esenciales para proporcionarlas energía para germinar, sobrevivir y proliferar.

Los frutos secos se pueden consumir solos, mezclados entre ellos, o como ingredientes de una gran variedad de platos. Además, están presentes en diferentes productos alimentarios, como el chocolate, el turrón, el mazapán, los cereales, los productos horneados, las cervezas y las ensaladas. La exposición a los frutos secos también puede ocurrir mediante el uso de cosméticos y el manejo de alimentos para mascotas.

El procesado de los alimentos como la cocción, el tostado o el tratamiento enzimático puede afectar la alergenicidad de las proteínas alimentarias. Se ha demostrado que la cocción y tostado de avellanas y nueces puede destruir algunas fracciones alergénicas, mientras que otras proteínas permanecen estables y mantienen su capacidad de unión a IgE, [Müller, *et al.*, 2000; Hansen, *et al.*, 2003; Downs, *et al.*, 2016].

Las proteínas implicadas en la alergia a los frutos secos se pueden clasificar en siete grandes familias:

- 2S albúminas: junto con las LTPs pertenecen a la superfamilia de las prolaminas. Estas proteínas tienen una estructura alfa-hélice global y comparten 6-8 residuos de cisteína conservados, que forman puentes disulfuro y facilitan una estructura compacta. Además de estos determinantes estructurales conservados, las similitudes de secuencia son bastante bajas entre los miembros de esta familia de proteínas. La mayoría de ellas se dividen en una gran subunidad de aproximadamente 9 kDa y una pequeña subunidad de aproximadamente 4 kDa [Moreno y Clemente, 2008]. Las modificaciones postraduccionales contribuyen a la heterogeneidad de las fracciones de estas proteínas. Su estructura compacta presenta una alta resistencia cuando se somete a un tratamiento térmico y enzimático.
- Proteínas transportadoras de lípidos no específicas (nsLTPs): se cree que estas proteínas transportan fosfolípidos a través de las membranas, y se regulan positivamente durante la defensa de la planta frente a hongos e infecciones bacterianas [De Lucca, *et al.*, 2005]. Se caracterizan por una estructura basada en 4 puentes disulfuro, que forman una cavidad interna, que permite transportar diferentes ligandos como ácidos grasos, acil CoA, fosfolípidos, glicolípidos, ácidos grasos hidroxilados y prostaglandina B2 [Zachowski, *et al.*, 1998; Carvalho y Gomes, 2007]. Estas proteínas están presentes en el polen, las frutas, los frutos secos y las semillas. Se consideran verdaderos alérgenos alimentarios, lo que indica que la sensibilización se produce a través del tracto gastrointestinal. Estos alérgenos se acumulan en las capas externas de frutas y semillas, muestran una notable estabilidad contra el tratamiento térmico y la degradación enzimática y, sin embargo, tienen una estabilidad pH-dependiente.

- Vicilinas: también conocidas como globulinas 7S. Junto con las leguminas (11S globulinas), pertenecen a la superfamilia de cupinas caracterizada por una estructura en barril- $\beta$ . Generalmente, estas glicoproteínas se procesan proteolíticamente proporcionando así una gama de isoformas. En su forma nativa, las vicilinas aparecen como trímeros con una masa molecular total de aproximadamente 150-190 kDa. Muestran una estabilidad intermedia cuando se someten a calor y tratamiento enzimático.
- Leguminas: son proteínas de alto peso molecular (aproximadamente 350 kDa) que constan de seis subunidades. La proteína precursora se procesa para formar trímeros en el retículo endoplasmático y luego se transfiere a las vacuolas de almacenamiento de proteínas. Allí, cada subunidad se escinde en un polipéptido ácido (40 kDa) y básico (20 kDa). Estas subunidades permanecen unidas por un puente disulfuro y finalmente forman una estructura hexamérica [Shewry, 1995].
- Oleosinas: se expresan mayoritariamente en semillas, nueces y cacahuetes, son proteínas estructurales de los cuerpos oleosos. Estos cuerpos consisten en lípidos neutros (92-98%), predominantemente triacilgliceroles, una monocapa externa de fosfolípidos (1-4%) y proteínas (1-4%), principalmente oleosinas [Alexander, *et al.*, 2002]. Las proteínas de aproximadamente 15-26 kDa comparten estructuras similares, con un dominio hidrofóbico central bien conservado de aproximadamente 68-74 residuos de aminoácidos, que se inserta en la matriz de triacilglicerol, flanqueada por dominios hidrófilos N y C terminal de longitud variable (50-70 y 55-98 residuos). Además de su papel como proteínas estructurales en los cuerpos oleosos, existe una evidencia creciente de que también pueden ayudar en la biosíntesis y en la movilización de aceites [Parthibane, *et al.*, 2012]. Aunque las oleosinas se han empezado a identificar como alérgenos, falta información adicional debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas [Akkerdaas, *et al.*, 2006; Leduc, *et al.*, 2006; Schwager, *et al.*, 2017].
- Proteínas homólogas de Bet v 1: estas proteínas no están glicosiladas, comparten una alta similitud de secuencia y, generalmente, están codificadas por una familia de múltiples genes. La estructura general también está muy conservada, formada por siete hojas  $\beta$  antiparalelas que se curvan alrededor de una larga hélice C-terminal y dos hélices adicionales, proporcionando así una gran bolsa hidrofóbica que puede unir ligandos tales como esteroides vegetales.

Se expresan en una gran variedad de órganos de plantas, predominantemente en polen maduro, frutas y semillas. Junto con los homólogos de árboles estrechamente relacionados, estos alérgenos causan alergia por inhalación. Tras la sensibilización primaria al alérgeno del polen, la mayoría de los pacientes desarrollan síntomas alérgicos por la ingestión de proteínas relacionadas con Bet v 1 de los alimentos. Por lo general, los síntomas de esta alergia alimentaria, relacionada con el polen, tienden a restringirse a la cavidad oral y rara vez inducen síntomas generalizados severos. Estas proteínas se degradan rápidamente cuando se someten a calentamiento o tratamiento enzimático.

- **Profilinas:** son pequeñas proteínas citosólicas no glicosiladas (12-15 kDa) que se expresan en todas las células eucariotas y cumplen una serie de funciones clave, como la regulación del transporte intracelular, el movimiento celular y la señalización [Witke, 2004]. Estas proteínas tienen una estructura globular con una lámina  $\beta$  antiparalela central de siete cadenas. Tienen estabilidad intermedia cuando se las somete a calentamiento, presión elevada y tratamiento enzimático. Su elevada conservación en las secuencias explica la reactividad cruzada que producen (panalergeno); sin embargo, no siempre se relaciona con la relevancia clínica.

Hasta ahora, se han identificado varios alérgenos alimentarios a partir de frutos secos (Tabla 14), algunos están disponibles como proteínas naturales purificadas, mientras que otros son productos recombinantes derivados de sistemas de expresión procariotas y eucariotas. Su caracterización físico-química abarca, desde el análisis de secuencias primarias hasta el análisis estructural detallado, determinación de epítomos IgE y evaluación de la estabilidad como alérgenos en el procesamiento de los alimentos.

Actualmente, los extractos de alérgenos completos, utilizados para las pruebas de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* no contienen todos los componentes alérgicos clínicamente relevantes [Aalberse, *et al.*, 2013; Zuidmeer-Jongejan, *et al.*, 2014; Jappe, *et al.*, 2016; Teodorowicz, *et al.*, 2016], razón por la cual los resultados son a veces negativos, incluso si la historia del paciente es positiva.

Aunque no se han identificado todos los componentes alérgicos individuales de las fuentes de alérgenos, se ha demostrado que, durante el proceso de extracción, algunos alérgenos pueden obviarse y, por lo tanto, no formar parte de las pruebas de diagnóstico disponibles comercialmente [Alonzi, *et al.*, 2011].

Tabla 14

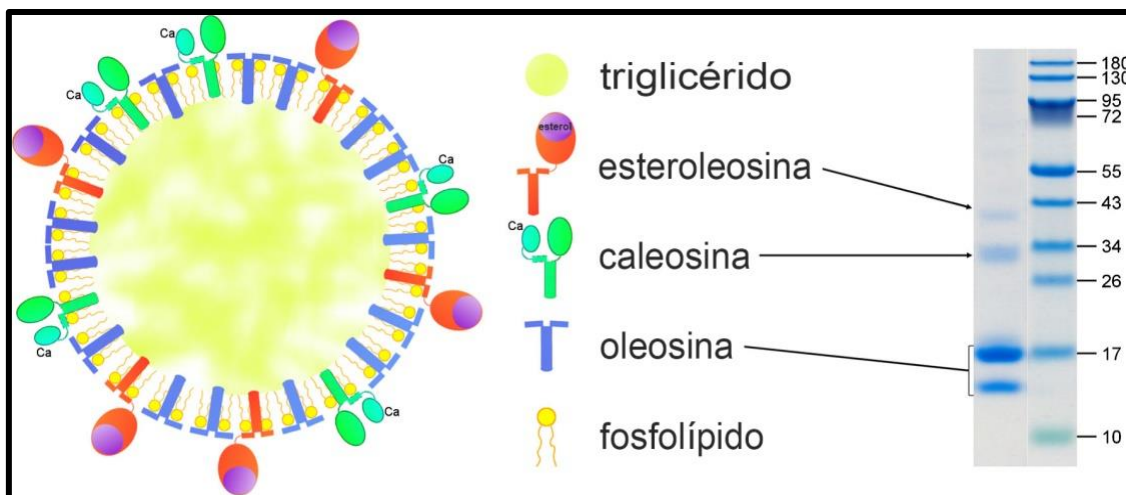
Alérgenos de los principales frutos secos.

Fruto seco	Proteína	Tipo de proteína	Relevancia clínica	PM (kDa)
<b>Avellana</b>	Cor a 1	PR-10	Homóloga Bet v 1. SPA	17
	Cor a 2	Profilina	Homóloga Bet v 2. SPA	14
	Cor a 6	Isoflavona reductasa		35
	Cor a 8	LTP	Reacción sistémica	9
	Cor a 9	11S globulina	Reacción sistémica	40
	Cor a 10	De unión luminal		70
	Cor a 11	7S globulina		48
	Cor a 12	Oleosina	Reacción sistémica	17
	Cor a 13	Oleosina	Reacción sistémica	14-16
	Cor a 14	2S albúmina	Reacción sistémica	10
<b>Anacardo</b>	Ana o 1	Vicilina		50
	Ana o 2	11S globulina		55
	Ana o 3	2S albúmina	Reacción sistémica	14
<b>Pistacho</b>	Pis v 1	2S albúmina	Homóloga Ana o 3. RS	7
	Pis v 2	11S globulina	Homóloga Ana o 2. RS	32
	Pis v 3	Vicilina		55
	Pis v 4	Superóxido dismutasa		25,7
	Pis v 5	11S globulina	Homóloga Ana o 1	36
<b>Nuez</b>	Jug r 1	2S albúmina	Reacción sistémica	15-16
	Jug r 2	7S globulina	Reacción sistémica	44
	Jug r 3	LTP	Reacción sistémica	9
	Jug r 4	11S globulina	Reacción sistémica	-
	Jug r 5	PR-10		20
	Jug r 6	Vicilina		47
	Jug r 7	Profilina		13
	Jug r 8	LTP	Reacción sistémica	9
<b>Almendra</b>	Pru du 3	LTP	Reacción sistémica	9
	Pru du 4	Profilina		14
	Pru du 5	Proteína ribosomal		10
	Pru du 6	11S globulina	Reacción sistémica	63

SPA: síndrome polen-alimento. RS: reacción sistémica

Los cuerpos oleosos, de los que ya se ha hablado brevemente, también conocidos como oleosomas, cuerpos lipídicos o esferosomas, son orgánulos esféricos discretos que se encuentran en semillas de plantas oleaginosas, pero también en algas, musgos y helechos [Jayaram y Bal, 1991; Huang, *et al.*, 2009; Huang y Huang, 2015].

Estos cuerpos oleosos son orgánulos de almacenamiento de lípidos (triglicéridos) que se utilizan como recurso energético para la germinación de las semillas. Consisten en un núcleo de lípidos, rodeado por una sola capa de fosfolípidos y proteínas integrales, llamadas oleosinas (15-24 kDa), caleosinas (aproximadamente 30 kDa) y esteroleosinas (aproximadamente 40 kDa) (Figura 14). Las oleosinas son, con mucho, las proteínas más abundantes de los cuerpos oleosos que representan el 80-90% de la proteína total [Chen, *et al.*, 2004].



**Figura 14.** Esquema de un cuerpo oleoso con sus componentes (izquierda) y determinación de la masa molecular de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (derecha). Modificada de Jappe y Schwager, 2017.

Las oleosinas fueron nombradas en 1990, tomando su significado de “*oil (oleo-) protein (-sin)*” [Murphy, *et al.*, 1991], las caleosinas en 1999, tomando su significado de “*calcium-binding (cal-) oil protein (leosin)*” [Chen, *et al.*, 1999] y las esteroleosinas en 2002, tomando su significado de “*sterol-regulatory (sterol-) oil protein (-leosin)*” [Lin, *et al.*, 2002].

Una **oleosina** comprende tres dominios estructurales: un dominio anfipático N-terminal, un dominio de anclaje hidrofóbico del cuerpo oleoso central y un dominio  $\alpha$ -hélice anfipático C-terminal (Figura 15.A).

El extremo N-terminal de la oleosina se bloquea por acetilación tras la eliminación de la primera metionina, una modificación presumiblemente relacionada con la mejora de la estabilidad estructural de la proteína, para cumplir con el almacenamiento a largo plazo de estos cuerpos lipídicos dentro de la semilla.

Los dominios N y C terminales no se conservan entre las oleosinas de diversas especies, e incluso sus longitudes son bastante variables en las diferentes isoformas. Por el contrario, el dominio de anclaje central está altamente conservado entre diversas especies, particularmente un motivo de nudo de prolina relativamente hidrófilo en el medio de la secuencia [Abell, *et al.*, 2004; Peng, *et al.*, 2007].

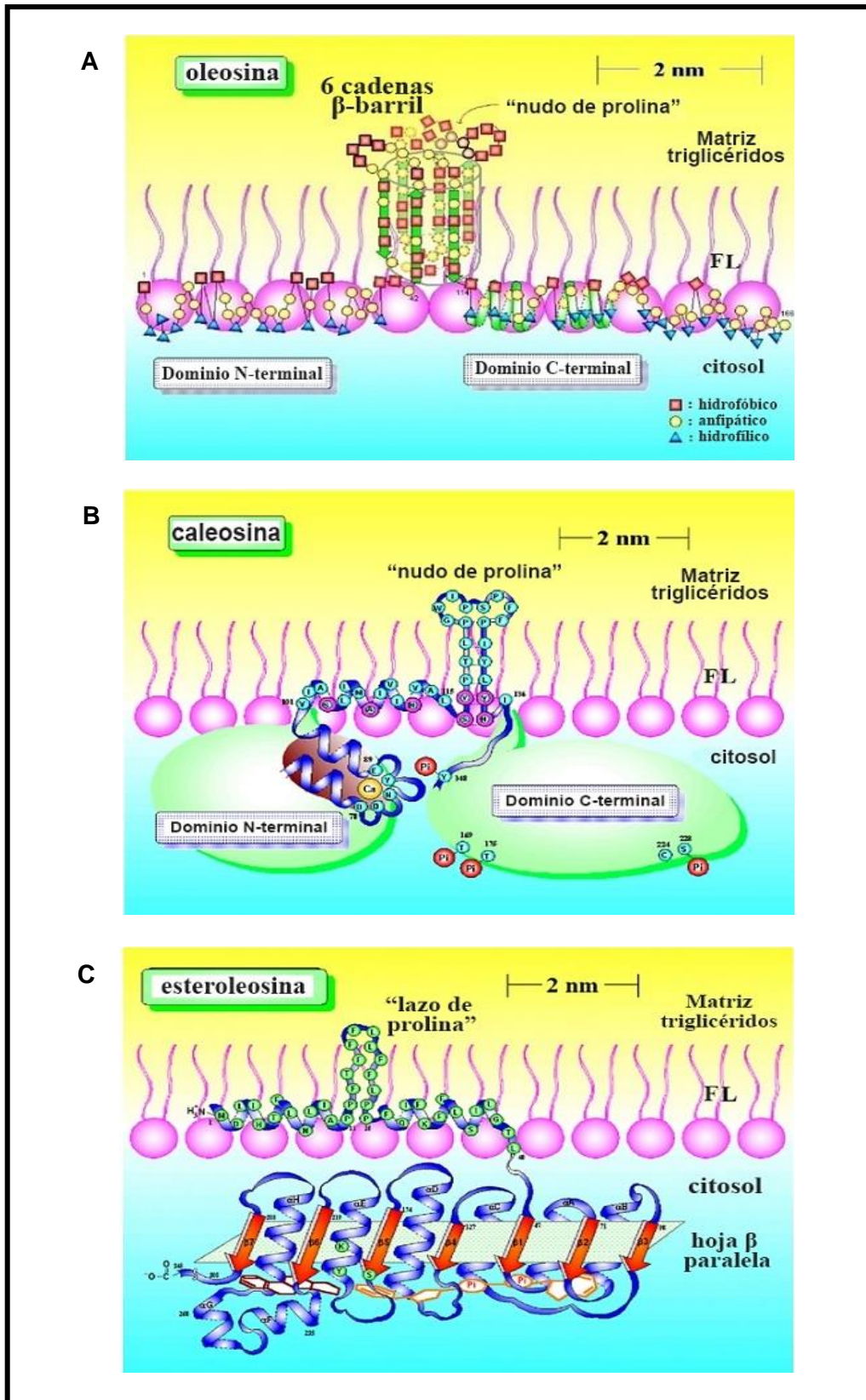
Una **caleosina** también comprende tres dominios estructurales: un dominio de unión a calcio hidrofílico N-terminal, un dominio de anclaje hidrofóbico central y un dominio de fosforilación hidrófilo C-terminal (Figura 15.B). El N-terminal de la caleosina también se bloquea con acetilación después de la eliminación de la primera metionina, presumiblemente por el mismo mecanismo encontrado en la oleosina.

El dominio hidrofílico N-terminal consiste en un motivo EF de unión a calcio de 28 residuos, que incluye un residuo de glicina invariable como punto de inflexión estructural y cinco residuos conservados que contienen oxígeno como ligandos de unión a calcio [Chen, *et al.*, 1999; Frandsen, *et al.*, 2001]. El dominio hidrofóbico central de la caleosina es relativamente corto en comparación con el de la oleosina, y comprende una  $\alpha$ -hélice anfipática y una región de anclaje.

Una **esteroleosina** comprende un dominio de anclaje N-terminal relativamente pequeño y un dominio deshidrogenasa de unión a esteroles relativamente grande (Figura 15.C). El extremo N-terminal queda libre en contraste con los extremos de oleosinas y caleosinas bloqueados por acetilación [Lin, *et al.*, 2002, 2005]. Hasta ahora, se han realizado menos investigaciones sobre la estructura de la esteroleosina en comparación con la de la oleosina o la caleosina.

El segmento de anclaje N-terminal comprende dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas (12 residuos en cada hélice), conectadas por una secuencia hidrofóbica de 14 residuos bordeados por 1-2 residuos de prolina en cada extremo. El dominio de deshidrogenasa de unión a esteroles contiene un subdominio de unión a NADPH, una región de sitio activo y un subdominio de unión a esteroles.





**Figura 15.** Estructura tridimensional de oleosinas, caleosinas y esteroleosinas. Modificado de Tzen, 2012.

En 1998, el grupo de Olszewski describió por primera vez una proteína alergénica presente en el aceite de cacahuete [Olszewski, *et al.*, 1998]. Después de su purificación y caracterización, pudieron demostrar unión a IgE en sueros de 3 pacientes alérgicos al cacahuete en 2002 [Pons, *et al.*, 2002]. Además, este grupo proporcionó los primeros indicios de una mayor alergenicidad de las oleosinas de los cacahuetes tostados.

Hasta ahora, las oleosinas registradas como alérgenos en la WHO/IUIS (<http://allergen.org>) derivan de tres fuentes vegetales: avellana, cacahuete y sésamo (Tabla 15).

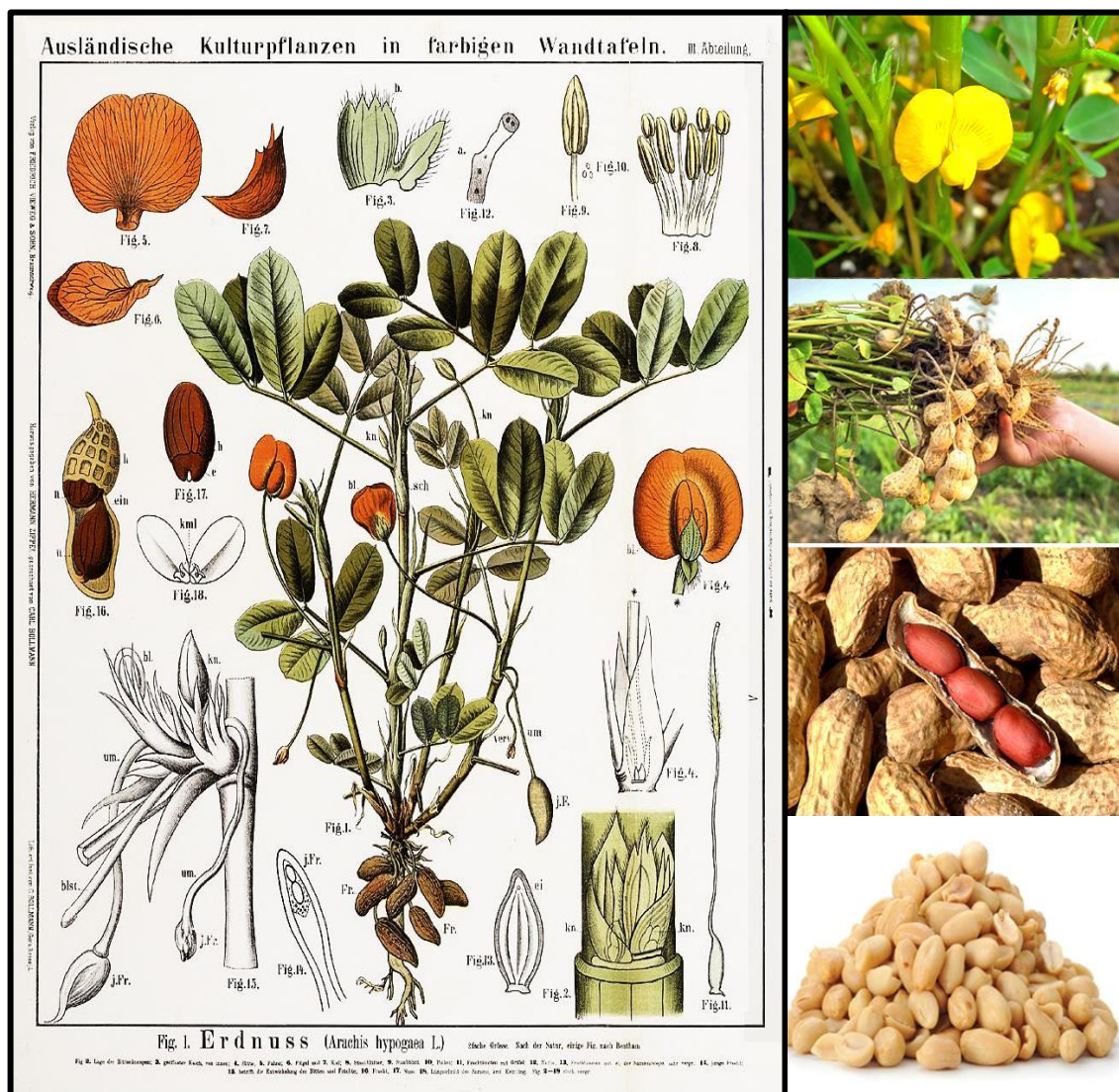
**Tabla 15**

*Oleosinas registradas en la WHO/IUIS.*

<b>Fruto seco</b>	<b>Proteína</b>	<b>PM (kDa)</b>
Avellana	Cor a 12	17
	Cor a 13	14-16
Cacahuete	Ara h 10	16
	Ara h 11	14
	Ara h 14	17,5
	Ara h 15	17
Sésamo	Ses i 4	17
	Ses i 5	15

## ALERGIA AL CACAHUETE

El cacahuete es una semilla de una planta leguminosa (*Arachis hypogaea*) de la familia Leguminosae. Es una hierba, anual, erecta o con tallo ascendente de 30-80 cm de altura, con tallos pubescentes de color amarillento. Presenta flores de 8 a 10 mm con tubo del cáliz estrecho, corola de color amarillo dorado; estandarte abierto y diferentes alas desde oblongas a ovadas. El fruto es una legumbre, pero considerada un fruto seco de desarrollo subterráneo, que puede presentar de una a cuatro semillas. Estas últimas tienen un tegumento de color rojizo oscuro, son oblongas y de unos 5-10 mm de diámetro (Figura 16).



**Figura 16.** A la izquierda inflorescencia, partes y secciones de *Arachis hypogaea*. Modificado de Zippel, Hermann (serie 'Ausländische Kulturpflanzen in farbigen Wandtafeln') - Kennis als kunst: botanische onderwijsplaten 1870–1960. A la derecha fotografías de diferentes partes del cacahuete.

Es una planta prehistórica cuyo origen está en América del Sur. Su cultivo se extendió a Europa y África y, en el siglo XIX, se introdujo en EE. UU., que sigue siendo uno de los cinco principales países productores de cacahuete en el mundo, además del mayor consumidor.

Valencia fue el primer punto de Europa donde se cultivó esta planta a finales del siglo XVIII, por iniciativa del canónigo Francisco Tabares de Ulloa que, en 1800, publicó los resultados de su plantación [Ulloa, 1800]. De allí fue llevada a Argelia y norte de África por agricultores valencianos emigrados a las plazas de soberanía española del Oranesado (Figura 17).



**Figura 17.** A la izquierda portada del libro de Francisco Tabares de Ulloa y a la derecha familia valenciana tamizando cacahuetes.

Su etimología es amerindia, de la voz náhuatl *tlalkakáwat*, compuesta de *tlalli*= tierra + *kakáwat*= cacao. En su primer uso escrito se decía 'cacaguete', en la obra del religioso Bernabé Cobo - Historia del Nuevo Mundo (1653).

En el Diccionario castellano, con las voces de ciencias y artes de Esteban Terreros, a mediados del XVIII se lee ya el término en su morfología actual. En Cuba y en América del Sur sigue en vigor el término maní, de la lengua taína hablada en Haití en tiempos de la conquista.

El cacahuete tiene un alto valor nutricional debido a su alto contenido en grasa y proteínas (Tabla 16). Se comen frescos, tostados, hervidos y también se usan en la cocina y en la confitería. El aceite de cacahuete se usa para cocinar, para la fabricación de margarina, de jabón y con fines industriales.

Tabla 16

*Nutrientes del cacahuete. Departamento de Agricultura de Estados Unidos.*

	<b>Nutriente</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor por 100 g</b>
	Agua	g	6,39
	Energía	Kcal	570
	Proteína	g	26,15
	Lípidos totales (grasa)	g	49,60
<b>Minerales</b>	Calcio	mg	106
	Hierro	mg	3,91
	Magnesio	mg	188
	Fósforo	mg	388
	Potasio	mg	744
	Sodio	mg	22
	Cinc	mg	2,12
	Cobre	mg	0,900
	Manganeso	mg	2,640
	Selenio	µg	7,2
<b>Vitaminas</b>	Tiamina	mg	0,675
	Riboflavina	mg	0,135
	Niacina	mg	15,925
	Ácido pantoténico	mg	1,769
	Vitamina B-6	mg	0,348
	Folato total	µg	240
<b>Lípidos</b>	Ácidos grasos saturados	g	7,098
	Ácidos grasos monoinsaturados	g	22,325
	Ácidos grasos poliinsaturados	g	17,238
<b>Aminoácidos</b>	Triptófano	g	0,254
	Treonina	g	0,896
	Isoleucina	g	0,920
	Leucina	g	1,696
	Lisina	g	0,939
	Metionina	g	0,321
	Cistina	g	0,335
	Fenilalanina	g	1,356
	Tirosina	g	1,063
	Valina	g	1,097
	Arginina	g	3,128
	Histidina	g	0,661
	Alanina	g	1,039
	Ácido aspártico	g	3,190
	Ácido glutámico	g	5,465
	Glicina	g	1,576
Prolina	g	1,154	
Serina	g	1,289	

Existen múltiples vías de exposición al cacahuete. Dichas vías incluyen la ingestión, la inhalación y el contacto con la mucosa o la piel y pueden provocar reacciones clínicas. La exposición oral, ya sea directa o indirecta, es más probable que cause reacciones severas, incluso con pequeñas cantidades [Hourihane, *et al.*, 1997; Sicherer, *et al.*, 2001].

La primera inmunoterapia oral al cacahuete descrita fue en EE. UU. en 2009 [Jones, *et al.*, 2009]. Estudios más recientes han demostrado la seguridad, la eficacia y la viabilidad de una inmunoterapia oral temprana en el tratamiento de la alergia al cacahuete [Vickery, *et al.*, 2017], así como nuevos marcadores predictivos de efectos adversos durante el tratamiento [Virkud, *et al.*, 2017].

La inmunoterapia sublingual ha sido evaluada mediante ensayos clínicos [Kim, *et al.*, 2011; Fleischer, *et al.*, 2013; Burks, *et al.*, 2015; Burk, *et al.*, 2016] encontrándose cambios menos significativos en los niveles de IgE específica e IgG4 con respecto a la inmunoterapia oral.

## PREVALENCIA

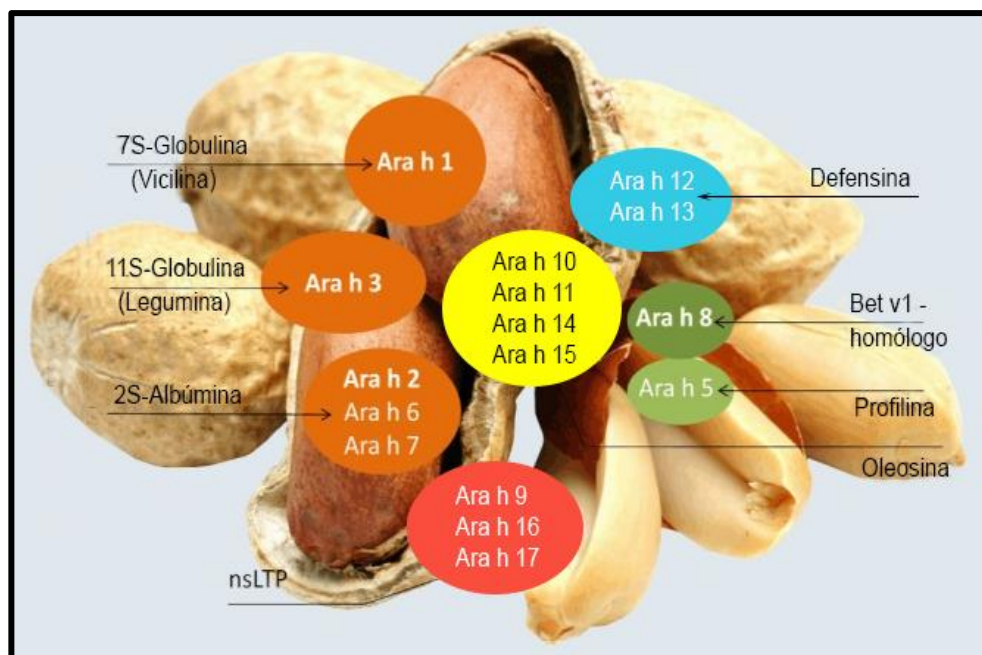
La alergia al cacahuete suele presentarse durante los primeros años de vida, pero la mayoría de los niños alérgicos no la superan al llegar a la fase adulta [Skolnick, *et al.*, 2001]. La prevalencia, por informe del propio paciente en EE. UU., varía de aproximadamente 1,2% a 2% en los niños, y de 0,6% a 0,8% en los adultos. Existen tasas similares de alergia al cacahuete por “auto-informe” en Europa occidental y en Canadá, aunque, en general, las tasas de alergia al cacahuete son más altas en el norte de Europa [Nwaru, *et al.*, 2014], y más bajas en Oriente Medio y Asia [Chen, *et al.*, 2011; Ho, *et al.*, 2012; Kaya, *et al.*, 2013].

En Europa, un meta-análisis de la prevalencia obtuvo una tasa de alergia al cacahuete mucho más baja (0,2%), pero esta cifra aumentó al 1,6% cuando se combinaron la provocación alimentaria y la historia clínica [Nwaru, *et al.*, 2014]. La baja prevalencia en Israel llevó a la hipótesis de que la introducción temprana previene la alergia al cacahuete, un hallazgo ahora confirmado en un ensayo aleatorizado y controlado [Du Toit, *et al.*, 2015]. Esta baja prevalencia en los países de Asia oriental y central probablemente se deba a la dieta o al medio ambiente, particularmente a la forma en que consumen el cacahuete (hervido vs. tostado) [Arakali, *et al.*, 2017].

Por tanto, parece que la exposición temprana no es la causa del aumento de la alergia al cacahuete. De hecho, está demostrado que la exposición oral, durante los primeros 5 años, puede ser protectora [Du Toit, *et al.*, 2008, 2013, 2015], aunque si la exposición en el útero también puede ser protectora sigue sin estar constatada [Sicherer, *et al.*, 2010; Bunyavanich, *et al.*, 2014].

## ALÉRGENOS DEL CACAHUETE

El cacahuete es la legumbre mejor caracterizada en cuanto a su contenido alérgico, con 16 alérgenos (Figura 18) y múltiples isoformas registradas por el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/IUIS). Inicialmente había un alérgeno más reconocido, Ara h 4, que posteriormente ha pasado a denominarse Ara h 3.02 y, por tanto, se considera una isoforma de Ara h 3 (Tabla 17).



**Figura 18.** Proteínas de cacahuete. Modificado de Lange, *et al.*, 2014.

Seis alérgenos pertenecen a la súper-familia de prolaminas, entre los cuales están Ara h 2, Ara h 6 y Ara h 7 (albúminas 2S) y Ara h 9, Ara h 16 y Ara h 17 (ns-LTPs). La importancia de la IgE específica frente a Ara h 2, como predictor de la reactividad clínica al cacahuete ha sido demostrada ampliamente [Dang, *et al.*, 2012; Klemans, *et al.*, 2013; Beyer, *et al.*, 2015].

**Tabla 17**

*Lista de alérgenos del cacahuete registrados en la WHO/IUIS.*

	<b>Súper-familia de proteínas</b>	<b>Familia de proteínas</b>	<b>Otros nombres</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
Ara h 1	Cupinas	7S globulina	Vicilina	64
Ara h 2	Prolaminas	2S albúmina	Conglutinina	17, 19
Ara h 3	Cupinas	11S globulina	Legumina	61
Ara h 4**				
Ara h 5	Profilinas	Profilina		14
Ara h 6	Prolaminas	2S albúmina	Conglutinina	15
Ara h 7	Prolaminas	2S albúmina	Conglutinina	16
Ara h 8	Homóloga Bet v 1	Familia Bet v 1		17
Ara h 9	Prolaminas	ns-LTP		9
Ara h 10		Oleosina		16
Ara h 11		Oleosina		14
Ara h 12		Defensina		5
Ara h 13		Defensina		5
Ara h 14		Oleosina		17,5
Ara h 15		Oleosina		17
Ara h 16	Prolaminas	ns-LTP		8,5
Ara h 17	Prolaminas	ns-LTP		11

Debido a la importancia de Ara h 2, medir la IgE específica de los pacientes frente al mismo, podría reducir el número de provocaciones orales para el diagnóstico de alergia al cacahuete en el futuro, reduciendo costes, tiempo y aumentando la seguridad.

Dos alérgenos pertenecen a la súper-familia de las cupinas, Ara h 1 (globulina 7S) y Ara h 3 (globulina 11S). Recientemente, se ha demostrado que Ara h 1 puede interactuar con los componentes lipídicos. Esa interacción podría contribuir a la potencia alérgica de Ara h 1 al conferirle resistencia frente a las enzimas digestivas e interactuar con las células dendríticas de manera que se favorezca la generación de respuestas Th2 [Angelina, *et al.*, 2016].



Ara h 5 es una profilina y Ara h 8 es una proteína homóloga del alérgeno mayor del abedul Bet v 1. Ambos alérgenos comparten la estructura denominada “bolsillo hidrófobo” que los permite asociarse con los lípidos y les otorga resistencia frente a la digestión y el calor [Bar-El Dadon, *et al.*, 2013].

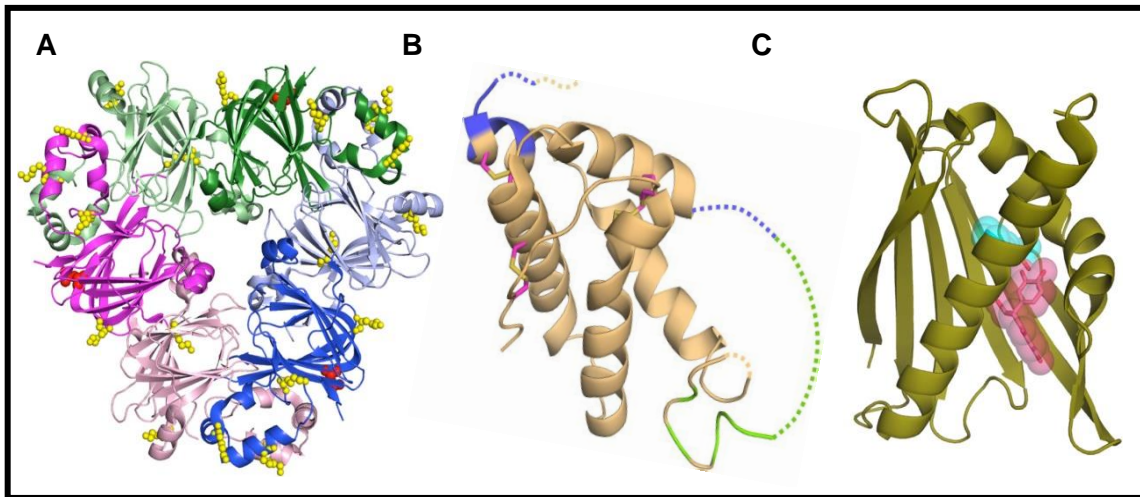
Ara h 12 y Ara h 13 son defensinas y reaccionan particularmente con la IgE de pacientes con alergia severa al cacahuete [Treadler, *et al.*, 2017]. Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 y Ara h 15 son oleosinas y recientemente han sido relacionadas con reacciones alérgicas severas [Schwager, *et al.*, 2015, 2017].

Los alérgenos mayores de un extracto son los reconocidos por más del 50% de la población alérgica a dicha fuente y en el caso del cacahuete son Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 8. Por esta razón, se ha obtenido una notable información estructural, biofísica y bioinformática sobre estos alérgenos.

**Ara h 1** (Figura 19.A) pertenece a la súper-familia de las cupinas, una 7S globulina o vicilina. Es una proteína de 65 kDa que forma un trímero simétrico. Cada monómero está compuesto por dos dominios de cupina (conocido como bicupina) con pequeñas cavidades flanqueadas por  $\alpha$ -hélices. Estas formas oligoméricas son estabilizadas covalentemente cuando los cacahuets son cocinados, lo que puede estar relacionado con su alergenicidad [Cabanos, *et al.*, 2011; Chruszcz, *et al.*, 2011].

**Ara h 2** (Figura 19.B) está compuesto por un paquete de cinco hélices con cuatro enlaces disulfuro interconectando las hélices. Falta parte de la estructura que conecta las hélices dos y tres. Ara h 2 ha sido frecuentemente citado como el alérgeno más potente del cacahuete, pero se ha demostrado que Ara h 6 tiene una actividad alérgica similar [Maleki, *et al.*, 2003; Mueller, *et al.*, 2011; Chen, *et al.*, 2013].

**Ara h 8** (Figura 19.C) es una proteína de 17 kDa perteneciente a la súper-familia de las proteínas homólogas de Bet v 1. Su estructura consiste en una hoja- $\beta$  antiparalela de siete cadenas flanqueada por tres  $\alpha$ -hélices que crean una cavidad con la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos entre los que se encuentran los flavonoides [Hurlburt, *et al.*, 2013; Petersen, *et al.*, 2014].



**Figura 19.** Estructura tridimensional de (A) Ara h 1, (B) Ara h 2 y (C) Ara h 8. Modificado de Mueller, *et al.*, 2014.

En el caso del cacahuete, ocurre lo mismo que lo descrito para los frutos secos. Las oleosinas (Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 y Ara h 15), son proteínas que no están presentes en los extractos comerciales disponibles para el diagnóstico de los pacientes, debido a sus propiedades físico-químicas que las hacen insolubles en soluciones acuosas. Aun así, son proteínas que han sido relacionadas con reacciones severas en estudios recientes [Schwager, *et al.*, 2015, 2017; Jappe y Schwager, 2017].

Los patrones de sensibilización frente a los alérgenos del cacahuete difieren clínica e inmunológicamente en diferentes áreas del mundo, probablemente debido a las diferencias en la exposición a las fuentes alérgicas y a las diferentes tradiciones culinarias.

Ara h 8 y Ara h 9 han demostrado ser alérgenos principales en Europa central-occidental y meridional, respectivamente [Ballmer-Weber, *et al.*, 2015], mientras que pacientes alérgicos de Nueva York, estaban sensibilizados a Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3 y presentaban síntomas más severos. Los pacientes alérgicos suecos, sin embargo, se sensibilizaron a estos alérgenos en una proporción menor que los pacientes norteamericanos, pero en una proporción mayor que los españoles, que mostraron una alta sensibilización a Ara h 9. Los pacientes españoles desarrollaron alergia al cacahuete después de volverse alérgicos a otros alimentos derivados de plantas como el melocotón [Vereda, *et al.*, 2011; Javaloyes, *et al.*, 2012]. La tasa de sensibilización más alta para Ara h 8, el homólogo de Bet v 1, se encontró en pacientes suecos, lo que refleja la alta exposición al polen de abedul en ese país.

Se ha demostrado que el patrón de sensibilización a los alérgenos del cacahuete no solo depende del área geográfica sino también de la edad. Varios estudios demuestran que la sensibilización a las principales proteínas de almacenamiento del cacahuete es mayor en los niños, en comparación con los adultos [Valcour, *et al.*, 2017; Leickly, *et al.*, 2018]. En concreto, un estudio español reciente mostró que la IgE específica frente Ara h 2, disminuía con el aumento de la edad, mientras que se encontró lo contrario para Ara h 9 [García-Blanca, *et al.*, 2015].

De acuerdo con esta observación, un estudio multicéntrico europeo evidenció que la sensibilización a Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 se adquiría con frecuencia en la infancia y raramente en la adolescencia y la edad adulta. Sin embargo, la sensibilización a Ara h 8 y Ara h 9 parece estar vinculada con la alergia al cacahuete de inicio tardío [Ballmer-Weber, *et al.*, 2015]. Estos resultados han sido confirmados en una población noruega de pacientes sensibilizados [Namork y Stensby, 2015].

## **ALERGENICIDAD DEL CACAHUETE**

Las legumbres y frutos secos son sometidas a diferentes tratamientos térmicos (cocción, tostado o fritura) dependiendo de los hábitos de consumo en las diferentes partes del mundo.

Los cacahuetes se consumen de forma hervida únicamente en algunos países como China, mientras que el tostado o la fritura son los tratamientos térmicos utilizados en EE. UU. o Europa. Esta diferencia en el procesamiento del cacahuete puede dar como resultado modificaciones químicas y funcionales en las proteínas con un impacto directo en sus propiedades alergénicas.

A pesar del hecho de que el consumo de cacahuete es similar en China y EE. UU., la prevalencia parece ser significativamente mayor en los últimos [Beyer, *et al.*, 2001]. En contraste, la prevalencia de la alergia al cacahuete en la población chino-estadounidense parece ser similar a la prevalencia de la población general de EE. UU. Por lo tanto, las diferencias en la genética de las poblaciones, no parecen ser un factor clave para las discrepancias observadas en la prevalencia de la alergia al cacahuete.

Con respecto al proceso de cocción de los cacahuetes, estudios realizados en 2001 mostraron que este método podría disminuir la alergenicidad del cacahuete debido a que algunos alérgenos, de bajo peso molecular como Ara h 2, Ara h 6 y Ara h 7, se transfieren al agua de cocción [Beyer, *et al.*, 2001; Mondoulet, *et al.*, 2005; Turner, *et al.*, 2014]. Diferentes estudios en modelos murinos han demostrado que Ara h 2 pierde alergenicidad debido a modificaciones estructurales que afectan a los epítomos de unión a IgE [Cai, *et al.*, 2016].

Otros alérgenos, como Ara h 1, parece que también se ven afectados por la cocción, ya que forma complejos agregados ramificados que tienen una capacidad de unión del cacahuete a la IgE mucho más reducida [Blanc, *et al.*, 2011].

Recientemente se ha descubierto que una ebullición prolongada, de al menos 12 horas, disminuye en casi un 20% la capacidad de unión a IgE del cacahuete. Sin embargo, se ha observado que mantiene su capacidad para estimular las células T, lo que convierte al cacahuete cocido en un candidato interesante para la inmunoterapia oral [Cabanillas, *et al.*, 2012; Tao, *et al.*, 2016].

Los estudios sobre el tueste (torrefacción) han demostrado que tiene la capacidad de aumentar hasta en un 90% las propiedades de unión a IgE de los alérgenos del cacahuete [Maleki, *et al.*, 2000; Beyer, *et al.*, 2001; Mondoulet, *et al.*, 2005].

De manera *in vitro*, con alérgenos purificados como Ara h 1 y Ara h 2, sometidos a la reacción de Maillard (reacción química durante la torrefacción, que causa modificaciones químicas de los grupos amino de la proteína mediante la reducción de azúcares), se demostró este aumento de la unión de la IgE [Maleki, *et al.*, 2000; Nesbit, *et al.*, 2012].

También se produce el aumento de la función del inhibidor de la tripsina de Ara h 2 que, a su vez, aumenta la protección contra las enzimas digestivas y por lo tanto aumenta las propiedades alergénicas del cacahuete tostado [Maleki, *et al.*, 2003]. Durante el tueste, también se puede producir la oxidación de lípidos que Ara h 8 puede unir. Dicha interacción parece ser un factor clave para una disminución de la digestibilidad gástrica y pancreática [Petersen, *et al.*, 2014].

Además, se ha encontrado que el tostado progresivo disminuye la solubilidad de la proteína. Las proteínas insolubles sobreviven a las fases iniciales de la digestión en el estómago proporcionando alérgenos a la mucosa gastrointestinal que, se volverán a solubilizar progresivamente mediante una combinación de pH ácido y actividad enzimática de amilasa y pepsina en un tramo posterior del tubo digestivo [Kopper, *et al.*, 2005].

En modelos murinos se comprobó la formación de complejos proteicos de alto peso molecular, que indujeron la unión IgE específica frente a Ara h 6 [Guillon, *et al.*, 2016]. Más recientemente, se demostró que la IgE se unía considerablemente menos a las oleosinas obtenidas de los cacahuets crudos que frente a las obtenidas de los cacahuets tostados [Schwager, *et al.*, 2017].

Los efectos de freír sobre el cacahuete se han analizado con menos profundidad. Los informes iniciales sugirieron que la fritura fue capaz de disminuir la capacidad de fijación de IgE frente a las proteínas del cacahuete [Beyer, *et al.*, 2001]. Sin embargo, otros estudios no han confirmado una disminución en la alergenicidad después de freír tanto *in vitro* como *in vivo* [Schmitt, *et al.*, 2010; Verhoeckx, *et al.*, 2015].

En conclusión, los diferentes efectos de hervir, tostar y freír sobre la alergenicidad del cacahuete pueden explicarse, en parte, por las diferencias en las condiciones de tratamiento. El tostado puede alcanzar temperaturas de 170°C, mientras que la fritura y la ebullición alcanzan temperaturas de 140°C y 100°C, respectivamente. Además, el tostado se produce en condiciones secas, mientras que la cocción y la fritura se producen en condiciones líquidas [Comstock, *et al.*, 2016].

Estudios recientes han demostrado que la hidratación de los cacahuets antes de autoclavarlos (134°C y 2 atmosferas de presión) aumenta la eficacia del tratamiento térmico en cuanto a la disminución de la inmunoreactividad, sin embargo, es necesaria más investigación para desarrollar nuevas técnicas de procesamiento que permitan obtener alimentos útiles para la inducción a la tolerancia o incluso hipoalergénicos [Bavaro, *et al.*, 2018].

## TRATAMIENTO. ESTUDIOS EN MARCHA

Actualmente no hay ninguna opción terapéutica de aplicación rutinaria en referencia al cacahuete. La evitación de la fuente alergénica es la única opción. Algunas de las posibles acciones referidas a este campo son la modulación de la respuesta inmune y la inducción a la tolerancia frente a los alérgenos del cacahuete.

Uno de los principales problemas a la hora de tratar las alergias alimentarias son las reacciones adversas mediadas por IgE [Jones, *et al.*, 2014], que podrían intentar evitarse mediante el uso alternativo de recombinantes de alérgenos hipoalergénicos [Tschepp y Breiteneder, 2017; Satitsuksanoa, *et al.*, 2018].

En el campo de la modulación de la respuesta inmune, se están llevando a cabo una serie de ensayos clínicos durante los últimos años (Tabla 18). El ensayo pionero en este campo de la alergia alimentaria al cacahuete fue el de Oppenheimer en 1992, mediante una pauta rápida con un extracto acuoso desengrasado de cacahuete [Oppenheimer, *et al.*, 1992], sin embargo, una alta tasa de reacciones adversas graves limitó su aplicación clínica [Anagnostou y Clark, 2014].

## Estudio LEAP

Este ensayo requiere una mención especial ya que, dentro de los ensayos realizados en los últimos años, es el único que no está basado en inmunoterapia.

El estudio *Learning Early About Peanut Allergy* (LEAP) es un estudio controlado aleatorizado para bebés, que tiene como objetivo determinar cuál es la mejor estrategia para la prevención de la alergia al cacahuete: introducción del cacahuete en la dieta de los bebés o evitación completa [Du Toit, *et al.*, 2013, 2018; Feeney, *et al.*, 2016].

Este estudio buscó bebés con alto riesgo de desarrollar alergia al cacahuete. Una revisión de la literatura sugirió que la gravedad del eccema, el inicio temprano del eccema y el uso frecuente de corticosteroides tópicos, podrían ser factores de alto riesgo. También hay datos que demuestran una asociación entre la alergia al huevo y la alergia al cacahuete.

Se reclutaron seiscientos cuarenta niños atópicos con eccema o alergia al huevo, no menores de 4 meses y no mayores de 11 meses, fueron asignados de manera aleatoria al grupo de evitación o al grupo de consumo de cacahuete. En el grupo de consumo, solo el 1,9% de los niños desarrollaron alergia al cacahuete con 60 meses, mientras que el 13,7% desarrolló alergia al cacahuete en el grupo de evitación.

En resumen, aunque los resultados del estudio LEAP, con respecto a la eficacia de la introducción temprana del cacahuete fueron consistentes, hay una serie de limitaciones que deberían considerarse y tener en cuenta en estudios futuros, como por ejemplo, que más del 70% de los niños eran blancos, por lo que estos resultados pueden no reflejar con precisión el riesgo en los niños de diferente etnia y origen racial [Rabinovitch, *et al.*, 2015].

Tabla 18

*Ensayos clínicos con cacahuete. Modificada de Palladino, et al., 2018.*

ENFOQUE	SUJETOS Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN	AGENTE INMUNIZANTE	ESTUDIO CLÍNICO	EFECTOS	REFERENCIA
Inmunoterapia de la mucosa	10 sujetos alérgicos 18-50 años No historia anafilaxia	Ara h 1, 2 y 3 modificados y encapsulados en <i>E. coli</i> inactivada	Fase I	↓ SPT ↓ Activación basófilos ↓ Reacciones sistémicas	Wood et al. (2013)
Inmunoterapia sublingual (SLIT)	40 sujetos alérgicos 12-37 años No historia anafilaxia	Extracto cacahuete líquido	Fase I  Fase II seguridad, eficacia y efectos inmunológicos	↓ SPT ↑ Tolerancia oral ↑ IgG4 ↓ Efectos secundarios	Fleischer et al. (2013)
Exposición oral (LEAP)	640 bebés atópicos 4-11 meses Eccema severo y/o alergia huevo	Comida procesada, mantequilla de cacahuete	Fase II	13,7% prevalencia de alergia a cacahuete a los 60 meses en el grupo de evitación y 1,9% en el grupo de consumo	Du Toit et al. (2015)
Inmunoterapia oral temprana (E-OIT)	37 niños 9 a 36 meses Reacción en provocación	Harina de cacahuete	Fase I	78% de los sujetos demostró una no-respuesta sostenida	Vickery et al. (2017)
Inmunoterapia epicutánea (EPIT)	74 sujetos alérgicos 4-25 años 25 Viaskin 100 µg, 24 Viaskin 250 µg y 25 placebo	Parche Viaskin cacahuete	Fase II	↑ IgG4 cacahuete ↑ IgG4/IgE ratio ↓ Activación basófilos ↓ Citoquinas Th2 cacahuete	Jones et al. (2017)
Inmunoterapia epicutánea (EPIT)	221 sujetos alérgicos 6-55 años	Parche epicutáneo	Fase IIb	Aumento de 10 veces de la cantidad de proteínas en la provocación	Sampson et al. (2017)
Inmunoterapia oral (OIT)	55 sujetos sensibilizados 4-26 años Síntomas con menos de 143 mg de proteína de cacahuete	Harina desengrasada de cacahuete tostado y encapsulada	Fase II seguridad y eficacia	↓ Severidad DBPCFC ↑ Cantidad de cacahuete tolerada	Bird et al. (2018)

# HIPÓTESIS







Teniendo en cuenta los antecedentes acerca del estudio de los extractos alérgicos de *Arachis hypogaea*, se puede comprobar que los alérgenos de la fracción hidrosoluble se encuentran bien caracterizados.

El avance y desarrollo de nuevas técnicas de investigación ha permitido que, tras el empleo de éstas, se puedan obtener de manera satisfactoria las proteínas contenidas dentro de los cuerpos lipídicos de frutos secos y semillas.

Si estas proteínas, contenidas en los cuerpos lipídicos de los cacahuetes, son reconocidas por las IgE del paciente alérgico a los mismos, se podría aseverar que éstas tienen propiedades alérgicas y que, por tanto, son igual de relevantes que las proteínas actualmente descritas.

En conclusión, una mejora del perfil alérgico del extracto de cacahuete, que incorpore al mismo todas sus proteínas de origen glico y lipoproteico, conducirá a poder establecer mejoras cuantitativas y cualitativas del diagnóstico etiológico, así como posibles redefiniciones del empleo de sus componentes en inmunoterapia.



# OBJETIVOS





## OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Demostrar la alergenicidad de la fracción liposoluble de los cacahuetes.
2. Extraer las proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos de la fuente sensibilizante (*Arachis hypogaea*), mediante el uso de un protocolo adaptado a las características de estas proteínas.
3. Estudiar la alergenicidad de las proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos en una población infantil sensibilizada y alérgica al cacahuete.

## OBJETIVOS SECUNDARIOS

4. Caracterizar físico-químicamente las proteínas aisladas teniendo cuenta el contenido total proteico, el perfil antigénico y alergénico mediante el uso de sueros de pacientes sensibilizados a la fuente causante de la sintomatología.
5. Formular las proteínas obtenidas para su aplicación diagnóstica *in vivo*, mediante el uso de prueba cutánea (*prick test*). Acoplamiento de éstas a soportes de diagnóstico *in vitro* para determinar los niveles de IgE específicas y su uso como agente estimulador de la liberación de histamina en los basófilos de los pacientes sensibilizados.
6. Estudiar el perfil alergénico de las proteínas contenidas (fracción liposoluble) y no contenidas (fracción hidrosoluble) en los cuerpos lipídicos, en una población infantil alérgica al cacahuete.
7. Establecer la relación entre la sensibilización a las proteínas liposolubles del cacahuete y la gravedad de las reacciones alérgicas presentadas.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**







## **OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA FUENTE ALERGÉNICA**

### **EXTRACCIÓN COMPLETA DE PROTEÍNAS**

A los cacahuetes se les retiró la cáscara y la piel que recubría los frutos. Éstos se suspendieron en un tampón fosfato salino (PBS [NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM, pH 7,2-7,4]) en una proporción 1:4 (p/v). Se trituraron con un homogeneizador eléctrico hasta la obtención de una suspensión homogénea, la cual se sometió a extracción hidrosoluble en dicho PBS mediante agitación magnética a una temperatura de 2-8°C durante 2 horas.

El pH se mantuvo durante todo el proceso entre 6 y 7,5 ajustándose cuando fue necesario con NaOH 1N o HCl 1N. Tras las 2 horas, el homogenizado se centrifugó 30 minutos a 8.400 g en la centrífuga ROTANTA 460 RS (Hettich Lab, Tuttlingen, Alemania). Se descartó el sedimento y a continuación se siguieron diferentes protocolos:

- Protocolo 1: se separó cuidadosamente la parte superior de grasa y se eliminó, manteniéndose únicamente la parte líquida (sobrenadante).
- Protocolo 2: la parte superior de grasa y la parte líquida (sobrenadante) se juntaron y homogenizaron.

Ambos extractos se filtraron aplicando vacío, mediante un embudo Buchner y un matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore AP (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) con un tamaño de poro de 2  $\mu\text{m}$ .

Por último, se sometieron a diálisis y estabilización mediante liofilización para el posterior análisis de sus parámetros analíticos, tal y como está descrito en este mismo capítulo más adelante (ver páginas 87-88).

## SELECCIÓN DE LA FUENTE SENSIBILIZANTE

Con el fin de obtener un extracto que presentara el perfil alergénico más adecuado, se adquirieron diferentes materias primas de cacahuete.

Las fuentes alergénicas estudiadas procedían de distintos puntos geográficos y presentaban distintos procesamientos: crudo y tostado (Tabla 19 y Figura 20), siempre lo menos manipuladas posible, es decir sin aromatizantes, saborizantes, etc.

**Tabla 19**

*Características de las materias primas a estudiar.*

Materia prima	Procedencia
Cacahuete tostado	(1) China.
	(2) EE. UU.
Cacahuete crudo	(3) EE. UU.
	(4) Brasil.



**Figura 20.** Fotografía de las materias primas escogidas.

## EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN AMBAS FRACCIONES: HIDROSOLUBLE Y LIPOSOLUBLE

Los cacahuetes con la cáscara y la piel retirada se suspendieron en PBS en una proporción 1:4 (p/v). Se trituraron con un homogeneizador eléctrico hasta la obtención de una suspensión homogénea, tras la cual se llevó a cabo la extracción hidrosoluble en dicho PBS, mediante agitación magnética a una temperatura de 2-8°C durante 2 horas. El pH se mantuvo durante todo el proceso entre 6 y 7,5, ajustándolo cuando fue necesario con NaOH 1N o HCl 1N.

Tras las 2 horas, el homogenizado se centrifugó 30 minutos a 8.400 g en la centrifuga ROTANTA 460 RS (Hettich Lab, Tuttlingen, Alemania). Se descartó el sedimento y se separó cuidadosamente la parte superior de grasa, por un lado, y la parte líquida (sobrenadante) por otro.

- El sobrenadante (fracción hidrosoluble) fue sometido a filtrado mediante vacío, por medio de un embudo Buchner y un matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore AP (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) con un tamaño de poro de 2  $\mu\text{m}$ .
- La parte grasa se resuspendió y homogenizó nuevamente en PBS. Se centrifugó a 8.400 g durante 10 minutos. Se recogió la parte superior de grasa y se repitió este paso tres veces más para retirar posibles impurezas de la grasa. Tras la última centrifugación, se resuspendió y homogenizó toda la grasa obtenida en PBS-Tween 0,5% (Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS), en una proporción 1:1,5 (p/v). Se filtró del mismo modo que la fracción hidrosoluble.

## DIÁLISIS

El filtrado obtenido, procedente de ambas fracciones (hidrosoluble y liposoluble), se sometió a diálisis para retirar las sales del PBS utilizado durante la extracción. Al sistema de diálisis, mediante ultrafiltración tangencial en sistema Cogent M1 de Millipore (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), se le acopló un casete de límite de exclusión molecular de 5.000 Da. La diálisis se realizó por adición, de al menos 5 volúmenes de agua para inyección (WFI) respecto al volumen concentrado, hasta que la conductividad fue inferior a 1.000  $\mu\text{S}$ .

A la fracción liposoluble dializada se le añadió manitol (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), a razón de 40 mg/mL, y se agitó suavemente hasta su completa disolución. Finalmente, ambos extractos (hidrosoluble y liposoluble) fueron alicuotados y taponados a razón de 30 mL/vial bajo flujo laminar para proceder a su liofilización.

## ESTABILIZACIÓN

La estabilización se realizó, mediante un proceso de liofilización, en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Azbil Telstar, Madrid, España) según un protocolo específicamente diseñado, cuyas características están expresadas en la Tabla 20.

**Tabla 20**

*Protocolo de liofilización.*

Descripción	Temperatura (°C)	Vacío (mBar)	H:MIN
Preparación bandejas	-30		
Congelación	-40		0:30
Congelación	-40		3:00
Preparación condensador	-50		0:10
Vacío cámara		0,200	
Secado primario	-5	0,200	5:00
Secado primario	10	0,200	8:00
Secado primario	30	0,300	8:15
Secado primario	30	0,300	7:0
Test final secado primario	30	0,300	0:5
Secado secundario	30		4:00
Secado secundario	30		5:0
Test final secado secundario	30		0:5

Finalizado el ciclo de liofilización, se pesó el contenido de un vial para calcular el rendimiento del proceso, finalmente expresado en gramos de sustancia activa liofilizada por 100 gramos de materia prima.

## DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

### EXTRACTO ALERGÉNICO

#### Humedad relativa

La determinación del contenido de humedad de las muestras realizadas, se realizó mediante un método termocoulométrico con el equipo Easy H<sub>2</sub>O (Berghof, Eningen, Alemania).

El sistema de detección de agua Easy H<sub>2</sub>O combina la evaporación térmica de agua con un sensor electroquímico selectivo para el agua. El agua se evapora de la muestra de ensayo en un horno programable y pasa por el sensor gracias a una corriente de gas portador. Este gas portador es aire ambiental aspirado y secado por el horno. Además, esta técnica, basada en la evaporación del agua, es capaz de discriminar la humedad superficial y capilar de la muestra, de la humedad inherente a la propia muestra.

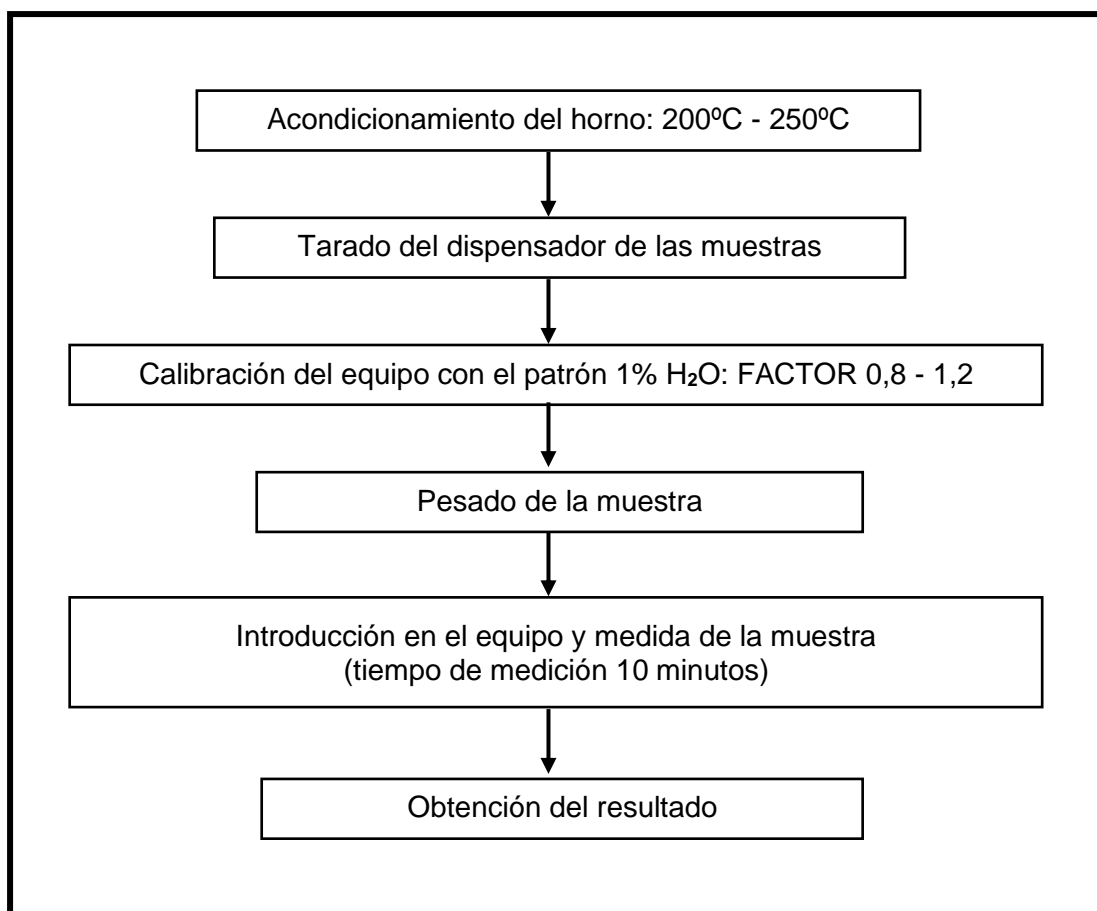
El sistema posee un sensor higroscópico de pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). La superficie de este sensor se une al agua transportada por la corriente de aire. El agua se descompone electrolíticamente en hidrógeno y oxígeno. La carga requerida para esto es proporcional a la cantidad de agua y se determina por la Ley de Faraday (Figura 21).

$$m = \frac{Q}{q n} \cdot \frac{M}{N_A} = \frac{1}{q N_A} \cdot \frac{QM}{n} = \frac{1}{F} \cdot \frac{QM}{n} = \frac{1}{96485} \cdot \frac{QM}{n} = \frac{I \cdot t}{96485} \cdot \frac{M}{n}$$

**m** es la masa de la sustancia producida en el electrodo (en gramos),  
**Q** es la carga eléctrica total que pasó por la solución (en coulombios),  
**q** es la carga del electrón = 1,602 x 10<sup>-19</sup> culombios por electrón,  
**n** es el número de valencia de la sustancia como ion en la solución (electrones por ion),  
**F = qN<sub>A</sub> = 96485 C.mol<sup>-1</sup>** es la Constante de Faraday,  
**M** es la masa molar de la sustancia (en gramos por mol),  
**N<sub>A</sub>** es el número de Avogadro = 6,022 x 10<sup>23</sup> iones por mol,  
**I** es la corriente eléctrica (en amperios),  
**t** es el tiempo transcurrido (en segundos).

**Figura 21.** Ley de Faraday.

El sensor se auto-regenera mediante la renovación de la capa de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> que se produce durante la medición. De esta forma, el sensor estará siempre operativo para la medición de la siguiente muestra (Figura 22).



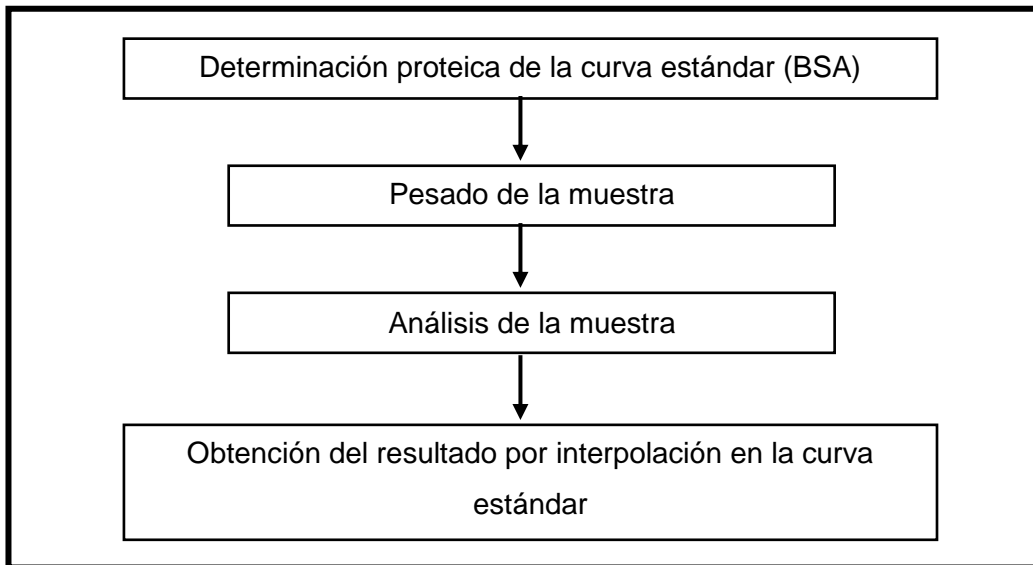
**Figura 22.** Resumen del análisis de la humedad – Easy H<sub>2</sub>O.

## Contenido proteico

El contenido proteico fue valorado mediante la técnica de Bradford [Bradford, 1976]. Su fundamento, es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el azul de Coomassie de 465 a 595 nm, cuando se une a las proteínas.

Para ello se empleó el kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, California, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se emplea como recta patrón albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) a diferentes concentraciones (0; 4; 6; 8; 10; 12; 14 y 16 µg/mL) cuyas lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro para microplacas PowerWave HT (BioTek, Vermont, EE. UU.).

A continuación, las absorbancias de la muestra problema resuspendida en agua se interpolaron en la recta patrón de BSA. De manera general, el flujo del método analítico empleado para determinar el contenido proteico fue el descrito en la Figura 23.



**Figura 23.** Resumen del análisis del contenido proteico – Bradford.

## Solubilidad

La solubilidad de las fuentes alergénicas, establece la máxima cantidad de sustancia activa que se disuelve en una determinada cantidad de agua [Henry, 1803]. De manera general el protocolo fue el siguiente:

- Pesar 50 mg del extracto alergénico liofilizado y añadir 50  $\mu\text{L}$  de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático VWB2 12 (VWR, Pensilvania, EE. UU.). Si la solución es completa, la sustancia es *muy soluble*.
- Si la solución es incompleta, añadir 0,95 mL de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático. Si la solución es completa, la sustancia es *fácilmente soluble*.
- Si la solución es incompleta, añadir 2 mL de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático. Si la solución es completa, la sustancia es *soluble*.
- Si la solución es incompleta, añadir 7 mL de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático. Si la solución es completa, la sustancia es *bastante soluble*.



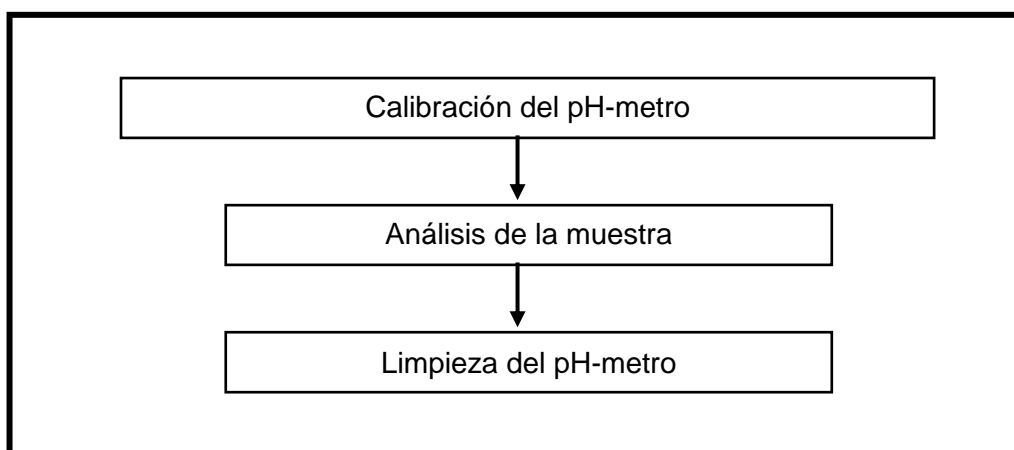
- Si la solución es incompleta, pesar 10 mg de producto y añadir 10 mL de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático. Si la solución es completa, la sustancia es *poco soluble*.
- Si la solución es incompleta, pesar 1 mg de producto y añadir 10 mL de agua. Agitar durante 1 minuto y mantener durante 15 minutos a 25°C en baño termostático. Si la solución es completa, la sustancia es *muy poco soluble*.

## pH

Para analizar el grado de acidez o de alcalinidad de las muestras [Sørensen, 1909] se utilizó el pH-metro Crison GPL 21 (Barcelona, España). Previamente a la realización del ensayo se calibró el medidor con las soluciones de calibración correspondientes.

A continuación, se reconstituyó la muestra (5 mg) con 10 mL de H<sub>2</sub>O agitando suavemente para favorecer la disolución, después se sumergieron los electrodos en la disolución y se realizó la lectura del pH de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Es necesario limpiar el electrodo con H<sub>2</sub>O antes y después de realizar las mediciones de pH. De manera general, el flujo del método analítico empleado para determinar el pH fue el siguiente (Figura 24):



**Figura 24.** Resumen del análisis de pH.

## **Determinación del perfil electroforético. SDS-PAGE**

### **Fundamento teórico**

Cualquier molécula cargada se desplaza al ser expuesta en un campo eléctrico. Dado que las proteínas son moléculas con carga neta a cualquier pH distinto del punto isoeléctrico, estas migran en un campo eléctrico dependiendo de su densidad de carga (relación entre carga y masa). De este modo, se utiliza esta característica de las proteínas para llevar a cabo su separación.

Actualmente, los soportes más utilizados son los que participan activamente en el proceso de separación al interaccionar físicamente con las partículas de migración (almidón, agarosa, poliacrilamida), cuyo tamaño de poro es del orden del tamaño de las moléculas a separar, y que proporcionan, por tanto, la posibilidad de separar proteínas según su carga y tamaño. Entre ellos, el soporte de acrilamida es el que mayores ventajas ofrece: elevada pureza de sus reactivos constituyentes, químicamente inerte, estable en amplios rangos de pH, temperatura y fuerza iónica, transparente y, además, permite la formación de gradientes precisos.

Los geles de poliacrilamida reaccionan con los grupos funcionales libres de las cadenas terminales. El compuesto TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina) cataliza la formación de los radicales libres del persulfato, necesario para que se inicie el proceso de polimerización.

La mayoría de los estudios que emplean electroforesis zonal de proteínas lo hacen mediante el empleo de condiciones desnaturizantes, de modo que las proteínas son disociadas y analizadas en sus unidades polipeptídicas individuales. Estos métodos, conocidos como SDS-PAGE son ampliamente utilizados y se encuentran muy estandarizados.

### **Tampones y soluciones**

Básicamente, se empleó el método originalmente propuesto por Laemmli [Laemmli, 1970] con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal utilizados para Mini-Protean II (Bio-Rad, Hércules, California).

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 (separador)

Tris base	27,23 g (18,15 / 100 mL)
Agua destilada	150 mL
Ajuste a pH 8,8 con HCl 1N	
Almacenamiento a 4°C	

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 (apilador)

Tris base	6 g
Agua destilada	100 mL
Ajuste a pH 6,8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4°C	

SDS (docecilsulfatosódico) al 10%

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

Tampón de muestra ("Sample buffer")

Agua destilada <sup>o</sup>	4 mL
0,5 Tris-HCl; pH: 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10%	1,6 mL
2-β-mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol 0,5%	0,2 mL

Se almacena a 4°C y se calienta a 37°C si se produce precipitación.

Tampón de electroforesis pH: 8,3 (5X)

Tris base	9 g (15 g/L)
Glicina	43,2 g (72 g/L)
SDS 10%	3 g (5 g/L)
Agua destilada	600 mL

Se diluyen 60 mL de tampón stock 5X con 240 mL de agua destilada.

Solución de azul Coomassie (Tinción)\*

Azul de Coomassie R-250	1 g
Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de tinción: 60 minutos a 50°C o 12 horas a TA.

Solución decolorante

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de decoloración: entre 1 y 3 horas.

**Montaje de las placas**

De acuerdo con las instrucciones del fabricante del equipo *Mini-Protean II dual slab cell* (Bio-Rad, Hércules, California).

**Preparación de los geles - Sistema discontinuo**

Gel separador “*running gel*” (porcentaje de acrilamida 15%) → cantidad para 2 geles de 0,75 mm.

Acrilamida (40%) 29:1	2,8 mL
Tris HCl 1,5M pH: 8,8	1,7 mL
Agua destilada	2 mL
SDS 10%	66 µL
Persulfato amónico	70 µL (30 mg/mL) → 3%
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	14 µL
Cantidad por placa	3,2 mL
Tiempo de polimerización	10 min
INTERFASE	200 µL de butanol

El porcentaje de acrilamida se establece en función del peso molecular de la muestra que se quiere estudiar. Se utiliza un porcentaje de acrilamida del 15% cuando la muestra tiene un peso molecular relativo que oscila entre los 15 y los 95 kDa. En el caso de que la muestra tenga un peso molecular más elevado se reduce el porcentaje de acrilamida, superando siempre el porcentaje establecido para el gel concentrador. Si el peso molecular es inferior al anteriormente señalado se aumenta dicho porcentaje.

El grosor del gel se ajusta en proporción a la cantidad de proteína que se ponga, utilizando para este fin cristales diseñados para este uso.

Gel apilador o concentrador “*stacking gel*” (porcentaje de acrilamida 4%) → cantidad para 2 geles de 0,75 mm.

Acrilamida (40%) 29:1	0,7 mL
Tris HCl 0,5M pH: 6,8	1,7 mL
Agua destilada	4,2 mL
SDS 10%	66 µL
Persulfato amónico	70 µL (30 mg/mL) → 3%
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	14 µL

### **Preparación de las muestras**

Las muestras se prepararon en el tampón de muestra, a una concentración de 0,5 - 2 mg/mL de proteína calculada según el método Bradford [Bradford, 1976]. Se llevaron a una temperatura de 100°C durante 5 minutos. Tras su enfriamiento, los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 16.100 g, en una centrifuga Micro 5415R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 5 minutos, descartándose el precipitado.

### **Condiciones electroforéticas**

Tras rellenar la cubeta interior con el tampón de electroforesis y añadir el resto a la cubeta, se dispensó el patrón y las muestras en las diferentes calles en un volumen de 10 µL. La electroforesis se desarrolló con un voltaje constante de 200 V durante 30-45 minutos, en función del frente de migración. En ese momento se desconectó la fuente y se extrajo el gel de entre las dos placas.

## Tinción

El gel se colocó en una placa de Petri y se añadió la solución colorante de Coomassie (Bio-Rad, Hércules, California), siguiendo dos protocolos:

- Rápido: 1 hora a 60°C.
- Lento: 24 horas a temperatura ambiente.

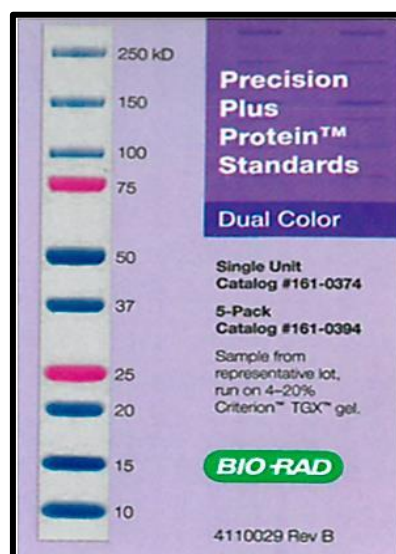
El exceso de colorante se retiró mediante la adición de la solución decolorante hasta que el fondo del gel quedó casi transparente (1-3 horas) y se pudieron visualizar adecuadamente las bandas del patrón y de las muestras.

## Determinación de pesos moleculares

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Weber y Osborn [Weber y Osborn, 1969], construyendo una recta de calibrado que representa la movilidad (en mm) de una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular conocido. La movilidad se midió desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda.

Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ( $r > 0,90$ ), el peso molecular de las proteínas de la muestra problema se determinó a partir de sus movilidades.

Las proteínas empleadas como patrón en los geles de acrilamida fueron adquiridas a Bio-Rad (Hércules, California), presentando el siguiente patrón (Figura 25).



**Figura 25.** Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

## **Determinación del perfil electroforético. 2D-PAGE**

### **Fundamento teórico**

La electroforesis bidimensional se basa en separar las proteínas de una mezcla según sus dos propiedades moleculares, una en cada dimensión. El procedimiento más usado se basa en la separación, en una primera dimensión, mediante isoelectroenfoque y en una segunda dimensión según peso molecular, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó según el método originalmente propuesto por Klose y O'Farrell [Klose, 1975; O'Farrell, 1975] con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos utilizados, Protean IEF cell para la primera dimensión y Mini-Protean II para la segunda dimensión (Bio-Rad, Hércules, California).

### **Preparación de la muestra y primera dimensión**

Las muestras se resuspendieron en agua ultra pura, en un volumen de 150  $\mu$ L. La masa en proteína depende del tipo de muestra, siendo 150-300  $\mu$ g de proteína total en los extractos complejos que se van a teñir con azul de Coomassie y un total de 3-6  $\mu$ g de proteína purificada. Las muestras se agitaron durante 10 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 16.100 g.

Las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% y acetona añadiendo el mismo volumen de TCA que de muestra. La mezcla se incubó 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a continuación a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  y 16.100 g.

Posteriormente, se quitó cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta evitando coger precipitado. Se añadieron 300  $\mu$ L de acetona fría y se volvió a centrifugar a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos a 16.100 g. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado.

Una vez precipitadas las muestras, éstas se solubilizaron en 150  $\mu$ L de tampón de rehidratación.

<u>Tampón de rehidratación</u>	
Urea 8M	4,8 g
DTT 50 mM (ditiotreititol)	0,076 g
2% CHAPS (p/v) (Bio-Rad)	0,2 g
0,2% (p/v) Byolite 3/10 (Bio-Rad)	100 µL
0,5% azul de bromofenol	20 µL
Agua destilada	5,6 mL

Se añadieron 125 µL de muestra para las tiras de pH de gradiente inmovilizado (IPG) de 7 cm [(tiras de 3-10 (Bio-Rad, Hércules, California)], en la bandeja de la 1ª dimensión, y se dejó incubando 20 minutos. Se añadieron 1,5-2 mL de aceite mineral (Bio-Rad, Hércules, California) sobre la tira para que no se produjera la deshidratación de la misma, ya que la separación duró 18 horas aproximadamente.

El protocolo utilizado para la primera dimensión se introdujo manualmente en el aparato (Tabla 21). Cuando terminó la primera dimensión se aplicaron 50 mV de manera constante para que las proteínas no se desenfocaran.

**Tabla 21**

*Protocolo Primera Dimensión 2D-PAGE.*

---

<b>Protocolo primera dimensión</b>
Voltaje slope: Rapid AV
Rehydration: Yes / Gel length: 07 / Focus temp: 20°C
Rehydration: active@50V
Enter time: 15:00
Insert pause after rehydration? NO
S1 250V 00:15
S2 HRS:MIN / 4000V 2:00
S3 V HOURS / 4000 V / 10000
S4 500V/ HOLD yes
Limit /gel: 50 µA
Enter nº of gels

---



**Separación de la segunda dimensión**

Los geles de acrilamida al 15% se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el apartado de SDS-PAGE (ver página 93) utilizando cristales de 1 mm. Estos geles solamente tenían la parte separadora o “*running gel*”. El peine que se utilizó en el gel es de tipo continuo para acoplar la tira IPG.

Una vez terminada la separación de la primera dimensión, se añadió 1 mL de tampón de equilibrado I en la bandeja de lavado a la tira de IPG. Se incubó durante 10-15 minutos en agitación rotacional suave.

A continuación, se añadió tampón de equilibrado II a la bandeja de lavado, y se incubó durante 10-15 minutos en agitación rotacional suave. Tras equilibrar con el segundo tampón, se introdujo la tira de IPG en tampón de electroforesis para que se equilibrara y pudiera conducir la corriente. Se introdujo la tira IPG con unas pinzas hasta que entró en contacto con la acrilamida del gel de la 2ª dimensión.

**TAMPÓN DE EQUILIBRADO I**

Urea 6M	18 g
2% SDS	1 g
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	12,5 mL
20% glicerol	10 mL
DTT 50 mM (ditiotreitól)	1 g
Agua destilada	27 mL

**TAMPÓN DE EQUILIBRADO II**

Urea 6M	18,01 g
2% SDS	1 g
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	12,5 mL
20% glicerol	10 mL
Iodocetamida	1,25 g
Agua destilada	27 mL

Posteriormente, se añadió agarosa para sellar la unión de los dos geles de acrilamida (de la 1ª y 2ª dimensión). Es necesario que la agarosa gelifique antes de empezar la electroforesis bajo las siguientes condiciones:

#### Electroforesis Segunda Dimensión

##### **Paso 1**

Voltaje: 120 V

Tiempo: 20 minutos

##### **Paso 2**

Voltaje: 150 V

Tiempo: 20 minutos

##### **Paso 3**

Voltaje: 200 V

Tiempo: Hasta que el frente del gel se encuentre al final

Para visualizar las proteínas migradas del gel se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, SDS-PAGE (ver página 97).

## **Transferencia de proteínas a un soporte sólido. Western blot**

### **Fundamento teórico**

El proceso se define como la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a un filtro (matriz o membrana de inmovilización), que puede ser sometido a los tratamientos necesarios para la identificación de las bandas. Esto lleva consigo las siguientes ventajas [Gershoni y Palade, 1983]:

- Los filtros son más manejables y flexibles.
- Las proteínas inmovilizadas son fácilmente, y por igual, accesibles a varios ligandos, ya que se obvian las limitaciones introducidas por la porosidad de los geles de gradiente.
- Generalmente se requieren menores cantidades de reactivos.
- Los tiempos de las incubaciones y lavados se reducen significativamente.
- Se pueden hacer múltiples réplicas del mismo gel.
- Las transferencias se pueden guardar durante mucho tiempo.

- La misma transferencia se puede utilizar para múltiples análisis sucesivos.
- Por último, la transferencia es susceptible de análisis posteriores que, de otra forma, serían muy difíciles o imposibles de efectuar en los geles.

Las membranas tienen un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Cuanto más pequeño es el poro, más retención de proteína se produce, que es conveniente cuando se trabaja con moléculas de bajo peso molecular, pero que dificulta o limita la interacción de los anticuerpos.

La unión proteica a la membrana no es covalente, por lo tanto, es probable que con los sucesivos pasos del protocolo (bloqueo, lavados) se pierda una proporción significativa de la proteína retenida a la membrana.

Algunos materiales parecen presentar ventajas sobre otros por lo que, si esto presenta un problema en los experimentos, se puede probar con membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) como, por ejemplo, *Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs* (Bio-Rad, Hercules, California) que presentan una mayor capacidad de adsorción y fijación de proteínas que las convencionales de nitrocelulosa y/o nylon.

### **Descripción de la inmunotransferencia**

Se basa en la electroelución de las proteínas del gel debido a que las proteínas (en contraste con el ADN) se adsorben a la membrana, incluso en tampones de baja fuerza iónica. Por lo tanto, se pueden electroeluir las proteínas fuera del gel hacia los filtros en condiciones que no necesitan corrientes eléctricas impracticablemente altas.

Hay que hacer constar que la electroelución de macromoléculas para la inmunotransferencia fue usada por primera vez por Arnheim y Southern en 1977 [Arnheim y Southern, 1977].

El tampón de transferencia más tradicional es el descrito por Towbin y colaboradores [Towbin, *et al.*, 1979]: Tris 24,8 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. El metanol inhibe el inflado del gel y mejora la resolución de la inmunotransferencia, pero estos porcentajes pueden producir que se elimine el SDS de las proteínas llegando a precipitar en el gel. Esto no es problema en el caso de las proteínas pequeñas, pero en el caso de que se quieran transferir proteínas con un punto isoeléctrico alcalino, o un peso molecular de más de 100 kDa, se recomienda reducir el contenido en metanol (a menos de 10%). También se puede añadir SDS a la solución de transferencia.

Las proteínas pequeñas (<20 kDa) normalmente se transfieren correctamente con independencia de los porcentajes de metanol. Sin embargo, se deben tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Limitar el tiempo en el tampón de transferencia (menos de 10 minutos) porque pueden migrar rápidamente sin fuerza iónica.
- Evitar la pérdida a través de la membrana (*Blow-through*): tampón de transferencia con 20% de metanol que aumenta el tabicamiento (*partitioning*) de la proteína a la membrana.
- Reducir la intensidad de corriente a la mitad para que haya más tiempo para interactuar con la membrana.

En resumen, cuando la proteína a transferir es grande se debería migrar la muestra en geles de acrilamida de bajo porcentaje, reducir la cantidad de metanol, aumentar la intensidad de corriente y transferir durante más tiempo. Cuando la proteína es pequeña, metanol al 20%, menos carga y menos tiempo de transferencia.

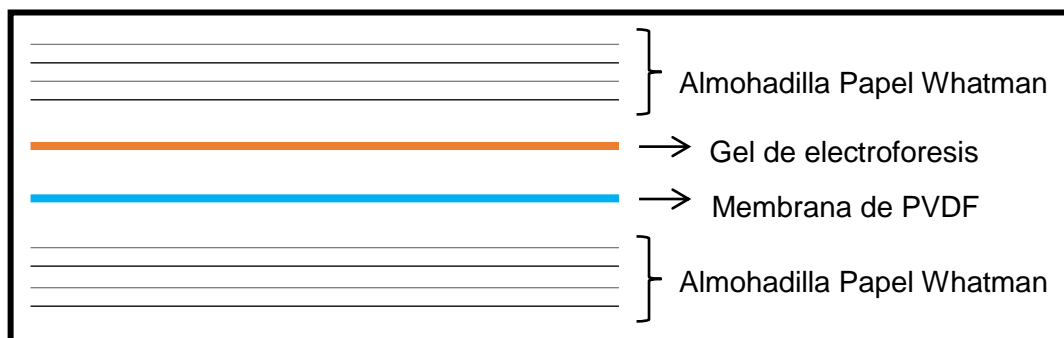
Para proteínas grandes y básicas se puede utilizar un tampón de transferencia compuesto de CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico) 10 mM y metanol 5%-10% pH 10,5-11.

El protocolo empleado en este trabajo fue el método descrito por Towbin [Towbin, *et al.*, 1979], en un equipo de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hércules, California) y con unas membranas Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, Hércules, California) constituidas por un preparado de membrana de transferencia, filtro de papel y tampón listos para su uso en el transferidor.

### **Método de transferencia semi-seco**

- a) Tras concluir la electroforesis, el gel se usa directamente, sin equilibrar.
- b) Abrir el pack Trans-Blot Turbo y colocar la almohadilla de papel Whatman con la membrana sobre la placa del casete del transferidor.
- c) Situar el gel o los geles de manera que se aproveche al máximo la superficie de la membrana (*Midi format*, para dos geles y *Mini format*, para un único gel).
- d) Colocar la otra almohadilla de papel Whatman, que viene dentro del pack, encima del gel.

- e) Una vez montado, asegurarse de que no queden burbujas, pasando rodillo por encima del “sándwich” (Figura 26).
- f) Establecer un valor constante de amperaje, que dependerá del tamaño de la membrana (1,3 A para Mini format y 2,5 A para Midi Format). El tiempo necesario para llevar a cabo la transferencia es de 7 minutos.
- g) Una vez finalizado el proceso de transferencia, se retira la membrana de PVDF, bien para ser teñida o procesada para inmunodetección.



**Figura 26.** Disposición de los diferentes elementos de la transferencia.

### **Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible**

Las membranas pueden teñirse con la solución de Ponceau para detectar la presencia de proteínas en la membrana. Es una tinción de baja sensibilidad (del orden de microgramos de proteínas) y para realizarla se sumerge en una solución al 0,5% de rojo Ponceau, 1% de ácido acético durante un minuto y ulterior desteñido con agua destilada hasta conseguir un contraste óptimo. La tinción puede retirarse completamente con una solución de hidróxido sódico 0,1 N.

### **Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas**

Se procedió tal y como está descrito en el protocolo de Shen [Shen, *et al.*, 1988], con ligeras modificaciones:

- a) Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, ésta se corta en las diversas calles que van a ser incubadas individualmente.
- b) A continuación, se satura/bloquea la membrana para evitar las uniones inespecíficas de las inmunoglobulinas o de los conjugados inmunoglobulina – enzima. Para ello, la membrana de PVDF se incubaba con tampón PBS-Tween 0,5%, durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.

- c) La incubación de las membranas de PVDF, con el suero de los pacientes, se realiza durante un periodo de 12-16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4°C. Los sueros de los pacientes pueden emplearse individualmente o agrupados como un *pool*. A nivel de IgE individualizados, los sueros se emplean con una dilución 1:10 (sueros de clase  $\geq 3$  en InmunoCAP o equivalente). Cuando se emplean agrupados, se procede con la misma dilución.
- d) Tras la incubación con el suero, los anticuerpos no fijados se eliminan mediante 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0,05%, en condiciones de agitación constante y a temperatura ambiente.
- e) Se añade conjugado anti-IgE humana marcada con peroxidasa de rábano (Mouse Anti-Human IgE Fc-HRP, SouthernBiotech, Birmingham, EE. UU.), diluida previamente 1:1000 en tampón PBS-Tween 0,5%; en un volumen suficiente que cubra la membrana de PVDF. Se realiza manteniéndose durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
- f) Los conjugados no fijados se eliminan, mediante 4 lavados con tampón PBS-Tween 0,05%, de 5 minutos de duración, en agitación a temperatura ambiente.

El revelado del inmunocomplejo se realizó empleando el sistema ECL + Plus, *Western Blotting detection reagents* de Perkin Elmer (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, EE. UU.) mediante el siguiente protocolo:

- a) Extraer los reactivos de la cámara fría y mantenerlos a temperatura ambiente unos minutos antes de su utilización.
- b) Mezclar las soluciones etiquetadas como A y B, inmediatamente antes de su uso, en una proporción de 1:1. La cantidad es la necesaria para cubrir toda la superficie de la membrana. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- c) Retirar el exceso de la mezcla de detección. Es recomendable realizarlo sosteniendo la membrana en posición vertical y dejando así que escurra el líquido. El extremo inferior de la membrana deberá estar en contacto con un papel secante, con el fin de eliminar el líquido acumulado en el borde inferior.
- d) La membrana debe colocarse inmediatamente después sobre un pliego de plástico transparente; con la cara que lleva las proteínas adsorbidas hacia arriba, cuidando de retirar muy suavemente las burbujas de aire, que se puedan producir entre el plástico y la membrana, y evitándose la presión sobre la misma.

- e) La membrana envuelta en el plástico con el lado que porta las proteínas adsorbidas hacia arriba se coloca sobre la bandeja del transiluminador (Bio-Rad, Hércules, California).
- f) Analizar la membrana con el programa Image Lab (Bio-Rad, Hércules, California), ajustando el tiempo de exposición y el número de imágenes que se desee obtener. Si el tiempo de exposición necesario es menor de 5 segundos, se recomienda diluir los anticuerpos, dada la dificultad de controlar tiempos de exposición tan cortos.

## **Procedimiento de evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección**

El peso molecular y la intensidad de las distintas bandas pueden ser evaluadas mediante un sistema de tratamiento de imagen, en base al empleo de un densitómetro Bio-Rad, *Calibrated Imaging Densitometer GS 710*; equipado con un sistema específico de análisis de imagen Bio-Rad *Diversity Data Base*.

Mediante éste equipo, se pueden obtener las imágenes de los geles de electroforesis de poliacrilamida o de las membranas de PVDF, y su “escaneo” e integración de datos, permite conocer los pesos moleculares de cada banda en función de sus movilidades, comparadas respecto del patrón o estándar empleado, haciendo un análisis de regresión lineal entre las variables logaritmo del peso molecular y logaritmo de la movilidad, medido en “*pixeles*”, exigiéndose una correlación  $r > 0,90$  entre ambas variables.

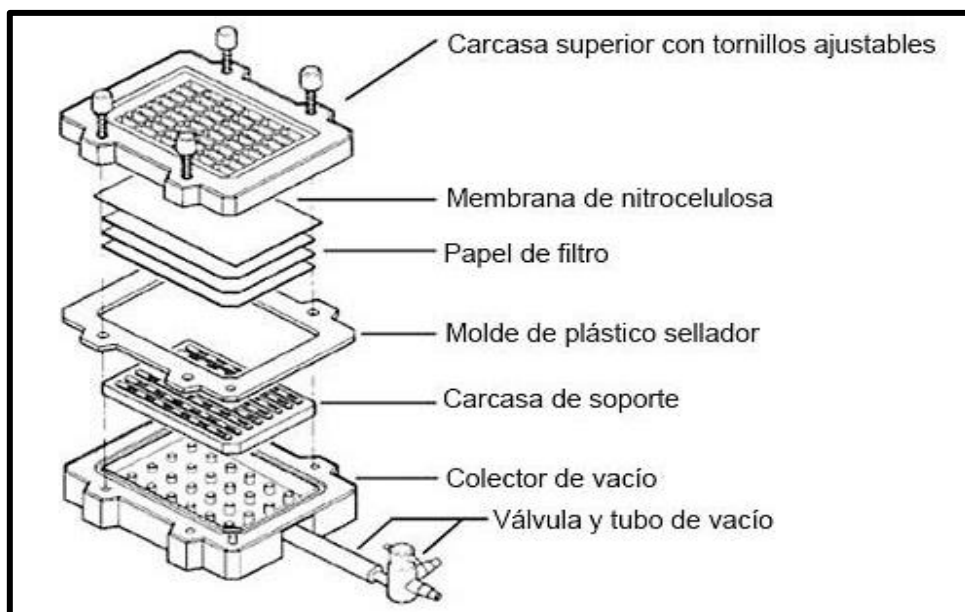
En un aspecto semi-cuantitativo, la intensidad de cada calle o banda puede ser representada como expresión del resultado en intensidad integrada de imagen (densidad óptica por  $\text{cm}^2$ ).

## **Transferencia de proteínas a un soporte sólido. Dot blot**

Es una técnica que representa una simplificación del método de Western Blot. Las proteínas no sufren ningún tipo de separación, por lo tanto, no ofrece información sobre el tamaño de la proteína de interés y si dos proteínas de diferentes tamaños son detectadas, se seguirá viendo como un solo punto. Resumiendo, el Dot blot sólo puede confirmar la presencia o ausencia de una proteína o proteínas que pueden ser detectadas por un anticuerpo específico.

La técnica se desarrolló en el aparato Bio-Dot (Bio-Rad, Hércules, California) que consta de 96 pocillos (Figura 27). Se siguieron las instrucciones del fabricante con alguna modificación:

1. Tratar la membrana de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  y el papel de filtro con metanol (30 segundos), a continuación, con agua destilada (1 minuto) y por último con PBS (2 minutos).
2. El papel de filtro se coloca sobre el molde de plástico sellador que está situado entre los bloques que forman el aparato. Los pocillos que no se vayan a utilizar se tapan con cinta adhesiva. La membrana se coloca encima del papel de filtro.
3. Se cierra el aparato montando los bloques y ajustando los tornillos, enfrentándolos diagonalmente.
4. Una vez ajustado el dispositivo, éste se conecta a una bomba de vacío por el tubo que tiene en un extremo. La válvula acoplada a la entrada del tubo debe estar en posición de atmósfera.
5. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de PBS en cada uno de los pocillos que vayan a ser utilizados en el ensayo para humectar la membrana y se espera a que se filtre todo el PBS.
6. A continuación, se dosifican las muestras del ensayo a razón de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo y se dejan que filtren (1 hora aproximadamente).
7. Se retira la membrana del aparato y los pasos siguientes se harán de acuerdo con el protocolo de la técnica de Western blot. (ver páginas 130-133).



**Figura 27.** Esquema de montaje del aparato Bio-Dot. Modificada de Bio-Rad.



## Determinación de la actividad enzimática

El sistema API ZYM de bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francia) es un método semi-cuantitativo de investigación de actividades enzimáticas (Tabla 22) aplicable a diferentes tipos de muestras. El sistema permite estudiar rápidamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. Éstas deben estar a una concentración de 5 mg/mL.

Se dosificaron 65  $\mu$ L de la suspensión en cada pocillo y después se dejó incubando durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación se añadió una gota del reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B a cada uno de los pocillos. Se dejó que se desarrollara el color durante un mínimo de 5 minutos.

**Tabla 22**

*Relación de aspecto tras una reacción enzimática positiva.*

Enzima	Reacción +
Control	----
Fosfatasa alcalina	Violeta
Esterasa (C4)	Violeta
Esterasa Lipasa (C8)	Violeta
Lipasa (C14)	Violeta
Leucina arilamidasa	Naranja
Valina arilamidasa	Naranja
Cistina arilamidasa	Naranja
Tripsina	Naranja
$\alpha$ -quimiotripsina	Naranja
Fosfatasa ácida	Violeta
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Azul
$\alpha$ -galactosidasa	Violeta
$\beta$ -galactosidasa	Violeta
$\beta$ -glucuronidasa	Azul
$\alpha$ -glucosidasa	Violeta
$\beta$ -glucosidasa	Violeta
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	Marrón
$\alpha$ -mannosidasa	Violeta
$\alpha$ -fucosidasa	Violeta

## ELISA inhibición

El ELISA es un tipo de enzimo-inmunoensayo que se basa en la interacción de una enzima conjugada a un anticuerpo que reconoce e interacciona con un complejo antígeno-anticuerpo específico. En este trabajo se utilizó la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a un anticuerpo que reconocía IgE humana.

Es un método que nos permite conocer la potencia alergénica (Ag50) de un extracto, es decir, la cantidad de extracto necesario para inhibir el 50% de la reactividad IgE específica de un suero de un paciente alérgico a dicho extracto.

El protocolo empleado en este trabajo fue el método descrito por Engvall, van Weemen y colaboradores [Engvall y Perlmann, 1971; Van Weemen y Schuurs, 1971] con modificaciones:

- a) El alérgeno en fase sólida lo constituyen los componentes de la sustancia activa del cacahuete, que se encuentran acoplados a placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) a una concentración de 250 µg/mL.
- b) Tras la incubación se elimina el contenido y se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0,05%.
- c) Los alérgenos inhibidores en fase líquida lo constituyen los componentes de la sustancia activa del cacahuete (la misma y diferentes a la utilizada en la fase sólida para poder comparar). Como control negativo se utiliza un tampón de BSA 1% en PBS-Tween 0,05%.
- d) El suero empleado se corresponde a una mezcla de sueros de diferentes pacientes con una IgE específica al cacahuete >0,7 kUA/L.
- e) Se prepara una batería con diferentes concentraciones del alérgeno inhibidor en el tampón de BSA 1% (200 µL) y se añade a cada tubo 200 µL de suero (dilución previa 1:25 en el tampón de BSA), exceptuando uno de los tubos que sólo llevará suero y BSA y que se corresponde con el 100% de unión (0% inhibición).
- f) Los tubos se pre-incuban a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación orbital.
- g) A cada pocillo se le añaden 100 µL del tampón de BSA y se mantiene 1 hora a temperatura ambiente.
- h) Se lava la placa 3 veces con PBS-Tween 0,05% en el lavador ELx50 *Automated Strip Washer* (Winooski, Vermont).

- i) Tras las 2 horas de pre-incubación, las muestras de los tubos se pasan a la placa de microtitulación y se mantiene 1 hora a temperatura ambiente.
- j) Se lava la placa 3 veces con PBS-Tween 0,05% en el lavador ELx50 *Automated Strip Washer* (Winooski, Vermont). Se añaden 50  $\mu$ L por pocillo de un anticuerpo de ratón monoclonal anti-IgE humana de Operon (Zaragoza, España) a una dilución 1:1000 en tampón de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- k) Tras 3 nuevos lavados con PBS-Tween 0,05% se procede a la adición de 50  $\mu$ L de un anticuerpo de ratón policlonal anti-IgG de Sigma-Aldrich (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) a una dilución 1:1000 en tampón de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- l) Tras 3 nuevos lavados con PBS-Tween 0,05% se procede a la adición de 50  $\mu$ L de estreptavidina-peroxidasa de Sigma-Aldrich (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 1 mg/mL diluida 1:1000 en el tampón de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- m) Finalmente se lava la placa 3 veces con tampón PBS-Tween 0,05% y se añaden 50  $\mu$ L por pocillo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + ABTS (1 mM ABTS en tampón 70 mM citrato fosfato pH 4,2) en una proporción 1:1000 a temperatura ambiente durante un tiempo que no debe exceder de 1 hora.
- n) La placa se lee en un espectrofotómetro para microplacas PowerWave HT (BioTek, Vermont, EE. UU.) a 405 nm. Se termina de leer cuando la medida del 100% de unión alcanza una absorbancia de 0,6.
- o) Los resultados obtenidos se extrapolan sobre la recta obtenida con los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones y se obtiene la concentración de alérgeno inhibidor que produce un 50% de inhibición (Ag50).

## PRUEBA CUTÁNEA

Es el método de elección para demostrar una sensibilización mediada por IgE en un paciente frente a un alérgeno determinado. Para su realización se siguen las normas aceptadas internacionalmente [Pastorello, 1993; Asero, *et al.*, 2007].

En general, es una prueba de una alta sensibilidad. Un resultado negativo excluye prácticamente la posibilidad de aparición de síntomas en la prueba de provocación [Bock, *et al.*, 1978; Sampson y Albergo, 1984], pero una prueba cutánea positiva, es sólo sugestiva de una respuesta IgE frente a ese alimento, y su interpretación debe supeditarse a la historia clínica y al resultado de la provocación oral.

En los casos de una reacción anafiláctica tras la ingestión de un alimento aislado, o de reacciones recientes y repetidas con un mismo alimento, una prueba cutánea positiva se considera de valor diagnóstico definitivo [Bock, *et al.*, 1978, 1988].

## Preparación de las pruebas cutáneas

Se pesó la fuente alergénica elegida y ya caracterizada, tal y como se ha descrito previamente en el apartado “*Determinación de los parámetros analíticos – Extracto alergénico*” en la balanza GF-300 (A&D Weighing, Tokio, Japón). En el cálculo de la cantidad necesaria se tuvo en cuenta la concentración final de la prueba cutánea.

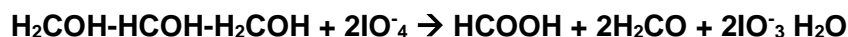
A continuación, se añadió la cantidad necesaria de solución salina fisiológica fenolada al 0,2% y glicerizada al 50% para alcanzar la concentración final deseada, en función de la cantidad de la sustancia activa que se pesó. Se agitó hasta su completa disolución y se cogió muestra para analizar posteriormente la carga microbiana.

Por último, se realizó una filtración esterilizante mediante filtros estériles de poliétersulfona (PES) de 0,22 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), la cual se alicuotó en los viales correspondientes.

## Análisis de las pruebas cutáneas

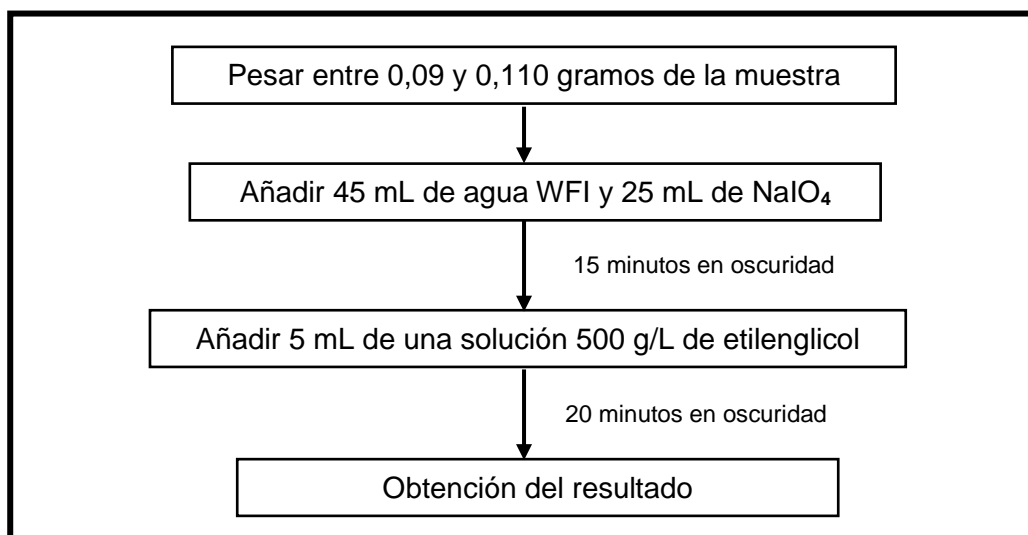
### Contenido de glicerol

El glicerol, en presencia de peryodato sódico (NaIO<sub>4</sub>) y etilenglicol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), produce la siguiente reacción:



El exceso de peryodato reacciona con el etilenglicol y se forma formaldehído. El ácido fórmico (HCOOH) producido en la reacción se valora con hidróxido de sodio. Es una medida indirecta de la cantidad de glicerol consumido para su formación.

El contenido de ácido fórmico se midió en el valorador T50 de Mettler-Toledo (Greifensee, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De manera general, el flujo del método analítico empleado para determinar el glicerol fue el descrito en la Figura 28.

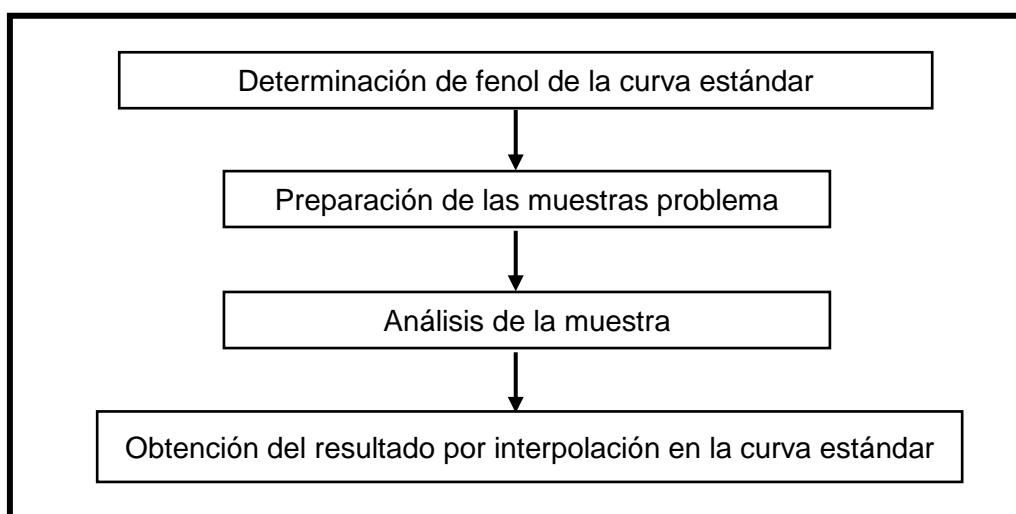


**Figura 28.** Resumen del análisis del contenido de glicerol.

### **Contenido de fenol**

Los compuestos fenólicos reaccionan con la 4-aminopirazolona ( $C_{11}H_{13}N_3O$ ) a pH básico y en presencia de ferricianuro potásico ( $C_6N_6FeK_3$ ) para formar un compuesto coloreado de pirazolona, susceptible de medirse espectrofotométricamente a 510 nm.

Como recta patrón, se empleó fenol a 1 mg/mL (AppliChem Panreac, Barcelona, España), a partir del cual se prepararon diferentes concentraciones (5; 10; 15; 20; 30  $\mu$ g/mL) sobre las que se comparó la muestra y cuyas lecturas se realizaron a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro para microplacas PowerWave HT (BioTek, Vermont, EE. UU.). De manera general, el flujo del método analítico empleado para determinar el contenido de fenol está representado en la Figura 29.



**Figura 29.** Resumen del análisis del contenido de fenol.

### **Contenido de proteína**

Se realiza tal y como está descrito en el apartado de análisis del Extracto Alergérico (ver página 90).

### **pH**

Se realizó tal y como está descrito en el apartado de análisis del Extracto Alergérico (ver página 92).

### **Carga microbiana en proceso**

También se denomina *Bioburden*. Es un ensayo utilizado como parte de la monitorización del proceso, el cual estima la población microbiana de una muestra antes de la esterilización. La contaminación puede provenir de los componentes comprados o fabricados, del operario, del ambiente de fabricación y de fuentes externas.

Se tomaron 2 mL de muestra antes de realizar la filtración esterilizante con una jeringa estéril. Se colocó una bomba Milliflex Plus (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) dentro de una cabina de flujo laminar sobre la que se colocó una membrana de filtración de 0,45 µm. Se humedeció la membrana con 10 mL de *Fluid A* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y, finalmente, se añadieron los 2 mL de la muestra a analizar. Se completó hasta un volumen total de 100 mL con Fluid A.

Una vez terminada la filtración se colocó la membrana sobre una placa de agar triptona de soja (TSA) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Las placas se incubaron a 35°C en la estufa BE300 de Memmert (Schwabach, Alemania) durante 4 días. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de éstas.

- Si no hay crecimiento se considera negativo.
- Si existe crecimiento se procede al contaje e identificación del número de colonias presentes en la placa. Los límites de aceptación se fijaron en  $\leq 2,1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC), debido al límite establecido por el fabricante del filtro utilizado posteriormente para la esterilización de los productos (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

### **Esterilidad**

Se realizó un muestreo del producto que tuvo en cuenta el número total de viales fabricados, de este modo se analizaron 5 viales del total fabricado que fue de 50. Dentro de cámara estéril, y bajo una campana de flujo laminar, utilizando una jeringa estéril se introdujo la mitad del volumen muestreado en una botella de caldo de triptona de soja y la otra mitad del volumen en una botella de caldo tioglicolato.

- La botella de triptona de soja (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) se incubó a 22,5°C en una estufa Selecta Incudigit (JP Selecta, Barcelona, España) durante 14 días.
- La botella de tioglicolato (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) se incubó a 32,5°C en una estufa Selecta Incudigit (JP Selecta, Barcelona, España) durante 14 días.

Transcurridos los 14 días de incubación se examinaron los medios de cultivo para observar macroscópicamente la presencia de crecimiento microbiano. El medio completamente cristalino se considera estéril.

### **Determinación de endotoxinas**

Se utilizó el test de LAL (*Limulus ameobocyte lysate*, Charles River, Massachusetts, EE. UU.), un ensayo cromogénico cinético que se basa en la coagulación de los amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* debido a las endotoxinas bacterianas.

En el ensayo, como consecuencia de la coagulación de los amebocitos del cangrejo, se produce la hidrólisis de un sustrato incoloro y se libera p-nitroanilina, de color amarillo, cuya formación se puede detectar a 405 nm. Los niveles de endotoxinas, en las muestras problema, se determinaron por comparación de éstas con una curva estándar de concentraciones conocidas de endotoxinas.

El vial de estándar de endotoxina se reconstituyó según las instrucciones del fabricante, quedando a una concentración de endotoxina de 50 UE/mL, por lo que se preparó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 5; 0,5; 0,05, incluyendo un control negativo constituido por agua apirógena.

Se añadieron 100 µL por pocillo de la curva estándar y de las muestras problema e inmediatamente se introdujo la placa en el lector ELx808 (BioTek, Vermont, EE. UU.) a 37°C y 405 nm. El lector termina las lecturas automáticamente una vez que no detecta diferencias de densidad óptica a lo largo del tiempo.

## **ESTUDIO CON PACIENTES**

### **POBLACIÓN ESTUDIADA**

Se seleccionaron de forma prospectiva y de acuerdo con la práctica clínica habitual, 30 pacientes con sospecha de alergia al cacahuete, de entre los pacientes que acudían a la consulta de Alergia Infantil del Servicio de Alergia del Hospital Severo Ochoa.

El Hospital Universitario Severo Ochoa da servicio a Leganés, en la zona sur de Madrid, atendiendo a una población de 189.929 habitantes, siendo el rango de edad más numeroso el comprendido entre los 14 y los 64 años (Memoria Anual Hospital Severo Ochoa, año 2016).

Para los análisis de los resultados, se tuvieron en cuenta la historia clínica de los pacientes y los antecedentes personales. Además, se estudió la gravedad de las reacciones de acuerdo a la escala modificada de Clark [Clark y Ewan, 2003], quedando ésta de la siguiente manera:

1. Eritema cutáneo localizado, urticaria, angioedema, prurito bucal.
2. Eritema general, urticaria general, angioedema.
3. Síntomas digestivos, rinoconjuntivitis.
4. Leve edema laríngeo (cambio de voz), asma leve, dolor abdominal.
5. Disnea moderada, hipotensión, pérdida de conciencia.

### **PRUEBAS CUTÁNEAS**

Las pruebas cutáneas se realizaron siempre por el mismo personal de enfermería entrenado en la técnica y en el manejo de reacciones sistémicas graves. La valoración del resultado fue llevada a cabo por el médico responsable.

Se llevaron a cabo en el servicio de Alergia del Hospital Severo Ochoa, disponiéndose, no solamente del material y la medicación necesarios para el tratamiento de una reacción sistémica, sino también del material para poder realizar una reanimación en el caso de que fuera preciso (adrenalina, beta-adrenérgicos, vasoconstrictores, teofilinas, antihistamínicos, oxígeno y sistema de fluidoterapia).



Antes de su realización se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Paciente sin síntomas alérgicos agudos en ese momento, fundamentalmente asma bronquial.
- Paciente sin tratamiento con fármacos que pudieran enmascarar el resultado de las pruebas: fármacos con efecto antihistamínico (antihistamínicos, antidepresivos, etc.), fármacos beta-adrenérgicos (vía sistémica) ni corticoides tópicos.
- Evaluación de las condiciones de la piel sobre la que se iban a realizar las pruebas para evitar posibles errores en la interpretación del resultado, por ejemplo, la presencia de una placa de dermatitis atópica en la zona.
- Revisión de los extractos para confirmar que estaban en condiciones adecuadas (fecha de caducidad, conservación en frío).

Se realizaron pruebas cutáneas mediante la técnica de *prick* con lancetas estériles, según lo descrito por Dreborg y Foucard en 1983 [Dreborg y Foucard, 1983], con los extractos de cacahuete fracción hidrosoluble y cacahuete fracción liposoluble preparados y analizados anteriormente. Como control positivo se utilizó histamina a una concentración de 10 mg/mL (DIATER Laboratorios, Madrid, España) y como control negativo, solución salina.

Se identificó la zona de aplicación de cada uno de los alérgenos haciendo una marca con un rotulador en la piel del antebrazo, entre la fosa antecubital y la muñeca, respetando una distancia mínima entre cada marca de 2 ó 3 cm. Se aplicó una gota, de cada uno de los alérgenos a testar, en cada una de las marcas, y se realizó una punción con la lanceta, en dirección perpendicular a la piel, atravesándola. Se utilizó una lanceta distinta para cada extracto.

Por último, se secó el extracto sobrante con papel secante sin friccionar. La lectura se efectuó a los 10-15 minutos, midiéndose el diámetro mayor y el ortogonal obtenido en su punto medio, en milímetros. Se realizaron por duplicado, en los dos antebrazos del paciente. La media de estas dos medidas fue el valor utilizado.

## PROVOCACIÓN ORAL CONTROLADA

La prueba de provocación oral controlada (P.O.C) con el alimento implicado en la reacción, y al que el paciente está sensibilizado, es el procedimiento definitivo para confirmar o descartar el diagnóstico de alergia a un alimento.

Previo a su realización, siempre es necesario que el paciente firme un consentimiento informado. El Comité de Reacciones Alérgicas a Alimentos de la SEAIC, propuso algunas directrices sobre la metodología y aplicación de las pruebas de provocación. Más tarde, la Academia Europea de Alergología e Inmunología clínica publicó un documento con las guías para la realización de las provocaciones en pacientes con reacciones preferentemente mediadas por IgE [Bindslev-Jensen, *et al.*, 2004]. Las indicaciones y contraindicaciones se recogen en la Tabla 23.

En algunos casos la prueba de provocación no es necesaria para el diagnóstico:

- En los casos de clínica anafiláctica o sistémica grave, con clara relación con el/los alimentos y estudio alérgico positivo y concordante.
- Si la clínica es sugestiva, repetida y reciente (12-18 meses desde el último episodio en niños) [Sampson, 1999; Niggemann, *et al.*, 2005], con estudio alérgico positivo y concordante.

El paciente estaba en ayunas y el alimento se administró comenzando por una cantidad inferior a la que supuestamente originó la reacción. Se recomienda comenzar por debajo de la “dosis umbral” con la que reaccionan la mayoría de los pacientes, referida en la literatura. Los incrementos de dosis se realizaron aumentando las cantidades de forma logarítmica.

Los intervalos entre las dosis fueron superiores al periodo de latencia con que apareció la reacción. El resultado se consideró positivo si el paciente presentó una clínica compatible con alergia. Una provocación positiva debe ser tratada precozmente, con adrenalina intramuscular o subcutánea y reposición de volumen, acompañado de otras medidas comunes en el tratamiento de la anafilaxia, sin esperar a que desarrolle el cuadro clínico completo. Si el paciente no presentó clínica, se completó la provocación con cantidades adecuadas para la edad del paciente.

**Tabla 23***Indicaciones y contraindicaciones de la P.O.C.*

<b>Indicaciones de la P.O.C</b>	<b>Contraindicaciones de la P.O.C</b>
<p>Pacientes de cualquier edad con una historia de reacción adversa frente a un alimento.</p>	<p>Paciente que no pueda recibir tratamiento con adrenalina, incluidos los pacientes que requieran tratamiento con beta-bloqueantes.</p>
<p>Establecer o excluir el diagnóstico de hipersensibilidad a alimentos antes de instaurar una dieta de exclusión prolongada.</p>	<p>Embarazo.</p>
<p>Valorar la aparición de tolerancia a lo largo de la evolución de la enfermedad. Hay que tener en cuenta que, al menos en niños, es frecuente la evolución a la tolerancia en el tiempo y, por lo tanto, el diagnóstico debería reconsiderarse periódicamente.</p>	<p>Anafilaxia:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adultos con una clínica clara de anafilaxia, o reacción sistémica grave con uno o más alimentos con estudios alérgicos positivos y concordantes.</li> </ul>
<p>Después de dietas de exclusión insuficientemente documentadas del alimento, pero del cual se sospecha que puede ser causante de una reacción adversa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niños pequeños si la historia de anafilaxia es reciente. Teniendo en cuenta que la evolución natural de alergia a la mayoría de los alimentos, en niños, es hacia la tolerancia, la contraindicación sería durante un período variable de tiempo.</li> </ul>
<p>Si se detecta sensibilización a un alimento y se desconoce la tolerancia por parte del paciente.</p>	
<p>Si se sospecha que un síntoma crónico puede estar relacionado con un alimento.</p>	<p>En casos seleccionados en los que los resultados de la determinación de IgE específica hacen innecesaria la provocación. Según se ha indicado anteriormente, los puntos de corte del <i>prick</i> o la IgE específica, que puede predecir una provocación positiva, son muy variables y dependen de diversos factores como del alimento implicado, edad del paciente, momento evolutivo, manifestación clínica, etc.</p>
<p>Pacientes sin historia clínica específica de reacción adversa previa para un alimento determinado.</p>	
<p>Investigación.</p>	

## DETERMINACIÓN DE IgE

La determinación de IgE (*Radioallergobent test*, RAST) fue descrita por primera vez en 1967 [Wide, *et al.*, 1967]. Esta técnica utilizaba un disco de papel como fase sólida donde se inmovilizaba de manera covalente el alérgeno para después administrar el suero del paciente. Actualmente, el sistema más común para detectar IgE específica es el denominado ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

La determinación de los niveles séricos de IgE total y de IgE específicos, frente a la fracción hidrosoluble y liposoluble del cacahuete y las proteínas recombinantes rAra h 1, rAra h 2, rAra h 3, rAra h 6, rAra h 8 y rAra h 9, se llevó cabo mediante el sistema de detección ImmunoCAP 100 (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

### Determinación de IgE total

Para la detección de la IgE total se utilizó una anti-IgE (monoclonal) en lugar del alérgeno. Para calcular los resultados, se construyó una curva de referencia colocando la media de fluorescencia de cada estándar frente a la concentración de IgE. Posteriormente, la media de fluorescencia de cada suero problema se llevó a la curva estándar y se leyó la concentración de IgE que le corresponde. Los valores se expresan en kU/L.

El sistema comienza dispensando cada uno de los sueros problema, los estándares y los controles. Esta fase de reacción antígeno/anticuerpo se incubó durante 30 minutos. La anti-IgE reacciona con la IgE total del suero del paciente. Tras lavar, para eliminar la parte que no se une, se añade un anticuerpo anti-IgE marcado con una enzima (beta-galactosidasa). Posteriormente se incuba el complejo anti-IgE problema + IgE + anti-IgE [enzima] durante 30 minutos.

Finalmente se lava y se añade una solución de revelado durante 10 minutos. Tras parar la reacción, se añade una sustancia reductora que libera la enzima y reacciona con un sustrato cromógeno para formar un compuesto coloreado. La fluorescencia se mide con un fluorímetro. El cambio de coloración de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de IgE presente en el suero del paciente. El rango de medida del sistema es de 2 a 5.000 kU/L. El método emplea 50 µL de suero.

## Determinación de IgE específica

El sistema comienza dispensando cada uno de los sueros problema, los estándares y los controles. El alérgeno de interés, unido covalentemente al disco de celulosa, reacciona con la IgE específica del suero. Tras lavarlo y retirar la IgE no específica, se añade un anticuerpo anti-IgE (anticuerpo monoclonal de ratón) marcado enzimáticamente (beta-galactosidasa) para formar un inmunocomplejo (alérgeno + IgE problema + anti-IgE [enzima]).

Después de la incubación, se lava para eliminar la anti-IgE marcada no unida y se añade una solución de desarrollo (4-metil-umbeliferil beta-D galactosidasa) que forma un compuesto coloreado. Finalmente, la reacción fluorescente se interrumpe con una solución de carbonato cálcico.

La fluorescencia es medida por un fluorímetro que sitúa los valores obtenidos en cada suero problema sobre la curva de calibración expresando los resultados en kU/L. El cambio de coloración de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de IgE presente en el suero del paciente. El método emplea 50 µL de suero y el tiempo total necesario para la realización de la técnica son 2 horas y media.

Tradicionalmente, los valores de este sistema se clasifican en 6 clases y se consideran resultados negativos los inferiores a 0,35 kU/L (Tabla 24).

**Tabla 24**

*Clasificación de las clases de los sueros.*

<b>Clases de los sueros</b>	
Clase 0	<0,35 kU/L
Clase 1	0,35 - 0,69 kU/L
Clase 2	0,7 - 3,49 kU/L
Clase 3	3,5 - 17,49 kU/L
Clase 4	17,5 - 49,9 kU/L
Clase 5	50 - 99,9 kU/L
Clase 6	≥100 kU/L

### **Biotinilización de extractos alérgicos**

Las proteínas contenidas dentro de la fracción liposoluble de los cacahuets no están disponibles comercialmente para realizar las mediciones de IgE específica, por lo que fue necesario biotinilar dichas proteínas del extracto alérgico de acuerdo al protocolo de Sander con modificaciones [Sander, *et al.*, 2005].

Se llevó a cabo mediante el uso del kit Biotin Protein Labeling (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). El kit contiene los siguientes elementos:

- Solución de bloqueo: sirve para saturar la columna de Sephadex G-25 y evitar por tanto las uniones inespecíficas de las proteínas a la columna.
- Tampón fosfato salino: sirve para equilibrar la columna de Sephadex G-25 después del bloqueo, para disolver y diluir las proteínas, así como para eluirlas una vez que han sido marcadas.
- Biotin-7-NHS: la Biotin-7-NHS reacciona con los grupos amino libres de las proteínas formando enlaces amida estables.
- Dimetilsulfóxido (DMSO): se utiliza como solvente para la Biotin-7-NHS.

La solución de bloqueo se disolvió en 300 mL de agua ultrapura, el contenido de la botella de PBS en 1L de agua ultrapura y para preparar la columna de Sephadex G-25 fue necesario fijarla en un soporte adecuado, cortar la parte protectora inferior y quitar la tapa superior.

En primer lugar, se dejó fluir la solución de empaquetamiento y se añadieron a continuación 5 mL de la solución de bloqueo. Se dejó fluir y se equilibró a continuación con 30 mL de tampón PBS (6 x 5 mL). Es importante evitar que la columna se seque, si no se va a utilizar en el momento volver a colocar las tapas inferior y superior hasta su utilización.

Se añadieron 250  $\mu$ L de DMSO al vial que contenía 5 mg de D-biotinoyl- $\epsilon$ -ácido aminocaproico-N-hidroxisuccinimida éster (Biotin-7-NHS), obteniéndose una concentración final de 20 mg/mL.

Se diluyeron las proteínas a marcar (fracción liposoluble) en un volumen máximo de 1 mL (con volúmenes de entre 0,1 y 0,3 mL se favorece el encuentro entre moléculas de tampón PBS) a una concentración final de entre 5 y 15 mg/mL. Se añadió a la muestra el volumen adecuado de Biotin-7-NHS-DMSO (20 mg/mL) según la Tabla 25.

Tabla 25

*Mezcla de reacción molecular de la biotina-7-NHS.*

<b>Mezcla de reacción molar (moléculas de proteína : moléculas de biotina-7-NHS)</b>												
<b>M<sub>r</sub> proteína</b>	<b>mg biotina-7-NHS / mg proteína</b>											
	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100	1:110
<b>10 000</b>	0,227	0,455	0,909	1,364	1,818	2,273	2,727	3,182	3,838	4,091	4,545	5,000
<b>20 000</b>	0,114	0,227	0,455	0,682	0,909	1,136	1,364	1,591	1,818	2,045	2,273	2,500
<b>30 000</b>	0,076	0,152	0,303	0,488	0,806	0,758	0,909	1,081	1,212	1,383	1,818	1,667
<b>40 000</b>	0,057	0,114	0,227	0,341	0,455	0,568	0,682	0,759	0,909	1,023	1,136	1,250
<b>50 000</b>	0,045	0,091	0,182	0,273	0,364	0,455	0,445	0,636	0,727	0,818	0,909	1,000
<b>60 000</b>	0,038	0,076	0,152	0,227	0,303	0,379	0,455	0,530	0,606	0,682	0,758	0,833
<b>70 000</b>	0,032	0,065	0,130	0,195	0,260	0,325	0,390	0,455	0,519	0,584	0,650	0,714
<b>80 000</b>	0,028	0,057	0,114	0,170	0,227	0,284	0,341	0,398	0,455	0,511	0,568	0,625
<b>90 000</b>	0,025	0,051	0,101	0,152	0,202	0,252	0,303	0,354	0,404	0,455	0,505	0,556
<b>100 000</b>	0,023	0,045	0,091	0,136	0,182	0,227	0,273	0,318	0,364	0,409	0,455	0,500
<b>110 000</b>	0,021	0,041	0,083	0,124	0,165	0,207	0,248	0,289	0,331	0,372	0,413	0,455
<b>120 000</b>	0,019	0,038	0,076	0,114	0,152	0,189	0,227	0,265	0,303	0,341	0,379	0,417
<b>130 000</b>	0,017	0,035	0,070	0,105	0,140	0,175	0,210	0,245	0,280	0,315	0,350	0,385
<b>140 000</b>	0,016	0,033	0,065	0,097	0,130	0,162	0,195	0,227	0,260	0,292	0,325	0,357
<b>150 000</b>	0,015	0,030	0,061	0,091	0,121	0,152	0,182	0,212	0,242	0,273	0,303	0,333

Dado que el extracto alergénico tenía un rango de pesos moleculares de entre los 10 y los 100 kDa, se escogió el de 30 kDa como punto medio. La mezcla de reacción molecular se puso a 1:5, por lo tanto, se cogió 0,076 mg de biotina por mg de proteína de extracto.

Se mezcló durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación fuerte. Una vez bloqueada y equilibrada la columna de Sephadex G-25, se procedió a la elución de las proteínas marcadas con biotina, de forma que se puso 1 mL de la muestra marcada y se dejó fluir. A continuación, se añadieron 2,5 mL de tampón PBS y se dejó fluir.

Se eluyeron las proteínas marcadas añadiendo a la columna 3,5 mL de PBS. Se recogieron fracciones de 0,5 mL (aproximadamente 10 gotas) y se midieron las fracciones recogidas a una longitud de onda de 280 nm, reservando las fracciones con mayor absorbancia.

### **Unión de proteínas marcadas con biotina a fases sólidas de estreptavidina - InmunoCAP y determinación de la IgE específica mediante sistema automatizado UniCAP 100**

Se realizó según protocolo de uso del sistema UniCAP 100 (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). El acoplamiento de la proteína marcada con biotina a los CAPs de estreptavidina (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), se realizó una vez que estos últimos se colocaron en el carrusel del sistema. Se añadieron 50 µL del extracto biotinilado a cada CAP y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos.

La lectura de los niveles de IgE específica se realizó conforme a los valores de referencia definidos por el fabricante y descritos anteriormente (ver página 120).

## **PRUEBA DE LIBERACIÓN DE HISTAMINA**

El test de liberación de histamina (HRT, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que detecta la histamina liberada por los basófilos tras la exposición a un alérgeno utilizando un método de fibra de vidrio. Los materiales que proporciona el kit de Reflab (Copenhague, Dinamarca) son los siguientes:

- Tampón de lavado (solución de SDS en agua al 0,4%).
- Reactivo de acoplamiento [phtaldialdehido (OPA)].
- Diluyente para el reactivo de acoplamiento (0,05 mol/L de hidróxido sódico (NaOH)).
- Solución de parada [0,59% ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>)].
- *Stripping Buffer* (solución de ácido láctico, NaCl, KCl).
- Placas con pocillos recubiertos de fibra de vidrio.
- Tampón Pipes (ácido 1,4-Piperazin-2-dietanosulfónico).
- Viales de IL-3.



## Recolección y almacenaje de las muestras

La prueba se desarrolló para basófilos humanos y solo puede usarse con sangre heparinizada. Después de la extracción de sangre, esta última debe ser testada en 36 horas como máximo. Las muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) hasta que sean utilizadas.

Las muestras de sangre se pueden usar directamente como sangre completa (método directo) o lavada como se explica a continuación (método pasivo con sangre de un donante sano).

## Preparación de las muestras de sangre para método pasivo

- a) Se centrifuga la muestra de sangre completa heparinizada, se retira el suero y se reemplaza por solución salina fisiológica.
- b) Se centrifuga la muestra de sangre con solución salina fisiológica y se reemplaza la misma por solución de *stripping* para retirar las posibles IgE presentes en la sangre del donante sano.
- c) Se centrifuga la muestra con *stripping buffer* y se reemplaza el mismo con tampón Pipes.
- d) Se centrifuga la muestra y se reemplaza el Pipes buffer nuevamente con Pipes *buffer*. A continuación, se homogeneiza la muestra invirtiendo el tubo cuidadosamente varias veces. Se transfirieron 3 mL de sangre lavada al vial de IL-3.

## Preparación de los reactivos

Se añadió el contenido del bote de diluyente para reactivo de acoplamiento (DIL) en la botella del reactivo de acoplamiento (OPA). Se disolvió durante 30 ( $\pm$ 10 minutos) y se invirtió antes de usarse.

El disco de la botella del reactivo de acoplamiento está recubierto de Phthaldehido, no está diseñado para disolverse.

## Concentración óptima del extracto alergénico

Algunos compuestos alergénicos interfieren con el análisis de histamina, por ello se realizaron dos pruebas antes de llevar a cabo el experimento con el suero de los pacientes.

- Prueba de interferencia: se utilizaron diferentes concentraciones del extracto alergénico de cacahuete fracción hidrosoluble y cacahuete fracción liposoluble, utilizando tampón Pipes en lugar del suero del paciente.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	Conc1	Conc7	Conc1	Conc7							
0	Conc2	Conc8	Conc2	Conc8							
50	Conc3	Conc9	Conc3	Conc9							
50	Conc4	Conc10	Conc4	Conc10							
50	Conc5	Conc11	Conc5	Conc11							
50	Conc6	Conc12	Conc6	Conc12							
HISTstd	1		2								
50 $\mu$ L Pip	25 $\mu$ L ConcX + 25 $\mu$ L Pipes buffer										

- Prueba de inespecificidad: se utilizaron diferentes concentraciones del extracto alergénico de cacahuete fracción hidrosoluble y cacahuete fracción liposoluble, utilizando el suero de 10 pacientes no alérgicos. Si la liberación de histamina fue mayor de 10 ng/mL se consideró inespecífica y dicha concentración no se utilizó para el ensayo.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	Conc1	Conc7	Conc1	Conc7	Conc1	Conc7					
0	Conc2	Conc8	Conc2	Conc8	Conc2	Conc8					
50	Conc3	Conc9	Conc3	Conc9	Conc3	Conc9					
50	Conc4	Conc10	Conc4	Conc10	Conc4	Conc10					
50	Conc5	Conc11	Conc5	Conc11	Conc5	Conc11					
50	Conc6	Conc12	Conc6	Conc12	Conc6	Conc12					
50 $\mu$ L Pipes	25 $\mu$ L ConcX		25 $\mu$ L ConcX		25 $\mu$ L ConcX						
	25 $\mu$ L suero 1		25 $\mu$ L suero 2		25 $\mu$ L suero 3						

## Procedimiento de la prueba

Las placas se incubaron con los extractos alergénicos y la sangre heparinizada, de acuerdo con el procedimiento del método pasivo mencionado anteriormente (ver página 124). A continuación, se llevaron a cabo los pasos siguientes:

- a) Se lavan los pocillos con agua destilada 3 veces. Si el lavado es manual, se sacude cuidadosamente la placa bocabajo después de cada lavado.
- b) Se añaden 150  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado en cada pocillo.
- c) Se incuba durante 30 ( $\pm 10$  minutos) a 37°C.
- d) Se vacía el tampón de lavado dentro del sumidero de residuos.
- e) Se lavan las tiras con agua destilada 3 veces. Si el lavado es manual, se sacude cuidadosamente la placa bocabajo después de cada lavado.
- f) Se pipetea 75  $\mu\text{L}$  de reactivo de acoplamiento (OPA) dentro de cada pocillo.
- g) Tiempo de reacción: 10 minutos. Este tiempo debe ser atendido con precisión.
- h) Se para la reacción con 75  $\mu\text{L}$  de solución de parada en cada pocillo.
- i) Se leen los resultados en el lector de placas Histareader (Reflab, Copenhague, Dinamarca).

## Control de calidad

Se realizó una fase de calibración simultáneamente al procedimiento de la prueba para supervisar los niveles mínimos y máximos de la histamina, así como la linealidad. Los límites están definidos por el fabricante.

## Resultados

Los resultados están basados en un sistema de clasificación que usa clase 0, 1, 2 y 3 y cubre el sistema de clasificación usado por los estándares de alérgenos de Reflab (Copenhague, Dinamarca). La clasificación está basada en la mínima concentración de alérgeno capaz de inducir una liberación de histamina significativa.

## **Clasificación**

Una liberación significativa es definida como una respuesta mayor que el valor de corte (*cut off*). El *cut off* es definido como el valor de fondo +28%.  $FU_{actual} \geq (FU_0 + 28\% \text{ de } FU_0)$  donde FU son unidades de fluorescencia y FU0 es el FU de uno de los pocillos con 0 ng/mL de histamina.

FU0 + 28% es el valor de corte y el mínimo valor será (FU0 + 20). Se debe poner atención a posibles *outliers* (en estadística un *outlier* es una observación que numéricamente dista del resto de los datos) en el pocillo D que afectaría al cálculo del valor de corte sobre el que está basado el sistema.

Una corrección de datos puede ser necesaria. Cuando el *cut off* es calculado, el número de concentraciones con una reacción positiva puede ser visto en base a una clasificación determinada. Una respuesta positiva sobre dos concentraciones de alérgeno consecutiva se hace necesaria para dar con una clasificación positiva.

- HR-Clase 0: Respuesta anti-IgE positiva y respuesta de alérgenos negativa.
- HR-Clase 1: Las dos respuestas (anti-IgE y alérgeno) son positivas (All 2).
- HR-Clase 2: Respuesta positiva sobre All2, All3 o All2, All3, All4 o All3, All4.
- HR Clase 3: Respuesta positiva sobre All2, All3, All4, All5 o All3, All4, All5.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el cálculo de la estadística descriptiva se utilizó el programa Excel 2016. Las comparaciones entre poblaciones para estudiar su correlación, el cálculo de la sensibilidad, especificidad y las curvas ROC (operador-respuesta) se efectuaron con el programa GraphPad, en su versión Prism 8.

Las curvas ROC son por definición, una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación.

Para las estadísticas descriptivas se utilizaron los valores de la mediana y rango intercuartílico. Se realizó la prueba *t de Student* para la comparación de los diferentes grupos, cuyos datos seguían una distribución normal, y la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney para los grupos cuyos datos no seguían una distribución normal. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

De acuerdo a la APA (*American Psychological Association*) y a la NEJM (*New England Journal of Medicine*), la significación estadística se representó de la siguiente manera:

- \*  $p \leq 0,05$
- \*\*  $p \leq 0,01$
- \*\*\*  $p \leq 0,001$

## Índices de validez

El resultado de una prueba puede ser positivo o negativo. Para evaluar la validez de esta prueba hay que aplicarla sobre una muestra de individuos que se sepa que tienen la enfermedad y sobre otra que se sepa que no la presentan.

La provocación oral controlada fue considerada como test de referencia o *gold standard*, es decir, se consideraron pacientes realmente alérgicos al cacahuete aquellos que presentaron una provocación oral positiva.

Por una parte, la sensibilidad indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo. Se expresa en términos de probabilidad condicional, es decir, la sensibilidad es la probabilidad de que la prueba identifique como enfermo a aquel que efectivamente lo está.

$$\text{Sensibilidad} = \text{Verdaderos positivos} / \text{total de enfermos}$$

Por otra parte, la especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo.

$$\text{Especificidad} = \text{Verdaderos negativos} / \text{total de enfermos}$$

# RESULTADOS

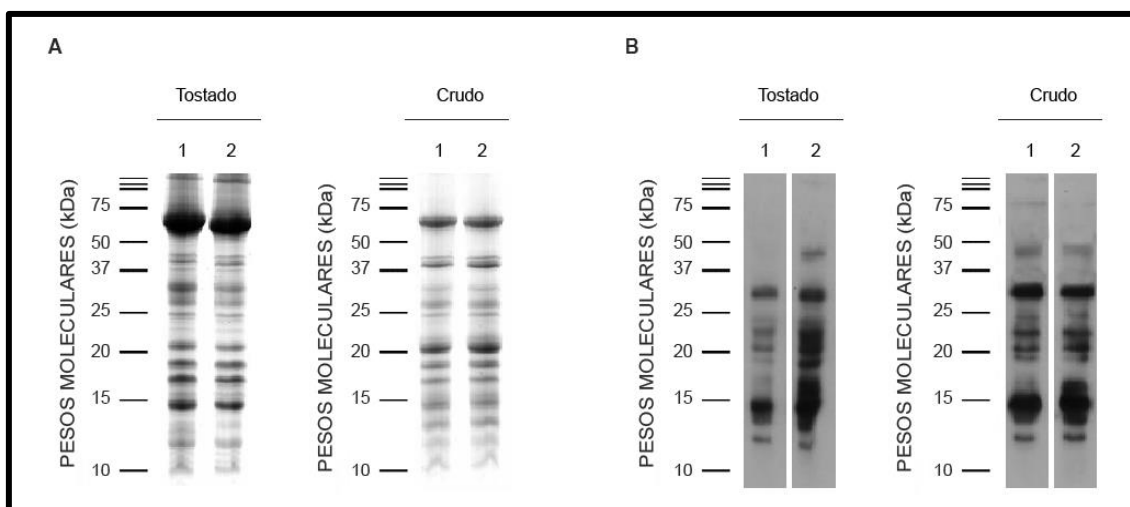




## ALERGENICIDAD DE LA FRACCIÓN GRASA

Cumpliendo con el primer punto de los objetivos principales, se procedió a la demostración de la alergenicidad de la fracción liposoluble de los cacahuetes. Para ello se elaboraron dos extractos alergénicos, uno desengrasado y otro no desengrasado (completo) con dos fuentes de materia prima con diferente procesamiento: tostado y crudo, ambos procedentes de EE. UU. (ver página 86: cacahuete tostado 2 y cacahuete crudo 3).

La Figura 30 muestra los antigenogramas y alergogramas realizados mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot de los extractos alergénicos obtenidos.



**Figura 30.** (A) SDS-PAGE. 1 – Desengrasado; 2 – No desengrasado. (B) WESTERN BLOT. 1 – Desengrasado; 2 – No desengrasado.

## SELECCIÓN DE LA FUENTE ALERGÉNICA

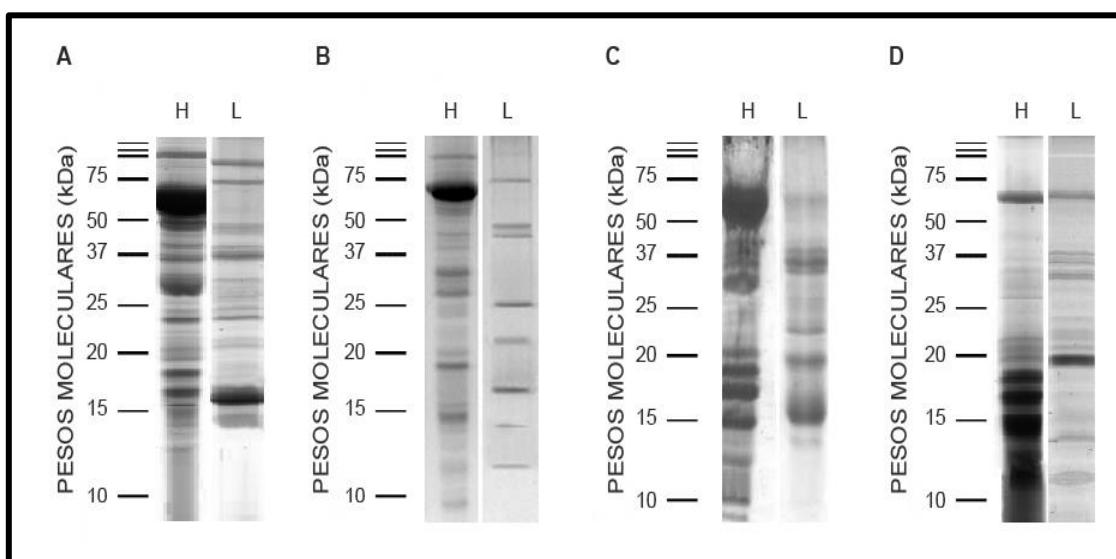
A continuación, se seleccionaron cuatro materias primas diferentes, dos tostadas y dos crudas, con diferente procedencia, para escoger la que presentara un reconocimiento alergénico más completo y con mayor capacidad fijadora de IgE por parte del *pool* de sueros.

La elección de dicha materia prima para llevar a cabo el estudio se realizó mediante SDS-PAGE (Figura 31), Dot blot (Figura 32), Western blot (Figura 33) y ELISA inhibición (Figura 34) de las diferentes fuentes.



## SDS-PAGE

La Figura 31 muestra los antigenogramas realizados mediante electroforesis SDS- PAGE de los diferentes extractos alergénicos seleccionados.

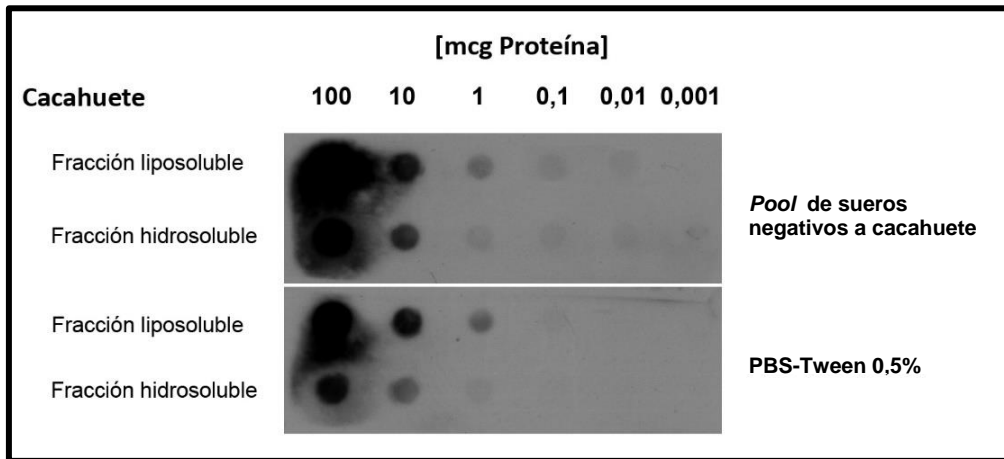


**Figura 31.** Perfil proteico de las diferentes materias primas testadas. (A) Cacahuete tostado 1; (B) Cacahuete tostado 2; (C) Cacahuete crudo 3; (D) Cacahuete crudo 4. H: Fracción hidrosoluble; L: Fracción liposoluble.

## DOT BLOT

La capacidad fijadora de IgE específica de los extractos se analizó mediante Western blot. Para ello, primero se ajustaron las concentraciones de proteína no interferentes mediante la técnica de Dot blot con las diferentes fracciones. Se utilizaron dos tipos de controles, uno con PBS-Tween 0,5% (tampón de bloqueo) y otro con un *pool* de sueros de pacientes no alérgicos al cacahuete.

La Figura 32 muestra el Dot blot en el que se revelan las cantidades no interferentes, siendo de 0,1  $\mu\text{g}$  de proteína para la fracción liposoluble y de 1  $\mu\text{g}$  de proteína para la fracción hidrosoluble.

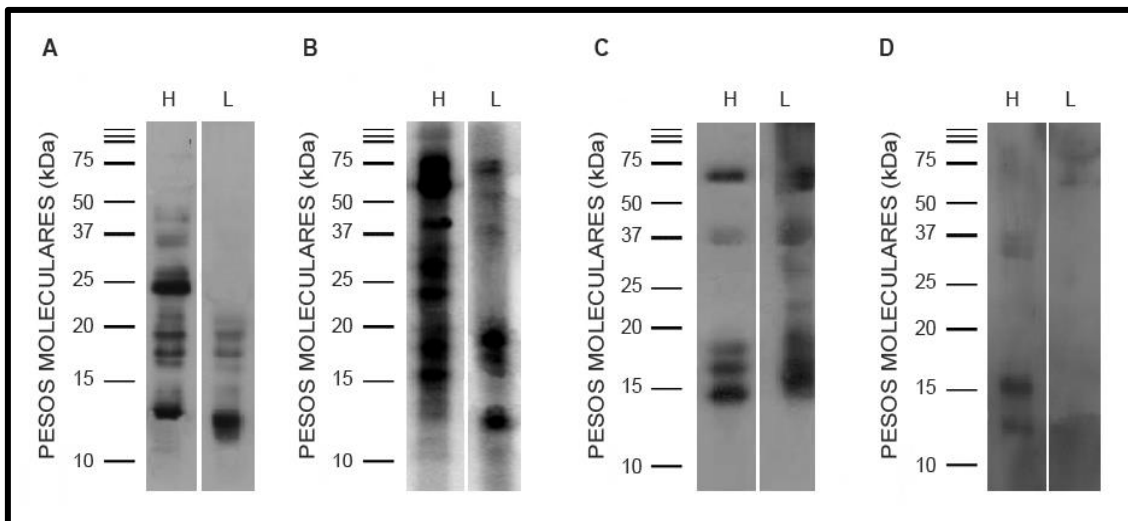


**Figura 32.** Dot blot de las diferentes fracciones del cacahuete, incubadas con un *pool* de sueros de pacientes no alérgicos al cacahuete y con PBS-Tween 0,5%.

## WESTERN BLOT

La Figura 33 muestra los alergogramas realizados mediante Western blot con las cantidades de proteínas optimizadas anteriormente.

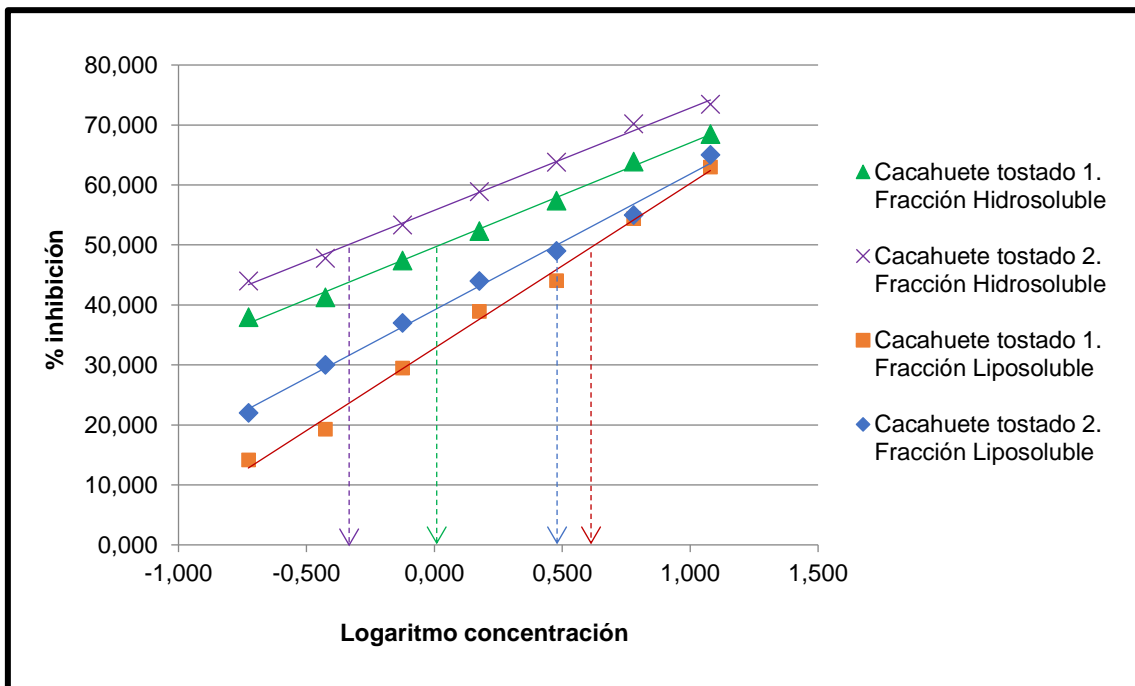
Las fracciones hidrosolubles y liposolubles de las fuentes tostadas y crudas se incubaron con un *pool* de sueros de pacientes alérgicos al cacahuete con un elevado título de IgE específica frente a los mismos. Se puede observar una mayor capacidad fijadora de IgE específica para las fuentes de cacahuete tostado en general y, más concretamente, para el número 2.



**Figura 33.** Perfil alergénico de las diferentes materias primas testadas. (A) Cacahuete tostado 1; (B) Cacahuete tostado 2; (C) Cacahuete crudo 3; (D) Cacahuete crudo 4. H: Fracción hidrosoluble; L: Fracción liposoluble.

## ELISA INHIBICIÓN

Con los cacahuetes que presentaron mayor alergenicidad en el Western blot (tostados) se decidió realizar un ELISA inhibición que pusiera de manifiesto la potencia alergénica de dichos extractos, presentando el cacahuete tostado 2 una potencia 2,29 veces mayor para la fracción hidrosoluble y 1,40 veces mayor para la fracción liposoluble tal y como se observa en la Figura 34.



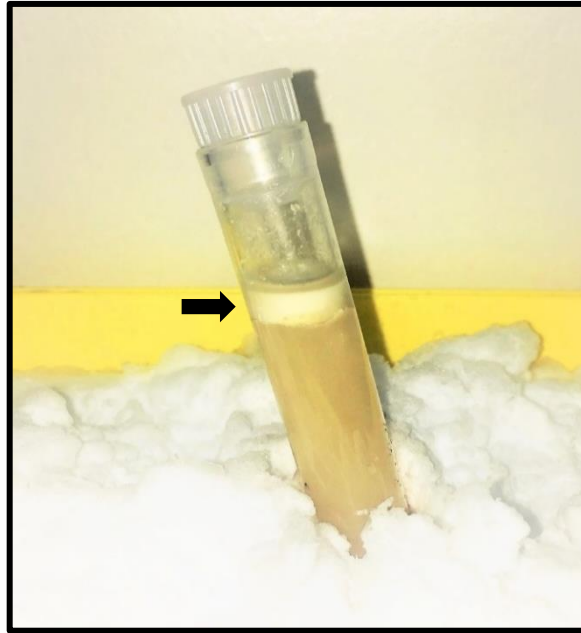
**Figura 34.** ELISA inhibición cacahuete tostado fracción hidrosoluble 1 vs. cacahuete tostado fracción hidrosoluble 2 y cacahuete tostado fracción liposoluble 1 vs. cacahuete tostado fracción liposoluble 2.

Las Ag50 de cada uno de los extractos para la fracción hidrosoluble fue de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para el cacahuete tostado 1 y 2 respectivamente, y para la fracción liposoluble de 4,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para el cacahuete tostado 1 y 2 respectivamente, datos obtenidos por regresión lineal al interpolar el 50% de inhibición sobre la concentración que origina dicha inhibición.

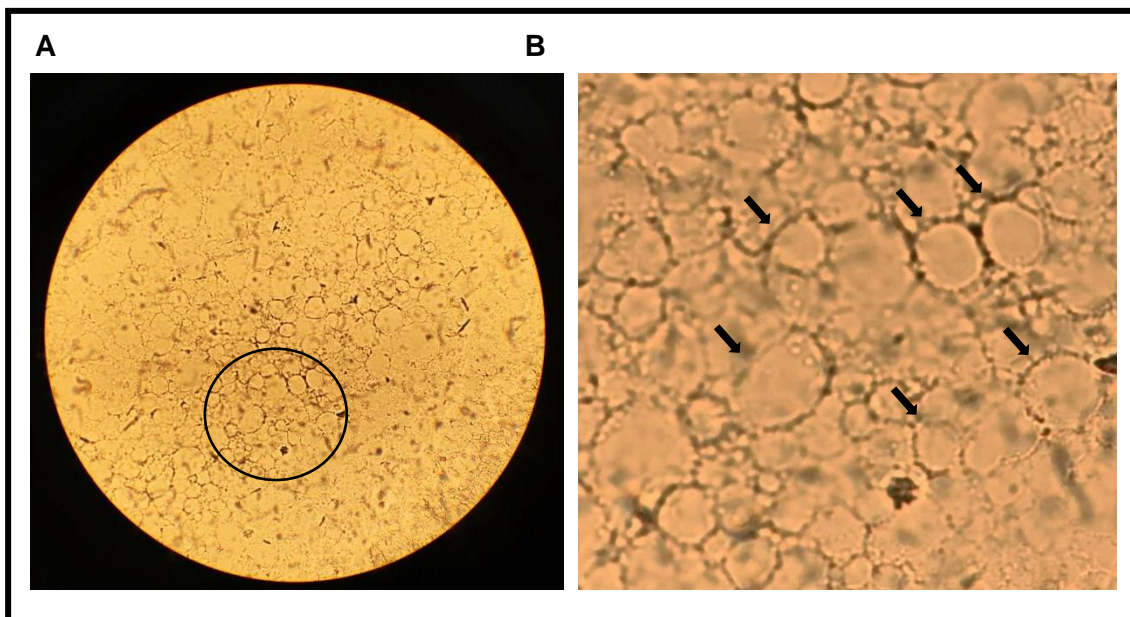
Tras el análisis de todos los resultados, la materia prima seleccionada para llevar a cabo el resto del estudio fueron los cacahuetes tostados 2, procedentes de EE. UU.

## CARACTERÍSTICAS DE LA FUENTE SELECCIONADA

Las siguientes figuras muestran de forma detallada el aspecto macroscópico (Figura 35) y microscópico (Figura 36) que presentó el extracto elegido, para seguir con el estudio (cacaahuets tostados 2) durante su procesamiento y posterior diferenciación en ambas fracciones.



**Figura 35.** Una foto de los cuerpos oleosos del cacahuete que, purificados, flotan en la parte superior y forman una capa después de la centrifugación.



**Figura 36.** Microscopía de luz de los cuerpos oleosos aislados de los cacahuets. (A) 40x; (B) 120x.

## EXTRACTO ALERGÉNICO: FRACCIÓN HIDROSOLUBLE

Entre las propiedades físico-químicas que se analizaron se encuentran la concentración de proteína, la solubilidad y el pH (Tabla 26). La humedad se determinó para asegurar una correcta estabilización por liofilización y, por tanto, un correcto secado de la muestra. Por esta razón, el límite permitido para la humedad relativa se estableció en  $\leq 10\%$ .

Así mismo, se calculó el rendimiento del proceso, expresado como porcentaje, que indica los gramos de sustancia liofilizada por cada 100 gramos de materia prima utilizada.

**Tabla 26**

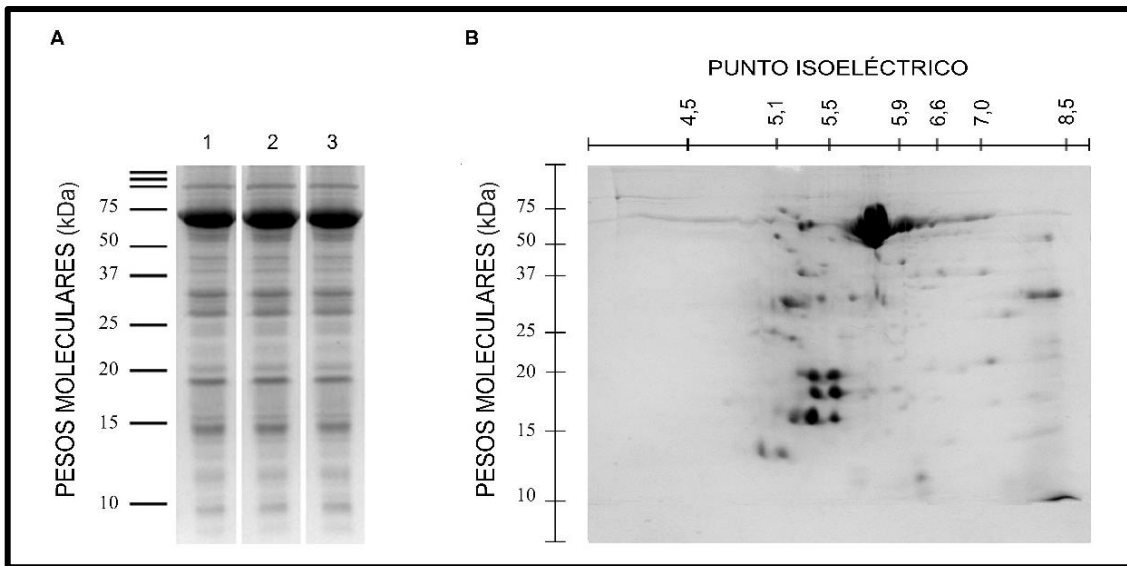
*Propiedades físico-químicas de la fracción hidrosoluble.*

	<b>Resultado</b>
<b>Concentración de proteína</b>	406,79 mg/g
<b>Humedad</b>	5,81%
<b>Solubilidad</b>	Fácilmente soluble
<b>pH</b>	8,65
<b>Rendimiento</b>	4,35%

## SDS-PAGE y 2D-PAGE

Para la caracterización de la fracción hidrosoluble se realizó una electroforesis en una y dos dimensiones con tinción azul de Coomassie, tal y como muestra la Figura 37.

Se pueden observar las proteínas separadas por su peso molecular y su punto isoeléctrico. Ambos perfiles antigénicos presentaron proteínas compatibles con lo descrito en la base de datos de la IUIS: Ara h 1 (64 kDa), Ara h 2 (17 kDa), Ara h 3 (60 kDa), Ara h 5 (15 kDa), Ara h 6 (15 kDa), Ara h 7 (15 kDa), Ara h 8 (17 kDa), Ara h 9 (9,8 kDa), Ara h 12 (8 kDa), Ara h 13 (9 kDa), Ara h 16 (8,5 kDa) y Ara h 17 (11 kDa).

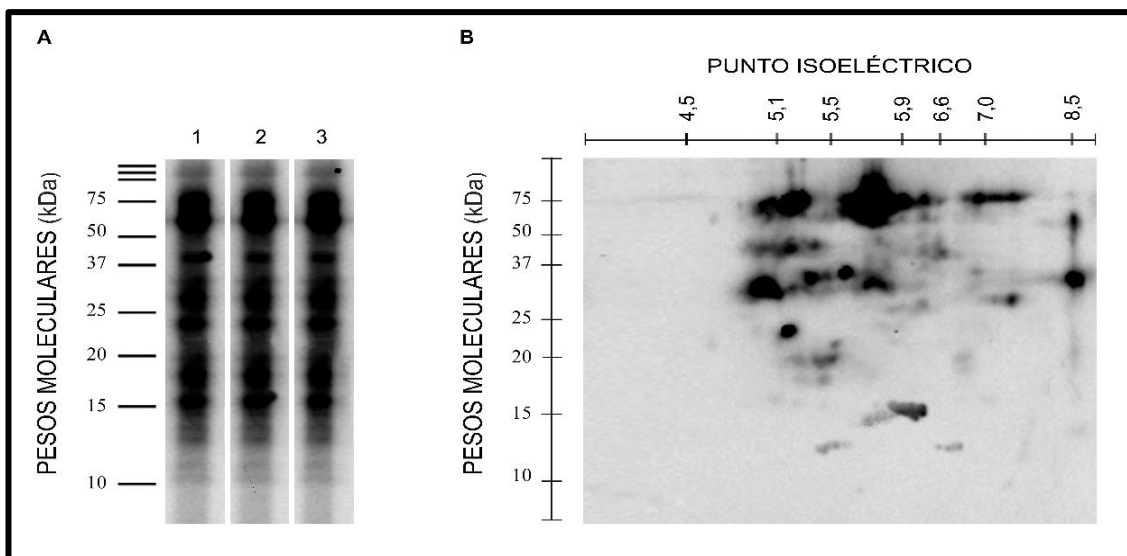


**Figura 37.** Perfil proteico de la fracción hidrosoluble. (A) SDS-PAGE y (B) 2D-PAGE.

### Western blot 1D y 2D con *pool* de sueros

El perfil alérgico de la fracción hidrosoluble se estudió mediante Western blot en una y dos dimensiones. Se utilizó el mismo *pool* de sueros de pacientes alérgicos al cacahuete, que presentaban un elevado título de IgE específica, y que se utilizó en la comparativa de diferentes materias primas previamente (ver página 133).

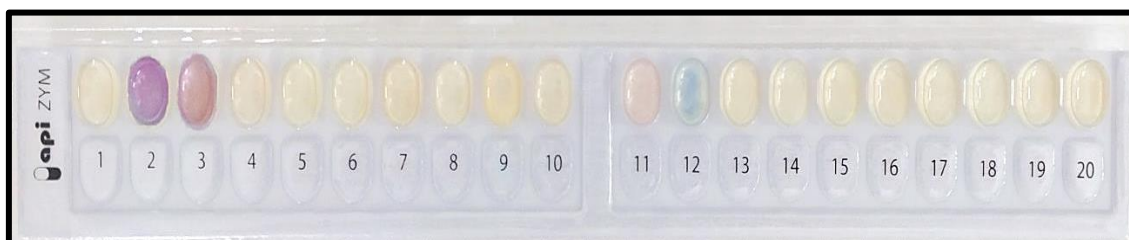
Se puede observar un amplio reconocimiento en la región comprendida entre los 15 y los 75 kDa (Figura 38) y una mayor fijación de IgE en 60-70 kDa, compatible con el alérgeno Ara h 1 (64 kDa).



**Figura 38.** Antigenograma de la fracción hidrosoluble. (A) 1 dimensión y (B) 2 dimensiones.

## Actividad enzimática

En la Figura 39 se pueden observar los resultados que se obtuvieron con las tiras apiZYM, siendo positivo para la actividad fosfatasa alcalina y la esterasa (C4), y ligeramente positivo para la fosfatasa acida y la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.



**Figura 39.** Actividad enzimática fracción hidrosoluble.

## EXTRACTO ALERGÉNICO: FRACCIÓN LIPOSOLUBLE

Se analizaron una serie de propiedades físico-químicas de la fracción liposoluble de la fuente alergénica elegida (Tabla 27) siguiendo el mismo protocolo que para la fracción hidrosoluble (ver página 136).

**Tabla 27**

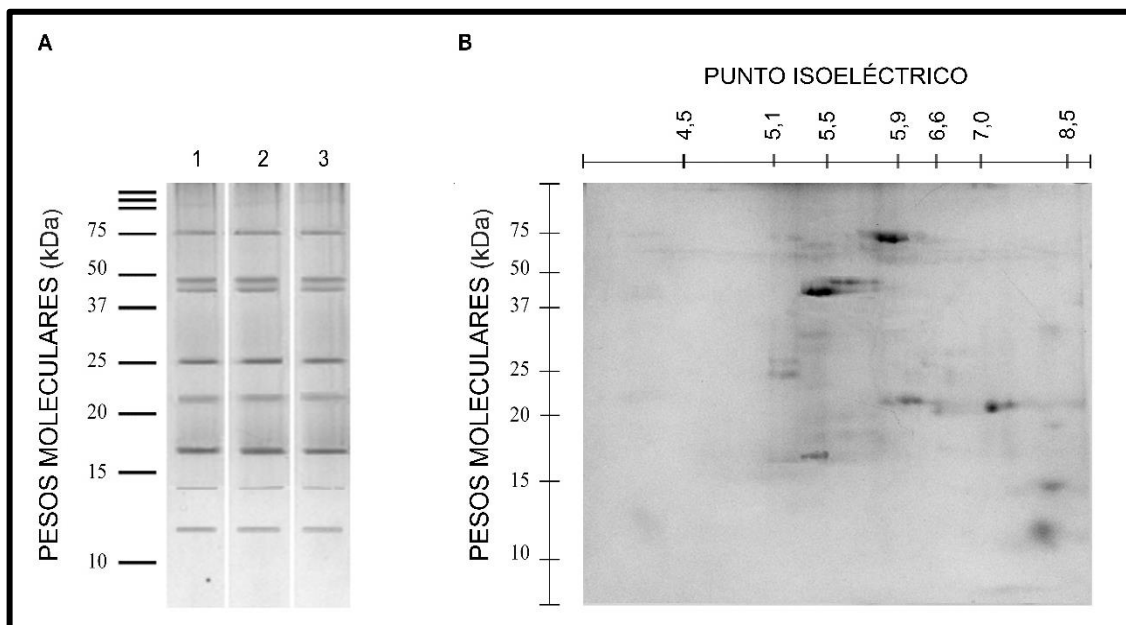
*Propiedades físico-químicas de la fracción liposoluble.*

	<b>Resultado</b>
<b>Concentración de proteína</b>	18,03 mg/g
<b>Humedad</b>	2,19%
<b>Solubilidad</b>	Fácilmente soluble
<b>pH</b>	8,38
<b>Rendimiento</b>	6,98%

## SDS-PAGE y 2D-PAGE

Para la caracterización de la fracción liposoluble se realizó una electroforesis en una y dos dimensiones con tinción azul de Coomassie, tal y como muestra la Figura 40, del mismo modo que se realizó para la fracción hidrosoluble.

Se pueden observar las proteínas separadas por su peso molecular y su punto isoeléctrico. Ambos perfiles antigénicos presentaron proteínas compatibles con lo descrito en la base de datos de la IUIS: Ara h 10 (16 kDa), Ara h 11 (14 kDa), Ara h 14 (17,5 kDa) y Ara h 15 (17 kDa).



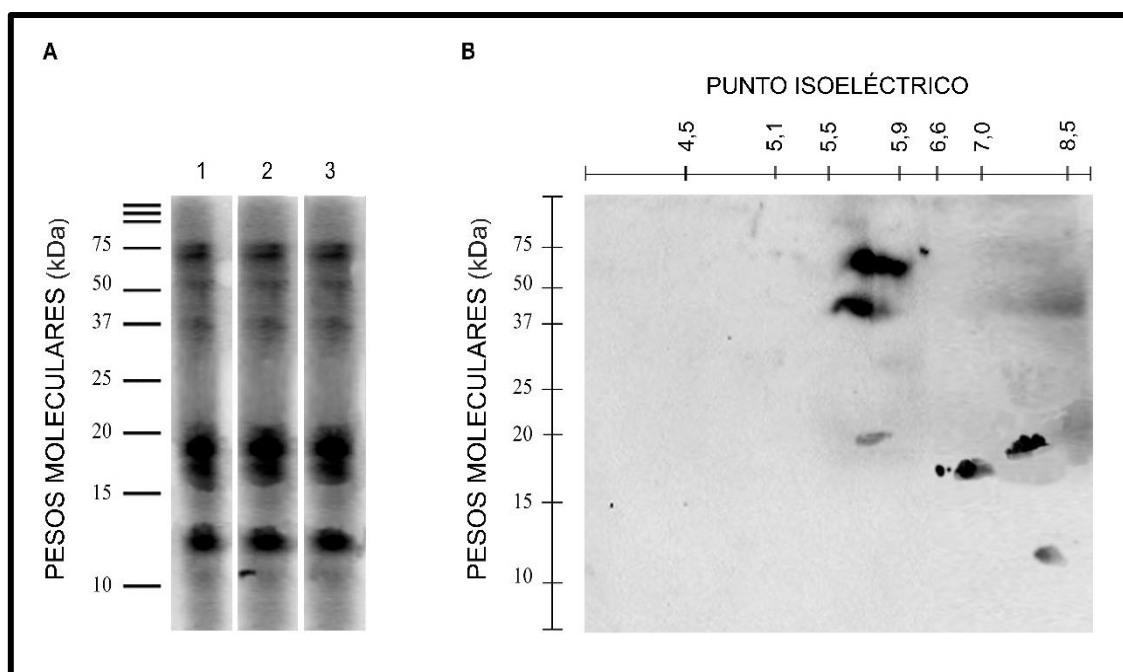
**Figura 40.** Perfil proteico de la fracción liposoluble. (A) SDS-PAGE y (B) 2D-PAGE.

## Western blot 1D y 2D con *pool* de sueros

El perfil alergénico de la fracción liposoluble se estudió mediante Western blot en una y dos dimensiones. Se utilizó el mismo *pool* de sueros de pacientes alérgicos al cacahuete, que presentaban un elevado título de IgE específica, y que se utilizó en la fracción hidrosoluble.

Se puede observar un fuerte reconocimiento en la región correspondiente a los pesos moleculares comprendidos entre 40 y 60 kDa (Figura 41) correspondientes a proteínas no descritas alergénicamente hablando. En el entorno de los 15-20 kDa se puede observar otro fuerte reconocimiento, esta vez, compatible con los alérgenos Ara h 10 (16 kDa), Ara h 14 (17,5 kDa) y Ara h 15 (17 kDa).

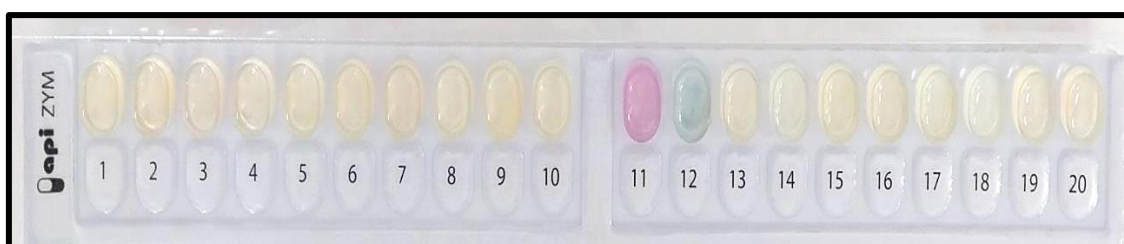




**Figura 41.** Antigenograma de la fracción liposoluble. (A) 1 dimensión y (B) 2 dimensiones.

## Actividad enzimática

En la Figura 42 se pueden observar los resultados que se obtuvieron con las tiras apiZYM, siendo positivo para la actividad fosfatasa ácida y ligeramente positivo para la la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.



**Figura 42.** Actividad enzimática fracción liposoluble.

## **ANÁLISIS DE LA PRUEBA CUTÁNEA (PRICK TEST)**

Cumpliendo con otro de los objetivos, se procedió a la formulación de las proteínas obtenidas en cada una de las fracciones estudiadas (hidrosoluble y liposoluble) para su posterior aplicación diagnóstica *in vivo* mediante el uso de *prick test*.

### **PRICK TEST: fracción hidrosoluble**

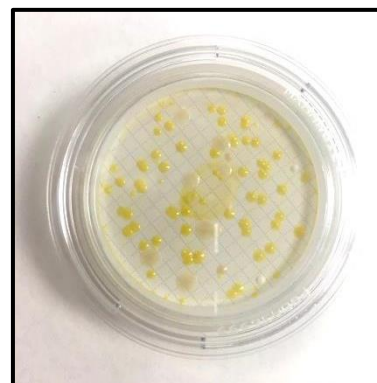
Entre las características físico-químicas y microbiológicas que se analizaron para el control de calidad del *prick test*: fracción hidrosoluble, se encuentran la concentración de proteína, la esterilidad, endotoxinas bacterianas, glicerol, pH, fenol y la carga microbiana en proceso, tal y como se muestra en la Tabla 28.

**Tabla 28**

*Características físico-químicas y microbiológicas del diagnóstico para prick test de la fracción hidrosoluble.*

	<b>Resultado</b>
<b>Concentración de proteína</b>	0,533 mg/mL
<b>Esterilidad</b>	0 UFC
<b>Endotoxinas bacterianas</b>	<500 UE/mL
<b>Glicerol</b>	471,92 mg/g
<b>pH</b>	6,8
<b>Fenol</b>	0,8 g/L

**Carga microbiana en proceso**



4980 UFC

**PRICK TEST: fracción liposoluble**

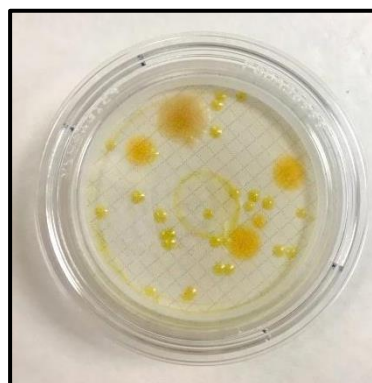
Se analizaron una serie de características físico-químicas y microbiológicas para el control de calidad del *prick test*: fracción liposoluble (Tabla 29) siguiendo el mismo protocolo que para la fracción hidrosoluble (ver página 141).

**Tabla 29**

*Características físico-químicas y microbiológicas del diagnóstico para prick test de la fracción liposoluble.*

	<b>Resultado</b>
<b>Concentración de proteína</b>	0,471 mg/mL
<b>Esterilidad</b>	0 UFC
<b>Endotoxinas bacterianas</b>	<500 UE/mL
<b>Glicerol</b>	476,84 mg/g
<b>pH</b>	6,8
<b>Fenol</b>	0,8 g/L

**Carga microbiana en proceso**



1980 UFC

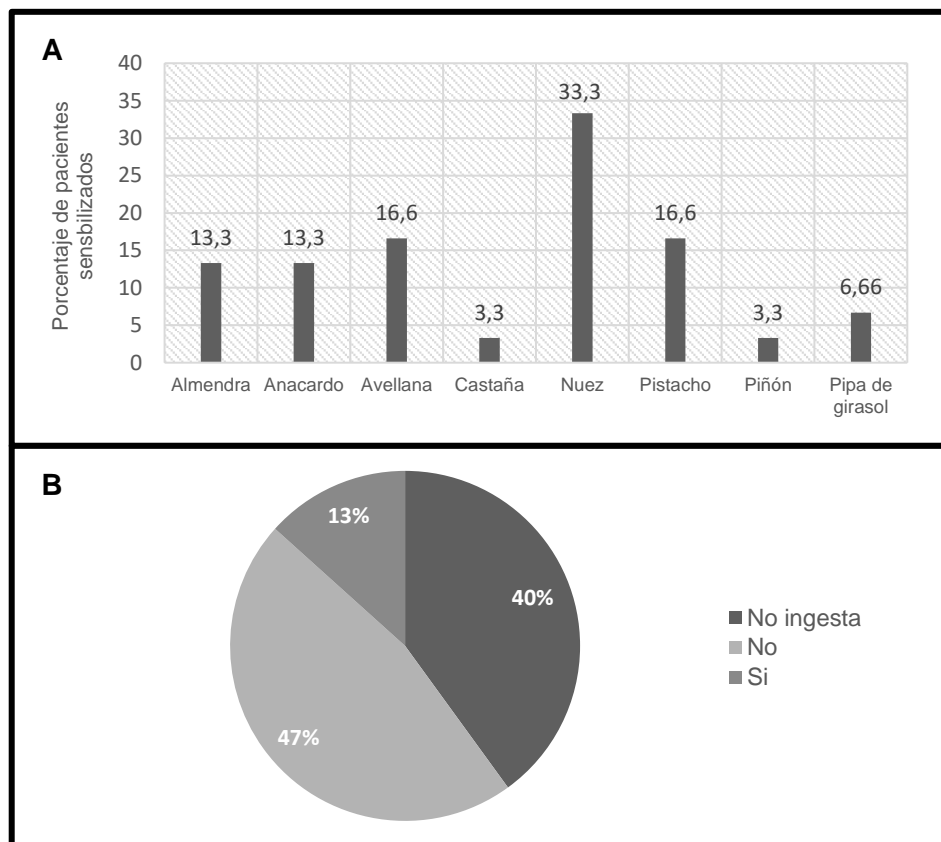
## APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR FRACCIONES DEL CACAHUETE

### Características de los pacientes

Para completar el último de los objetivos principales se seleccionaron de forma prospectiva 30 pacientes diagnosticados con alergia al cacahuete. Las características demográficas y clínicas de dichos pacientes se muestran en la Tabla 30.

El rango de edad fue de 204 meses (17 años), siendo el más pequeño de 24 meses (2 años) y el más mayor de 228 meses (19 años). La media de edad fue de 77,33 meses mientras que la mediana fue de 60 meses. El 70% de la muestra fueron varones.

Además del cacahuete, algunos pacientes presentaban sensibilización a otros frutos secos. El 36,66% no presentaron otras sensibilizaciones, mientras que el resto presentó diferentes patrones, siendo la nuez la más prevalente tal y como se muestra en la Figura 43 - A. El 47% de los pacientes no toleraba el consumo de cacahuetes, mientras que el 40% no los consumía (Figura 43 - B).



**Figura 43.** (A) Histograma de sensibilización de los pacientes a otros frutos secos. (B) Gráfico circular de tolerancia de los pacientes a los cacahuetes.

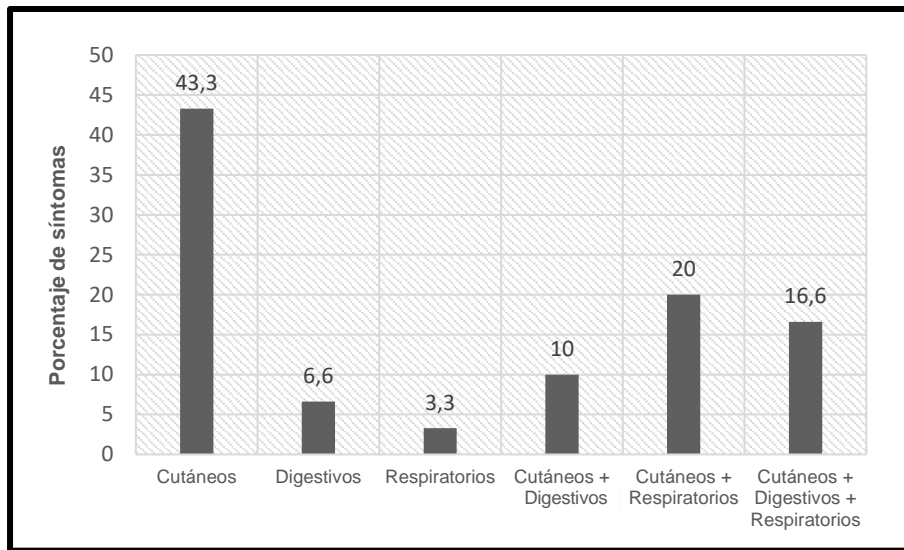
Tabla 30

Características de los pacientes.

Paciente	Edad	Sexo	Síntomas	Otros frutos secos	Síntomas tras la ingesta	Motivo de la reacción	Gravedad	Tolerancia
1	168	M	A/D/R	AV/N	C/D	I	1	No ingesta
2	120	F	A	P	C/D/R	I	4	No
3	96	F	D	A/AN/AV/C/N/P/PÑ/PP	C	C	4	No
4	180	M	A/D/R	N/P	C	I	2	No ingesta
5	48	M	A	AV/N	C	I	1	No ingesta
6	36	M	-	AN/AV	C	C	1	No
7	24	F	D	AV	C	I	1	No ingesta
8	228	F	A/D/R	AN/P	C/R	C/I/IH	4	No ingesta
9	36	M	-	-	C	I	1	No
10	24	M	A/D	A/N	C/R	I	1	No ingesta
11	24	M	A/D	P	C/D	I	1	Si
12	108	M	R	-	C/R	I	5	No
13	24	M	D	-	C/R	C	2	No
14	72	F	-	A	C	I	2	No
15	48	F	D	-	C	C	4	No
16	48	M	A/D	-	C	C	1	No ingesta
17	36	M	-	-	R	I	3	No
18	96	M	A	PP	D	I	3	No ingesta
19	96	M	A/D	-	C/D/R	I	1	No
20	35	M	A/R	-	C	I	1	No ingesta
21	96	M	A/D/R	-	D	I	1	No
22	36	F	A/R	-	C/D/R	I	4	No
23	132	M	-	-	C	C	1	No
24	72	M	D/R	N	C/R	C	4	No ingesta
25	192	F	A/R	N	C/R	I	1	No ingesta
26	72	M	A/D/R	N	C/D	I	2	Si
27	29	M	-	N	C/D/R	I	3	No ingesta
28	72	M	A/D/R	AN	C/D/R	I	1	Si
29	48	F	A	N	C	I	2	No
30	24	M	-	A	C	I	1	No ingesta

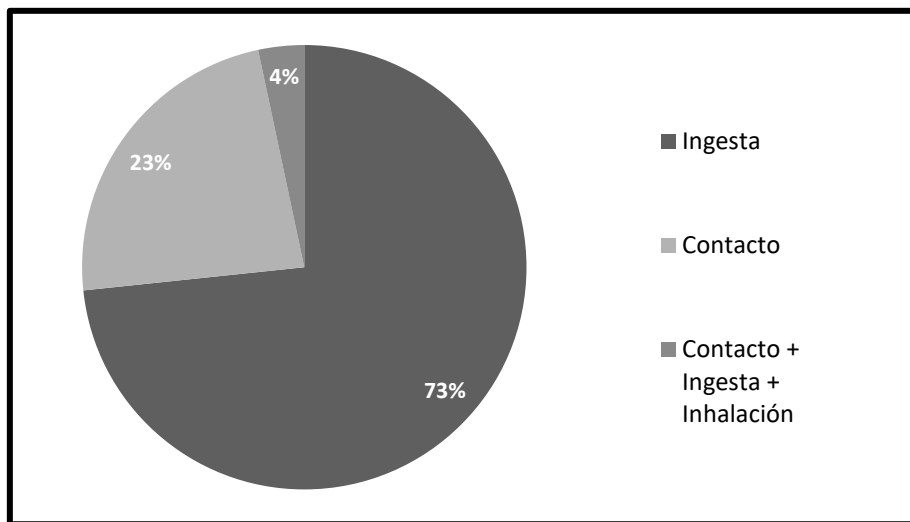
Edad expresada en meses; Sexo, M: masculino, F: femenino; Síntomas, A: asma, D: dermatitis, R: rinoconjuntivitis; Otros frutos secos, A: almendra, AN: anacardo, AV: avellana, C: castaña, N: nuez, P: pistacho, PÑ: piñón, PP: pipa girasol. Síntomas tras la ingesta, C: cutáneos, D: digestivos, R: respiratorios. Motivo de la reacción, C: contacto, I: ingesta, IH: inhalación.

El 90% de los pacientes presentaron síntomas cutáneos tras la ingesta de los cacahuets tal y como se muestra en la Figura 44. El 43,3% como único síntoma y el 46,6% combinados con síntomas digestivos y respiratorios respectivamente.



**Figura 44.** Histograma que muestra los síntomas de los pacientes tras la ingesta de cacahuets.

El 73% de los pacientes presentaron los síntomas tras la ingesta de los cacahuets, el 23% por contacto con los mismos y un 4% por contacto, ingesta e inhalación, tal y como se puede observar en la Figura 45.



**Figura 45.** Gráfico circular que muestra el motivo de la reacción de los pacientes a los cacahuets.

Así mismo, se seleccionaron 10 sujetos sanos, como grupo control, que previamente habían consumido cacahuets sin reacciones adversas, con *prick test* negativos y niveles de IgE específicos negativos (Tabla 31).

**Tabla 31**

*Características de los sujetos del grupo control.*

Paciente	Edad	Sexo	Prick Histamina	Prick Fr. Hidrosoluble		Prick Fr. Liposoluble		P.O.C	IgE Total	slgE Fr. Hidrosoluble	slgE Fr. Liposoluble
			(mm <sup>2</sup> )	Pápula (mm <sup>2</sup> )	Ratio	Pápula (mm <sup>2</sup> )	Ratio			kU/L	kU/L
1*	220	M	13,30	1,03	0,1	0,17	0,0	-	0,64	0,02	0,06
2*	185	M	8,34	1,05	0,1	2,13	0,3	-	0,97	0,04	0,03
3*	180	F	17,90	5,81	0,3	3,53	0,2	-	0,5	0,03	0
4*	214	M	20,23	3,82	0,2	1,72	0,1	-	0,1	0,02	0,03
5*	205	F	10,12	1,33	0,1	0,23	0,0	-	2,1	0	0
6*	221	F	11,73	0,01	0,0	0,83	0,1	-	0,61	0,05	0,03
7*	197	M	18,12	2,05	0,1	1,35	0,1	-	1,13	0	0,04
8*	204	M	28,78	8,03	0,3	7,44	0,3	-	1,05	0,03	0
9*	189	M	12,45	2,95	0,2	1,35	0,1	-	0,53	0	0,03
10*	217	F	26,06	6,11	0,2	3,14	0,1	-	2,25	0	0,04

Edad expresada en meses; Sexo, M: masculino, F: femenino; Prick test expresados en milímetros cuadrados; P.O.C: provocación oral controlada; IgE expresada en kU/L.

## DIAGNÓSTICO *IN VIVO*: PRICK TEST Y PROVOCACIÓN ORAL

Los *prick test* de las fracciones hidrosoluble y liposoluble fueron testados en los pacientes, junto con un control positivo de histamina. Las pápulas se midieron en milímetros cuadrados y se consideraron positivas cuando el ratio con la pápula de histamina fue  $\geq 0,5$  (Tabla 32).

A los pacientes se les realizó una provocación oral controlada (P.O.C), salvo en 6 casos, debido a la gravedad de los síntomas presentados o porque los pacientes presentaban tolerancia habitual a los mismos. Se consideraron positivas cuando los pacientes presentaron una sintomatología compatible con la alergia.

**Tabla 32**

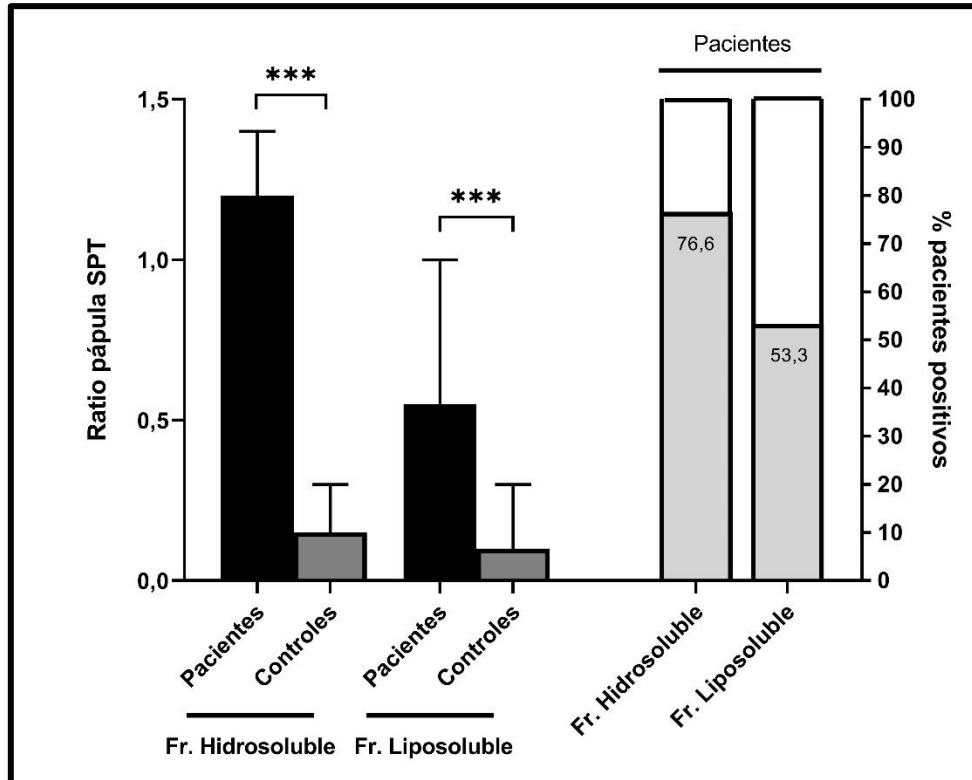
*Resultado de los prick test con histamina, fracción hidrosoluble y fracción liposoluble y resultado de la provocación oral controlada.*

Paciente	Histamina	Fracción Hidrosoluble			Fracción Liposoluble			P.O.C
	(mm <sup>2</sup> )	Pápula (mm <sup>2</sup> )	Ratio		Pápula (mm <sup>2</sup> )	Ratio		
1	17,63	7,51	0,4	-	197,12	11,2	+	+
2	19,11	6,54	0,3	-	47,98	2,5	+	+
3	85,02	99,96	1,2	+	29,19	0,3	-	+
4	46,87	103,07	2,2	+	19,53	0,4	-	+
5	28,91	35,86	1,2	+	10,19	0,4	-	+
6	65,52	84,97	1,3	+	75,13	1,1	+	+
7	34,19	50,57	1,5	+	11,33	0,3	-	-
8	48,18	68,96	1,4	+	96,22	2,0	+	N.I
9	40,48	52,86	1,3	+	21,12	0,5	+	+
10	37,95	51,98	1,4	+	16,34	0,4	-	+
11	78,89	100,26	1,3	+	33,54	0,4	-	T
12	28,56	80,53	2,8	+	40,17	1,4	+	N.I
13	30,01	44,73	1,5	+	18,98	0,6	+	+
14	28,33	18,48	0,7	+	2,14	0,1	-	+
15	25,61	40,06	1,6	+	89,60	3,5	+	+
16	62,58	43,82	0,7	+	12,21	0,2	-	+
17	15,07	23,97	1,6	+	11,84	0,8	+	N.I
18	11,18	10,41	0,9	+	3,12	0,3	-	+
19	18,84	46,17	2,5	+	28,60	1,5	+	+
20	28,25	10,72	0,4	-	18,62	0,7	+	+
21	41,36	29,88	0,7	+	15,57	0,4	-	-
22	27,37	19,50	0,7	+	7,76	0,3	-	+
23	15,92	5,02	0,3	-	13,18	0,8	+	+
24	10,12	43,32	4,3	+	17,02	1,7	+	+
25	16,80	11,85	0,7	+	5,14	0,3	-	-
26	26,76	16,52	0,6	+	9,27	0,3	-	-
27	19,81	57,38	2,9	+	18,82	1,0	+	+
28	30,68	10,13	0,3	-	12,45	0,4	-	T
29	19,61	8,23	0,4	-	20,05	1,0	+	+
30	27,97	10,05	0,4	-	22,52	0,8	+	+

N.I: no indicada por clínica/analítica; T: tolerancia.



Las medianas del ratio para ambas fracciones fueron estadísticamente significativas entre los pacientes y el grupo control (Figura 46), siendo éstas de 1,2 y 0,15 para los pacientes y el grupo control respectivamente en la fracción hidrosoluble, y de 0,55 y 0,1 respectivamente para la fracción liposoluble.



**Figura 46.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana del ratio de la pápula obtenido con la prueba cutánea para la fracción hidrosoluble y liposoluble en los pacientes seleccionados y los controles. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con prueba positiva para cada fracción.

## DIAGNÓSTICO *IN VITRO*: DETERMINACIÓN IgE ESPECÍFICA

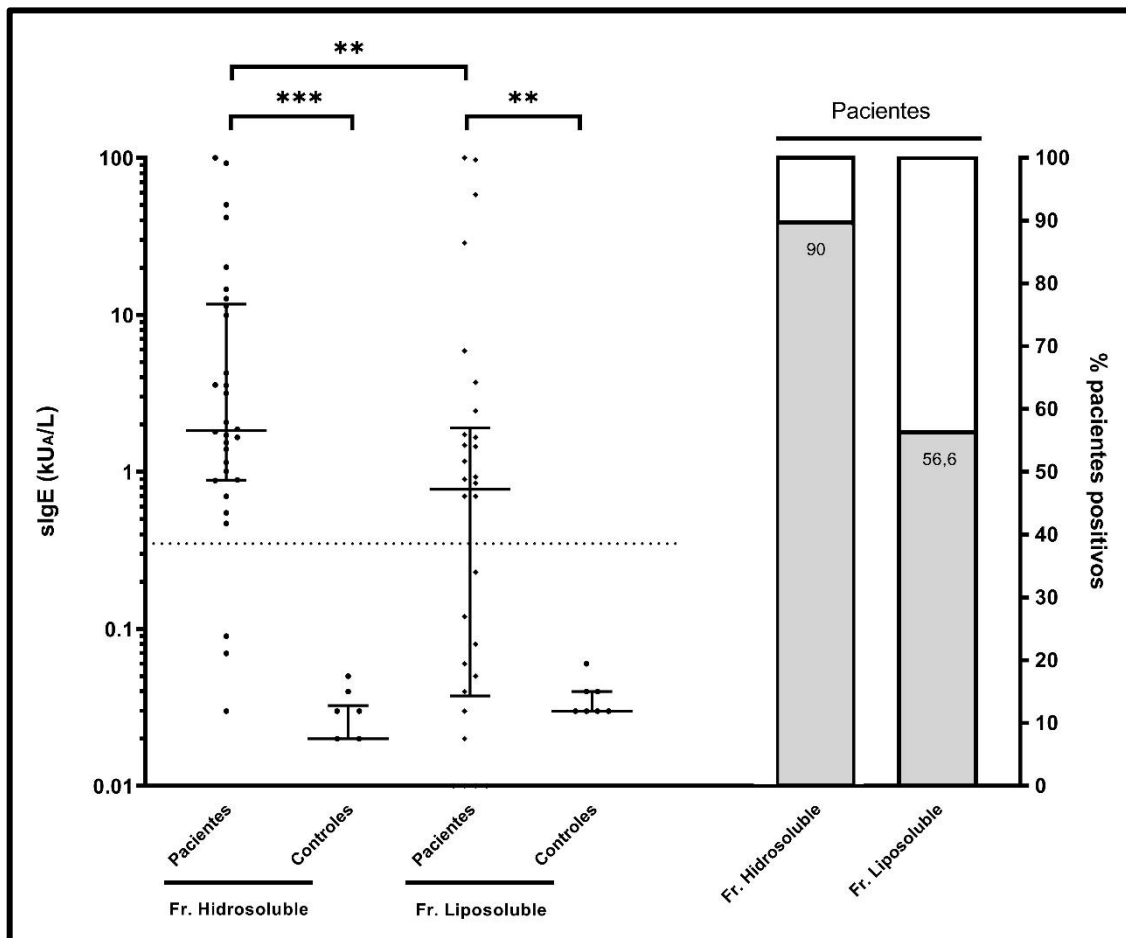
Los niveles de IgE total y específica de los pacientes seleccionados fueron testados frente a las fracciones hidrosoluble y liposoluble y los alérgenos recombinantes Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9, tal y como se muestra en la Tabla 33.

La Figura 47, muestra la mediana de IgE específica para la fracción hidrosoluble que fue superior a la obtenida con la fracción liposoluble, 1,83 kUA/L frente a 0,77 kUA/L respectivamente ( $p=0,008$ ), siendo también mayor la diferencia de la IgE específica ( $p<0,05$ ) de los pacientes frente a los controles, estos últimos con medianas próximas a cero. El límite inferior del InmunoCAP ( $\geq 0,35$  kUA/L) está representado con una línea discontinua.

**Tabla 33**

*Determinación de IgE total (kU/L) y de IgE específica (kUA/L) de los diferentes componentes del cacahuete.*

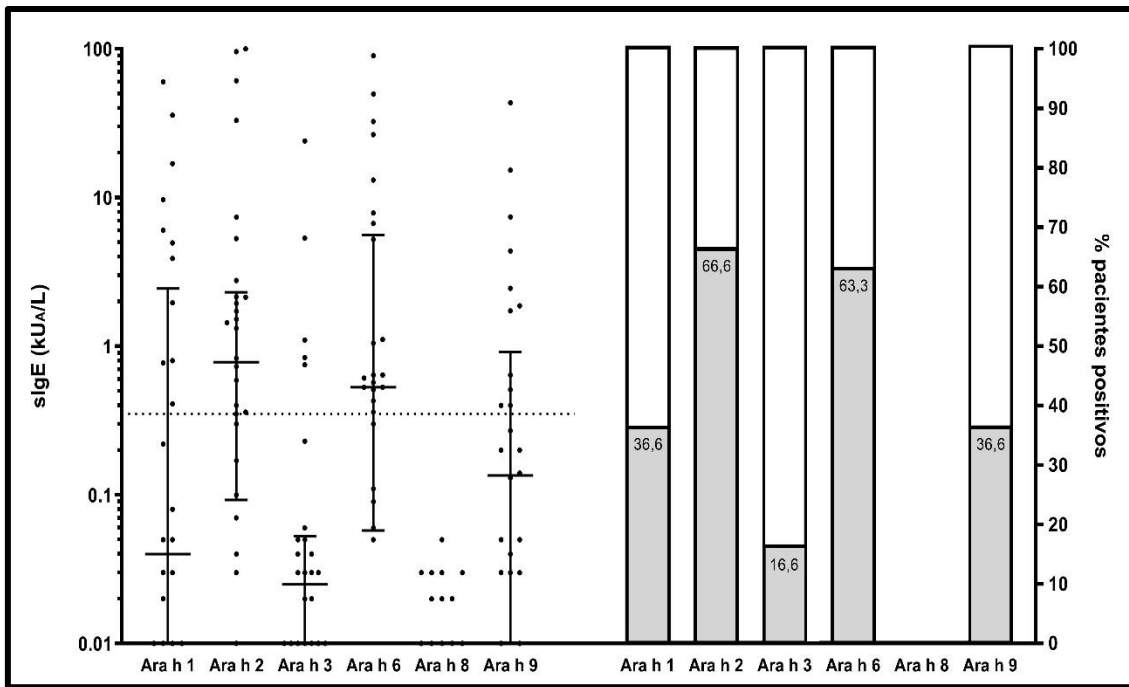
Paciente	IgE Total	sigE Fr. Hidrosoluble	sigE Fr. Liposoluble	sigE Ara h 1	sigE Ara h 2	sigE Ara h 3	sigE Ara h 6	sigE Ara h 8	sigE Ara h 9
1	2,1	0,03	0,7	0,03	0,17	0,06	0,64	0,02	0,2
2	406	1,4	58,4	0,05	2,13	0,03	49,7	0,02	0,03
3	746	50,4	0,9	35,8	33	5,34	32,5	0,03	0,03
4	448	20,2	0,23	0,8	1,72	0,03	13,1	0,02	7,4
5	1,98	1,15	0,01	0	0,03	0	0	0	1,73
6	689	12,7	1,73	0,01	0,83	0,03	0,61	0,05	1,87
7	21,2	0,47	0,12	0	0,35	0,04	0,11	0	0
8	582	3,18	28,7	0,03	1,44	0	1,05	0,03	0,04
9	2187	14,6	2,45	4,95	5,3	1,1	0,53	0	0,51
10	180	0,55	0,06	0	0,1	0,84	0,05	0	0
11	195	11,4	0,08	6,023	2,77	24	5,22	0,01	4,37
12	608	100	100	59,9	100	0	89,9	0	0,01
13	122	1,87	0,03	0,08	1,52	0	0	0	0,27
14	1,82	0,09	0,04	0	0	0,62	0	0	0,4
15	312	3,56	97,2	0,05	2,15	0,04	26,5	0,01	0,2
16	162	2,07	0,02	1,96	0,59	0,01	0,36	0	0,01
17	640	1,8	0,01	0,02	0,36	0,05	0	0,01	0,05
18	507	0,88	1,48	0,41	0,3	0,02	0,64	0	0,03
19	15,2	3,59	0,93	0,01	0,73	0,02	0,43	0	2,45
20	125	0,89	0,7	0,22	0,07	0,03	0,3	0	0
21	59	9,98	3,72	0	7,39	0,01	7,87	0	0
22	55,4	1,66	1,45	0,01	1,94	0,01	0,57	0	0,14
23	2,04	1,72	0,01	0,01	0,04	0,01	0,53	0,01	0,64
24	796	41,8	1,17	16,9	95,8	0,23	0,51	0,03	43,5
25	23,2	1,54	0,85	0	0	0	0	0	0,4
26	291	4,28	0,05	0	0	0	0	0	15,3
27	305	92,7	0	9,67	61,2	0,01	0,09	0	0
28	19,4	0,07	0,01	0	0,01	0,01	0,06	0	0
29	495	0,7	5,9	3,9	1,32	0,75	6,7	0,03	0,13
30	396	1,01	1,66	0,77	0,4	0,05	1,11	0,01	0,05



**Figura 47.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana de la IgE específica de la fracción hidrosoluble y liposoluble en los pacientes seleccionados y los controles. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con IgE específica positiva para cada fracción.

La IgE específica para los diferentes componentes del cacahuete disponibles comercialmente (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) fueron medidos en los 30 pacientes seleccionados para el estudio. Todos ellos (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9) se encuentran en la fracción hidrosoluble. La representación de la mediana de la IgE específica se puede observar en la Figura 48, siendo ésta de 0,04 kUA/L para Ara h 1, 0,78 kUA/L para Ara h 2, 0,02 kUA/L para Ara h 3, 0,53 kUA/L para Ara h 6, 0 kUA/L para Ara h 8 y 0,13 kUA/L para Ara h 9. El límite inferior del InmunoCAP ( $\geq 0,35$  kUA/L) está representado con una línea discontinua.

En la Tabla 34 se pueden observar las diferencias estadísticas entre los componentes, siendo significativas ( $p < 0,05$ ) entre Ara h 1 y Ara h 2, Ara h 1 y Ara h 8, Ara h 2 y Ara h 3, Ara h 2 y Ara h 8, Ara h 2 y Ara h 9, Ara h 3 y Ara h 6, Ara h 6 y Ara h 8, Ara h 8 y Ara h 9.



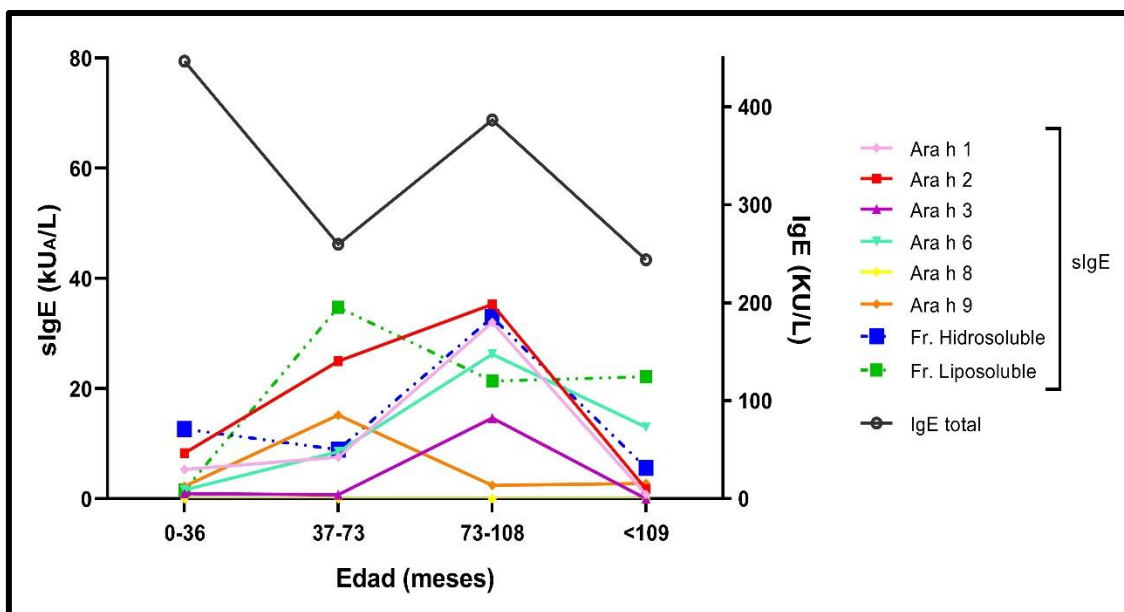
**Figura 48.** En el eje de la izquierda, representación de la mediana de la IgE específica de los distintos componentes analizados del cacahuete en los pacientes seleccionados. En el eje de la derecha, porcentaje de pacientes con IgE específica positiva para cada componente.

**Tabla 34**

*Significación estadística entre las IgE específicas de los distintos componentes.*

	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 3	Ara h 6	Ara h 8	Ara h 9
Ara h 1		*	0,374	0,123	***	0,714
Ara h 2	*		***	0,500	***	*
Ara h 3	0,374	***		***	0,101	0,067
Ara h 6	0,123	0,500	***		***	0,101
Ara h 8	***	***	0,101	***		***
Ara h 9	0,714	*	0,067	0,101	***	

En la Figura 49 se puede observar una representación de la distribución por edades, en meses, de todas las muestras de suero que fueron positivas ( $\geq 0,35$  kU<sub>A</sub>/L) para la IgE específica frente a Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8, Ara h 9, la fracción hidrosoluble y la fracción liposoluble.

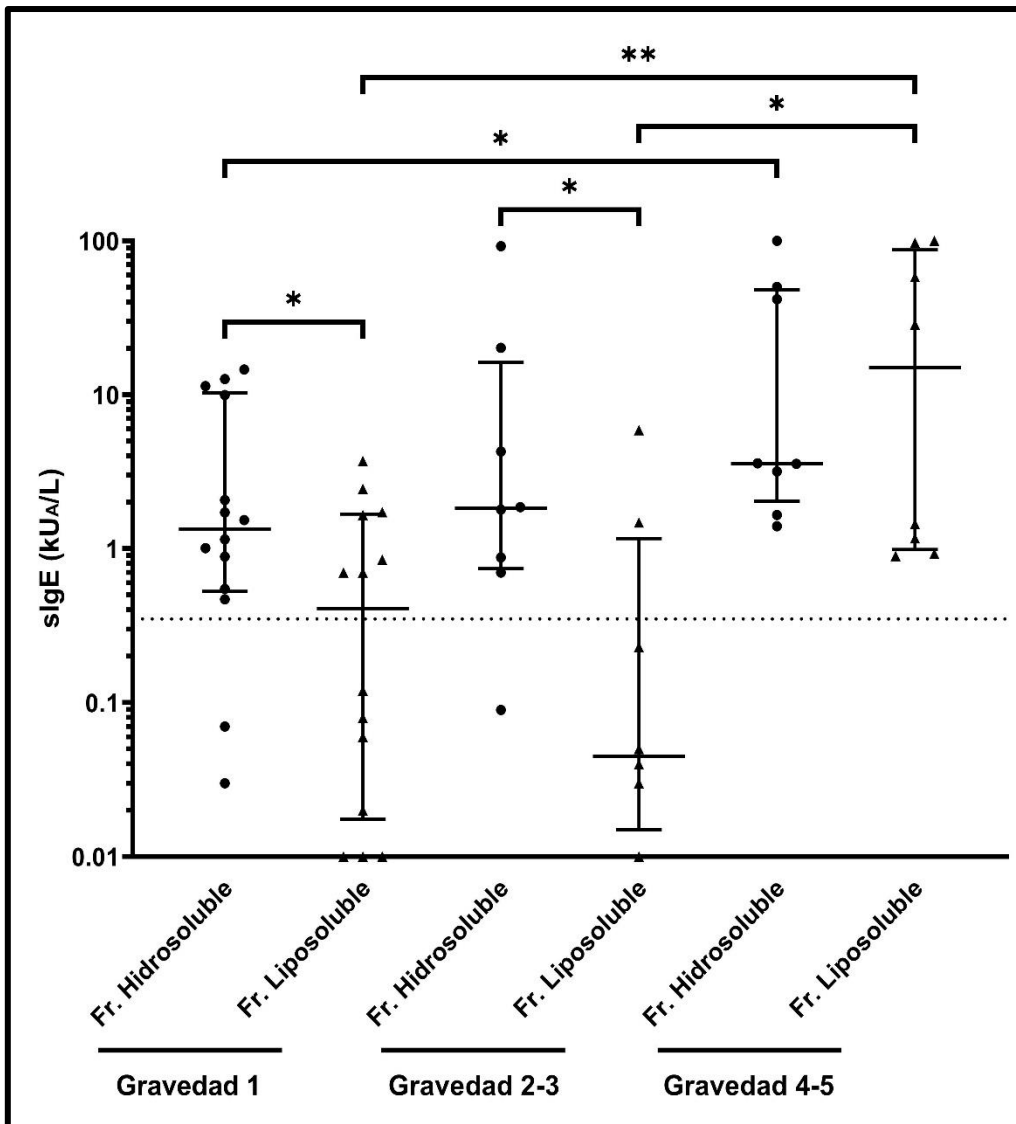


**Figura 49.** En el eje de la izquierda, representación de la sensibilización (kUA/L) por edades frente a los componentes testados Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9, la fracción hidrosoluble y liposoluble. En el eje de la derecha, representación de los niveles de IgE total de dichos pacientes (kU/L).

Se puede observar que Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 y la fracción hidrosoluble llegan a su máximo nivel en el rango de edad comprendido entre los 73 y los 108 meses, mientras que para Ara h 9 y la fracción liposoluble esto ocurre en el rango de 37-73 meses. Así mismo, se observa que en el rango <109 todos los niveles tienden a bajar salvo el de la fracción liposoluble que parece mantenerse.

La Figura 50 muestra la posible relación entre la gravedad de la reacción que habían presentado los pacientes y los niveles de IgE específica para las fracciones hidrosoluble y liposoluble, se agruparon los pacientes en gravedad 1, gravedad 2-3 y gravedad 4-5, con medianas de 1,34 kUA/L, 1,83 kUA/L y 3,57 kUA/L para la fracción hidrosoluble respectivamente, y 0,41 kUA/L, 0,04 kUA/L y 15,07 kUA/L para la fracción liposoluble respectivamente. El límite inferior del InmunoCAP ( $\geq 0,35$  kUA/L) está representado con una línea discontinua.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para las medianas, entre la gravedad 1 y la 4-5 para la fracción hidrosoluble, y entre la gravedad 4-5 con respecto de la 1 y la 2-3 para la fracción liposoluble.

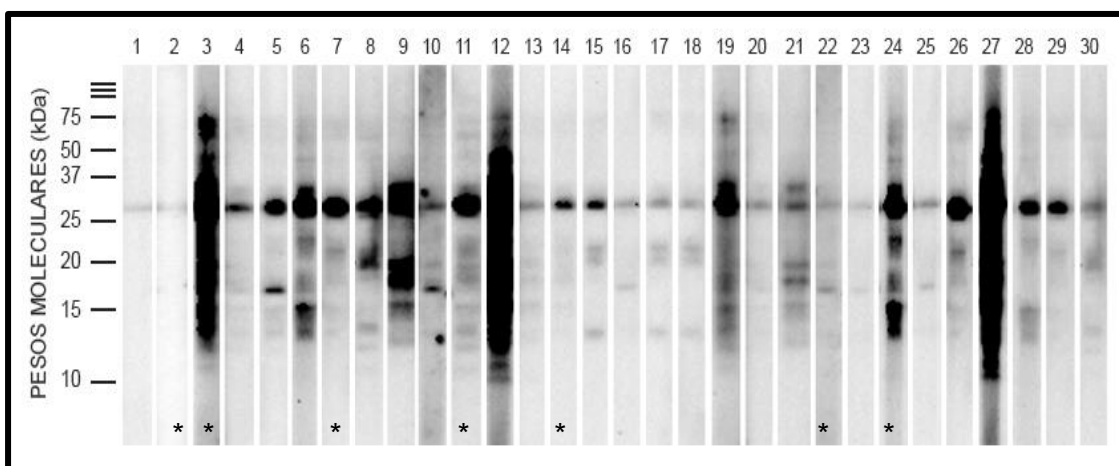


**Figura 50.** Representación de la mediana de los niveles de IgE específica de la fracción hidrosoluble y liposoluble dependiendo de la gravedad de la reacción.

### DIAGNÓSTICO *IN VITRO*: PERFIL DE SENSIBILIZACIÓN

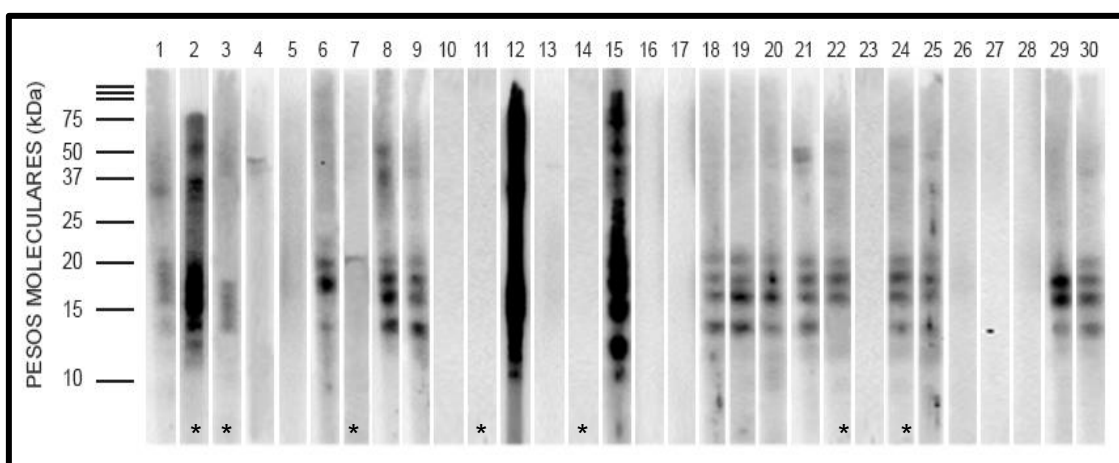
Las Figuras 51 y 52 muestran los perfiles de sensibilización de los diferentes pacientes frente a las fracciones hidrosoluble y liposoluble de los cacahuets respectivamente.

En la fracción hidrosoluble se puede observar como cada paciente tiene un patrón de reconocimiento característico, sin embargo, existe un reconocimiento de una proteína de aproximadamente 27 kDa en la mayoría de los pacientes.



**Figura 51.** Western blot de todos los pacientes frente a la fracción hidrosoluble del cacahuete. Con un asterisco los pacientes que presentaron una reacción grave (4-5).

En la fracción liposoluble se puede observar una serie de cuatro proteínas, comprendidas entre los 13 y los 20 kDa, que son reconocidas por la mayoría de los pacientes que presentan sensibilización frente a esta fracción.



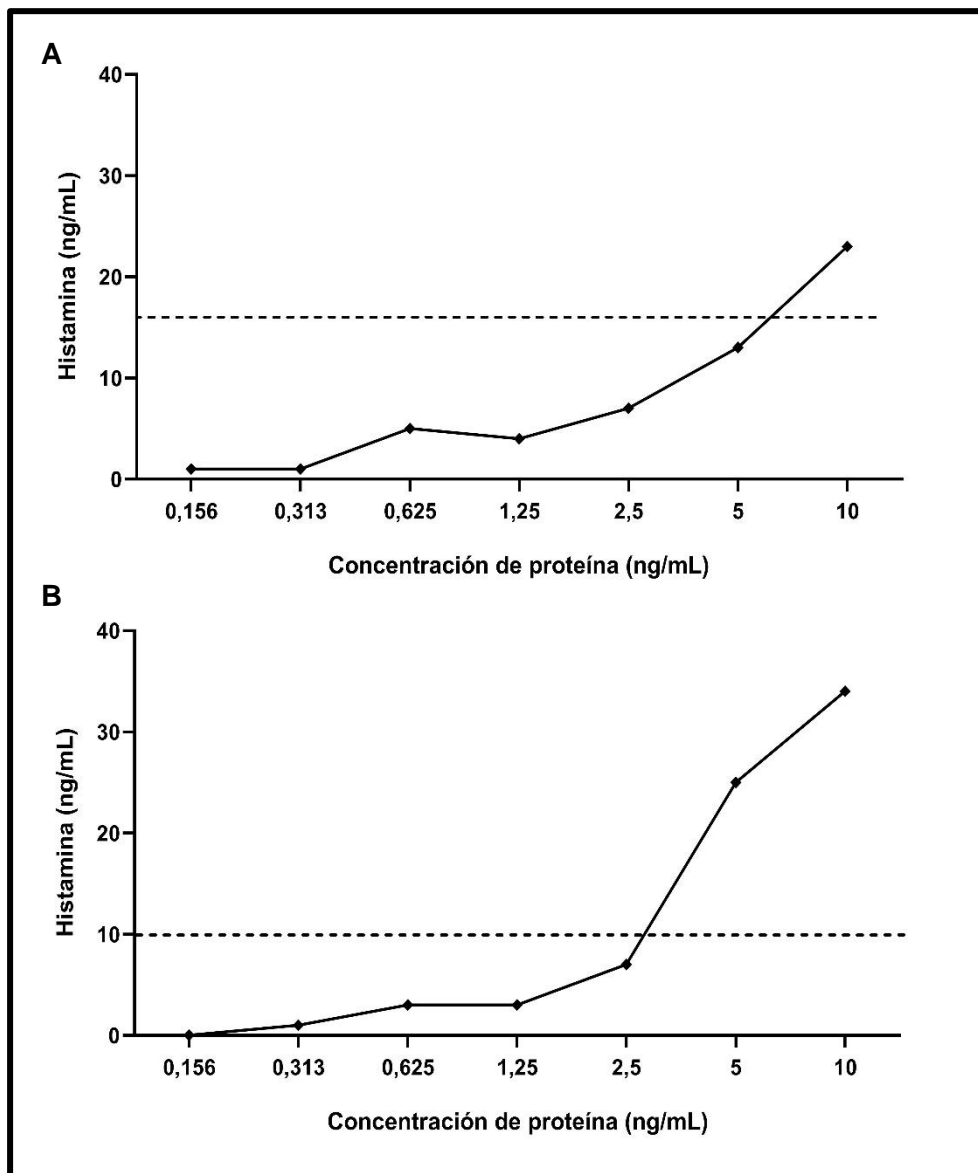
**Figura 52.** Western blot de todos los pacientes frente a la fracción liposoluble del cacahuete. Con un asterisco los pacientes que presentaron una reacción grave (4-5).

Respecto a la gravedad no se puede establecer una proteína como la responsable de las reacciones en ninguna de las dos fracciones y a nivel cualitativo, se puede observar que los pacientes que presentaron una reacción del tipo 4-5 presentan una mayor fijación de IgE que el resto ya sea en la fracción hidrosoluble o liposoluble.

## DIAGNÓSTICO *IN VITRO*: LIBERACIÓN DE HISTAMINA

La concentración de proteína de la fracción hidrosoluble y liposoluble elegida para realizar los ensayos fue la más alta que no produjo una liberación inespecífica de histamina ( $>10$  ng/mL) en una curva dosis-respuesta. Esto se corresponde a la media + 3 desviaciones estándar (SD) de los valores de liberación de histamina medidos en 10 pacientes no alérgicos sin un estímulo específico.

Para ambas fracciones se estableció que la concentración óptima de antígeno era de 2,5 ng/mL de proteína (Figura 53).



**Figura 53.** Inespecificidad de la técnica de liberación de histamina. (A) Fracción hidrosoluble y (B) Fracción liposoluble.



Se realizó la técnica de liberación de histamina pasiva, tanto con la fracción hidrosoluble como con la fracción liposoluble de los cacahuets a 2,5 ng/mL, obteniéndose una liberación específica de histamina, en valores de ng/mL. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 35.

**Tabla 35**

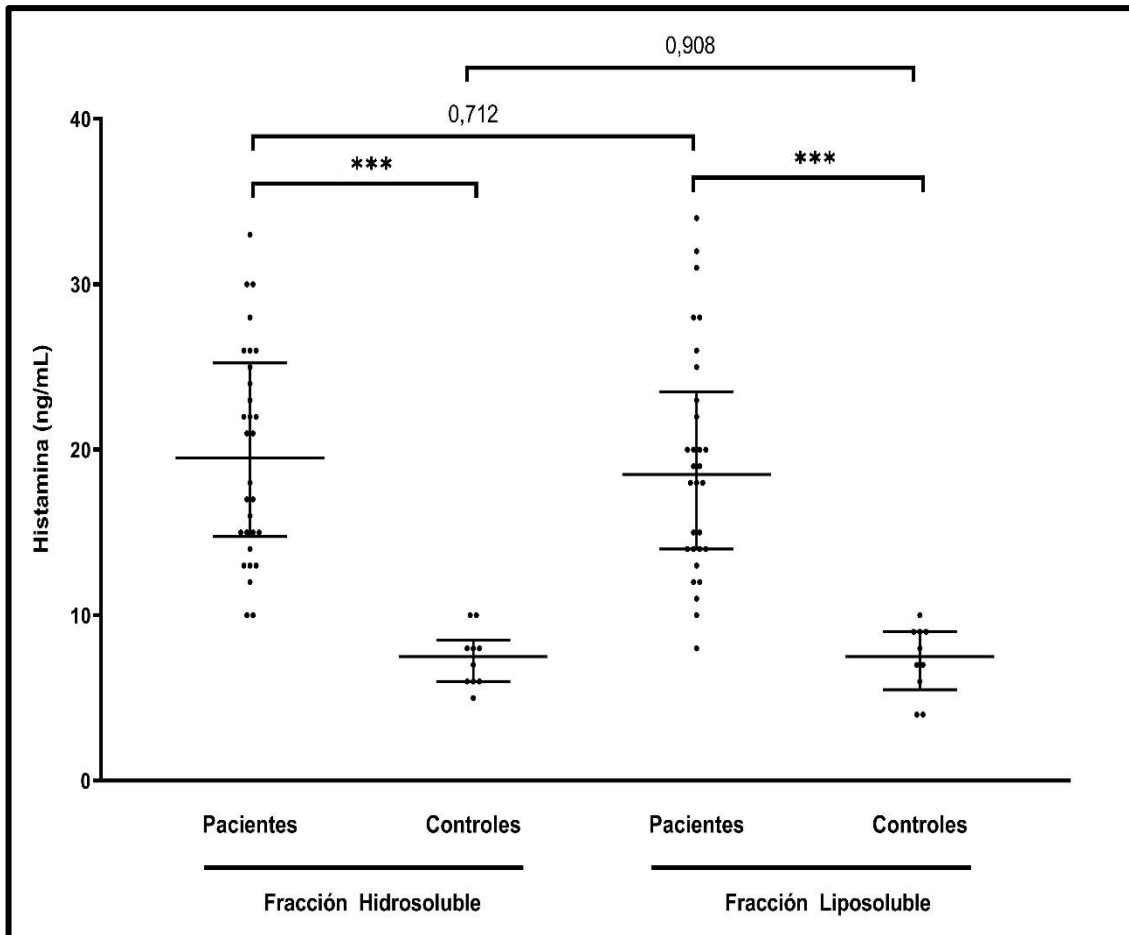
*Liberación de histamina con 2,5 ng/mL de alérgeno.*

Paciente	Fracción Hidrosoluble (ng/mL)	Fracción Liposoluble (ng/mL)	Paciente	Fracción Hidrosoluble (ng/mL)	Fracción Liposoluble (ng/mL)
1	15	23	21	13	12
2	17	28	22	26	28
3	30	19	23	18	18
4	21	12	24	30	20
5	22	14	25	17	11
6	26	22	26	13	15
7	12	14	27	24	10
8	15	32	28	10	8
9	21	13	29	15	26
10	15	14	30	13	25
11	10	18	1*	10	9
12	33	34	2*	7	7
13	22	18	3*	6	9
14	14	20	4*	8	4
15	26	31	5*	6	8
16	23	19	6*	8	9
17	25	20	7*	10	10
18	22	14	8*	6	4
19	28	20	9*	8	6
20	16	15	10*	5	7

Sombreados, los pacientes del grupo control.

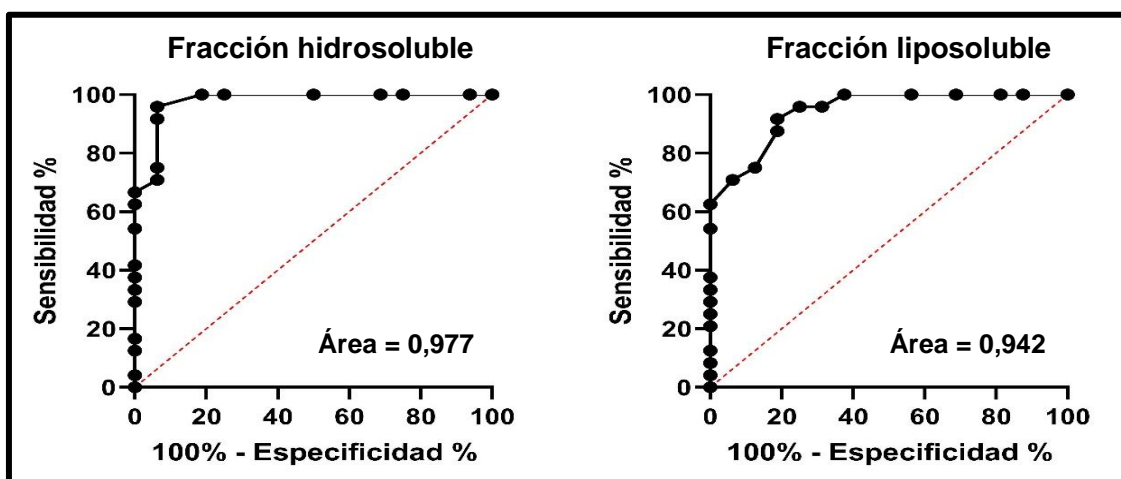
En la Figura 54 se puede observar como con ambas fracciones se obtiene un diagnóstico discriminante entre los pacientes y los controles. En ambos casos, la comparación de la mediana de liberación de histamina de los pacientes es claramente superior a la de los controles, siendo estadísticamente significativa.

La mediana de liberación de histamina con la fracción hidrosoluble es ligeramente superior a la obtenida con la fracción liposoluble, 19,5 frente a 18,5 respectivamente, siendo también mayor la diferencia en la liberación de histamina de los pacientes frente a los controles, con una diferencia de 12 ng/mL en el caso de la fracción hidrosoluble y 11 ng/ml en la fracción liposoluble.



**Figura 54.** Representación de la mediana de la liberación de histamina (ng/mL) de los pacientes y los controles para la fracción hidrosoluble y liposoluble.

Se realizó el análisis de las curvas ROC, para determinar el valor óptimo de punto de corte para la técnica con cada una de las fracciones utilizadas. El resultado se determinó en 13,5 ng/mL de histamina liberada para la fracción hidrosoluble, con una sensibilidad y una especificidad de 95,83% y 93,75% respectivamente, y en 16,5 ng/mL de histamina liberada para la fracción liposoluble, con una sensibilidad y una especificidad de 93,75% y 70,83% respectivamente, tal y como se muestra en la Figura 55 y Tabla 36.



**Figura 55.** Curva ROC para las fracciones hidrosoluble y liposoluble entre los pacientes y el grupo control.

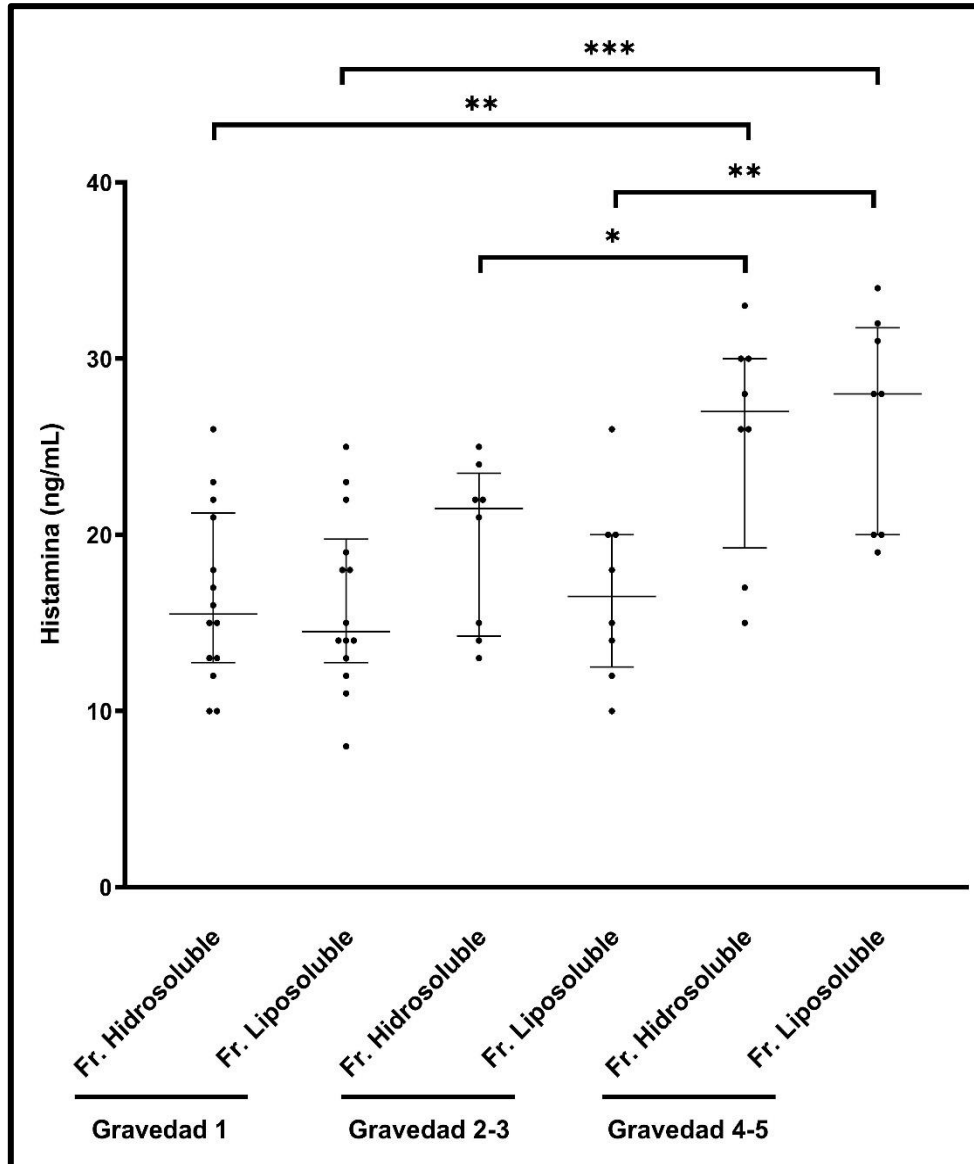
**Tabla 36**

*Datos de las curvas ROC de las fracciones hidrosoluble y liposoluble entre los pacientes y el grupo control.*

Fracción Hidrosoluble			Fracción Liposoluble		
Punto de corte (ng/mL)	Sensibilidad %	Especificidad %	Punto de corte (ng/mL)	Sensibilidad %	Especificidad %
> 5.500	100,0	6,250	> 5.000	100,0	12,50
> 6.500	100,0	25,00	> 6.500	100,0	18,75
> 7.500	100,0	31,25	> 7.500	100,0	31,25
> 9.000	100,0	50,00	> 8.500	100,0	43,75
> 11.00	100,0	75,00	> 9.500	100,0	62,50
> 12.50	100,0	81,25	> 10.50	95,83	68,75
> 13.50	95,83	93,75	> 11.50	95,83	75,00
> 14.50	91,67	93,75	> 12.50	91,67	81,25
> 15.50	75,00	93,75	> 13.50	87,50	81,25
> 16.50	70,83	93,75	> 14.50	75,00	87,50
> 17.50	66,67	100,0	> 16.50	70,83	93,75
> 19.50	62,50	100,0	> 18.50	62,50	100,0
> 21.50	54,17	100,0	> 19.50	54,17	100,0
> 22.50	41,67	100,0	> 21.00	37,50	100,0
> 23.50	37,50	100,0	> 22.50	33,33	100,0
> 24.50	33,33	100,0	> 24.00	29,17	100,0
> 25.50	29,17	100,0	> 25.50	25,00	100,0
> 27.00	16,67	100,0	> 27.00	20,83	100,0
> 29.00	12,50	100,0	> 29.50	12,50	100,0
> 31.50	4,167	100,0	> 31.50	8,333	100,0
			> 33.00	4,167	100,0

Sombreados los puntos de corte elegidos.

Al estudiar la posible relación entre la gravedad de la reacción que habían presentado los pacientes y la liberación de histamina, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) tanto para la fracción hidrosoluble como para la liposoluble, entre la gravedad 1 y 2-3 frente a la 4-5 (Figura 56).



**Figura 56.** Representación de la mediana de liberación de histamina de la fracción hidrosoluble y liposoluble, dependiendo de la gravedad de la reacción.

## RESUMEN PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

En la Tabla 37, se puede observar un resumen con los resultados obtenidos mediante las diferentes pruebas diagnósticas testadas en nuestro grupo de 30 pacientes con sospecha de alergia alimentaria al cacahuete.

**Tabla 37**

*Resumen de los resultados obtenidos con las diferentes pruebas diagnósticas realizadas.*

#	PRICK TEST		IgE ESPECÍFICA		HISTAMINA		P.O.C
	FR. HIDRO	FR. LIPO	FR. HIDRO	FR. LIPO	FR. HIDRO	FR. LIPO	
1	-	+	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	-	+
5	+	-	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+	+	+
11	+	-	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	-	+	+	+
14	+	-	-	-	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	-	+	-	+	+	+
17	+	+	+	-	+	+	+
18	+	-	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+
21	+	-	+	+	-	-	-
22	+	-	+	+	+	+	+
23	-	+	+	-	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+
25	+	-	+	+	+	-	-
26	+	-	+	-	-	+	-
27	+	+	+	-	+	-	+
28	-	-	-	-	-	-	-
29	-	+	+	+	+	+	+
30	-	+	+	+	-	+	+

Sombreados los resultados de los pacientes que finalmente resultaron no presentar alergia a los cacahuetes.

Si sólo se tiene en cuenta la fracción hidrosoluble, el índice de validez es del 72,5% para la prueba cutánea, 82,5% para la IgE específica y 95% para la prueba de liberación de histamina (Tabla 38). Del mismo modo, si sólo se tiene en cuenta la fracción liposoluble, el índice de validez es del 79,49% para la prueba cutánea, 72,5% para la IgE específica y 80% para la prueba de liberación de histamina (Tabla 39).

Finalmente, si se tienen en cuenta ambas fracciones para cada paciente, el índice de validez aumenta al 87,5% para la prueba cutánea, al 85% para la IgE específica y al 95% para la prueba de liberación de histamina (Tabla 40).

**Tabla 38**

*Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción hidrosoluble del cacahuete.*

	Valor	IC (95%)	
<b>PRICK FR. HIDROSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	75,00	55,59	94,41
Especificidad (%)	68,75	42,91	94,59
Índice de validez (%)	72,50	57,41	87,59
<b>slgE FR. HIDROSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	91,67	78,53	100,00
Especificidad (%)	68,75	42,91	94,59
Índice de validez (%)	82,50	69,47	95,53
<b>Histamina FR. HIDROSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	95,83	85,76	100,00
Especificidad (%)	93,75	78,76	100,00
Índice de validez (%)	95,00	87,00	100,00

**Tabla 39**

*Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción liposoluble del cacahuete.*

	Valor	IC (95%)	
<b>PRICK FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	65,22	43,58	86,86
Especificidad (%)	100,00	96,88	100,00
Índice de validez (%)	79,49	65,53	93,44
<b>slgE FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	62,50	41,05	83,95
Especificidad (%)	87,50	68,17	100,00
Índice de validez (%)	72,50	57,41	87,59
<b>Histamina FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	70,83	50,57	91,10
Especificidad (%)	93,75	78,76	100,00
Índice de validez (%)	80,00	66,35	93,65

**Tabla 40**

*Validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas para la fracción hidrosoluble y liposoluble del cacahuete.*

	Valor	IC (95%)	
<b>PRICK FR. HIDROSOLUBLE + FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	100,00	97,92	100,00
Especificidad (%)	68,75	42,91	94,59
Índice de validez (%)	87,50	68,33	99,00
<b>sIgE FR. HIDROSOLUBLE + FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	95,83	85,76	100,00
Especificidad (%)	68,75	42,91	94,59
Índice de validez (%)	85,00	72,68	97,32
<b>Histamina FR. HIDROSOLUBLE + FR. LIPOSOLUBLE</b>			
Sensibilidad (%)	100,00	97,92	100,00
Especificidad (%)	87,00	68,17	100,00
Índice de validez (%)	95,00	87,00	100,00

# DISCUSIÓN







La alergia a alimentos es una reacción de hipersensibilidad tipo I mediada por IgE. En la población pediátrica, los alimentos que más a menudo suelen desencadenar estas reacciones son los huevos, la leche de vaca, los frutos secos y el trigo [Sicherer y Sampson, 2014]. En los adultos, esta lista se completa con pescados y mariscos.

La ingestión o contacto accidental de cacahuets en un individuo sensibilizado a esta fuente podría desencadenar reacciones que pongan en compromiso la vida, de hecho, algunos directorios de anafilaxia por alimentos indican que la ingesta de éstos podría ser la causante del 59% al 63% de los fallecimientos entre el 2001 y el 2007 [Bock, *et al.*, 2007].

La obtención de una historia detallada sobre los síntomas, el tiempo y el tratamiento requerido después de la ingestión de los alimentos en cuestión, es crítico en la evaluación y manejo de la alergia alimentaria [Savage, *et al.*, 2016].

Se recopilaron el mayor número de datos disponibles relacionados con la población seleccionada para el desarrollo de este trabajo. A destacar, el rango de edad (mediana: 60 meses), otras sensibilizaciones a frutos secos, siendo la más importante a la nuez (33,3%), seguida de la avellana y el pistacho (16,6% para ambos), la ingesta de la fuente alergénica como el motivo más frecuente de la reacción que presentaron con un 73,3% y las alteraciones cutáneas como el síntoma más habitual con un 43,3%.

La sensibilización a nuez y avellana probablemente fue debida a que éstas, junto con el cacahuete, son los frutos secos que más alergias causan en la población española [Haroun-Díaz, *et al.*, 2017]. En este estudio, los cacahuets presentaron la ingesta como vía principal de entrada en el organismo, siguiendo el mismo patrón que el resto de los alimentos. En cuanto a las manifestaciones, los síntomas descritos por los pacientes seleccionados fueron en su mayoría cutáneos (urticaria y angioedema) que, a su vez, suelen ser los más frecuentes cuando se habla de alergia a alimentos [Ho, *et al.*, 2014].

La prueba de referencia para el diagnóstico de la alergia alimentaria es la provocación oral controlada. Sin embargo, en la práctica clínica habitual, las pruebas disponibles para diagnosticar la alergia alimentaria incluyen las pruebas cutáneas y las pruebas de determinación de IgE específica.

Tanto unas como otras son a veces sensibles pero no específicas, o viceversa, por lo que la presencia de IgE específica frente a estas fuentes alergénicas ha de estar correlacionada con una historia clínica. Las altas tasas de falsos positivos y negativos frente a estas fuentes ponen de manifiesto el objetivo de este trabajo.

Una de las posibles razones de estas altas tasas de falsos negativos podría deberse al hecho de que algunas de las proteínas, que debían estar contenidas en los extractos alergénicos destinados al diagnóstico, se retiran durante el procesado de estas fuentes [Zuidmeer-Jongejan, *et al.*, 2014].

La capacidad de provocar una respuesta mediada por IgE de la fracción lipídica se estudió en una primera aproximación, eligiendo varios tipos de cacahuete de la especie *Arachis hypogaea*, y separando de éstos aquellas proteínas vinculadas a los cuerpos lipídicos.

Se demostró que los extractos que contenían la fracción liposoluble eran más alergénicos que sus homólogos sin dicha fracción (desengrasados), aplicando la metodología convencional (protocolo 1) de extracción de proteínas para este tipo de fuentes, y una metodología alternativa propuesta (protocolo 2) en la que no se retira la fracción lipídica durante la extracción.

Estas diferencias observadas en los perfiles alergénicos con los diferentes protocolos no fueron visibles en los perfiles antigénicos debido, probablemente, a la diferente sensibilidad de ambas técnicas, pudiendo reconocerse 50-100 ng de proteína en el SDS-PAGE teñido con Coomassie y 1 pg de proteína en el Western blot según el protocolo utilizado, tal y como está descrito en las páginas 130-133.

En este sentido, el grupo de Zuidmeer-Jongejan y colaboradores [Zuidmeer-Jongejan, *et al.*, 2014] describen en el 2014 un comportamiento similar con extracto de avellana. En su estudio purifican la fracción lipídica de este fruto seco y la comparan con un extracto desengrasado y no desengrasado (completo), observando un diferente reconocimiento alergénico basado, principalmente, en las proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos.

El extracto alergénico que se fabrica para diagnóstico de la alergia alimentaria, debería contener todas las proteínas presentes en la fuente natural causante de la reacción. De esta manera, extractos completos sin desengrasar, y que contuvieran la fracción lipídica, serían más eficaces y evitarían un porcentaje de los falsos negativos que se obtienen hoy en día al realizar las pruebas cutáneas mediante *prick test* [Gupta, *et al.*, 2018]

Existe una gran variabilidad en la utilidad clínica de los *prick test* en función de la naturaleza del alimento y de la procedencia del extracto [Vieths, *et al.*, 1998]. Su rentabilidad diagnóstica es buena para alimentos como la leche, el huevo y el pescado [Nørgaard y Bindslev-Jensen, 1992; Caffarelli, *et al.*, 1995; Hansen, *et al.*, 1996; Sampson y Ho, 1997] y más baja para frutas frescas y vegetales [Sampson, 1988].

Para elegir la materia prima con la que finalmente se realizaría todo el estudio se tuvo en cuenta el estado de procesamiento de los cacahuetes (tostados y crudos), ya que éste altera las propiedades alergénicas de las proteínas revelándose tasas más altas de reconocimiento de IgE tras el tueste de los cacahuetes a 170°C de temperatura, tal y como estaba descrito en la bibliografía [Schmitt, *et al.*, 2010].

En un estudio de Maleki y colaboradores [Maleki, *et al.*, 2000] encontraron que los extractos de cacahuete tostado se unían a la IgE específica 90 veces más que los extractos de cacahuete crudo, demostrando que la reacción de Maillard contribuía al efecto observado.

Según Schwager y colaboradores [Schwager, *et al.*, 2017] la unión de la IgE de los pacientes a las oleosinas obtenidas de cacahuetes crudos está notablemente disminuida o es prácticamente indetectable en comparación con las oleosinas obtenidas de cacahuetes tostados del mismo modo que se puede observar en la Figura 33, donde los perfiles alergénicos de los cacahuetes crudos no muestran diferencias entre las fracciones hidro y liposoluble siendo, a su vez, inexistente el reconocimiento por parte de la IgE para la fracción liposoluble de los cacahuetes crudos procedentes de Brasil.

La optimización de un protocolo que permitiese la estabilización final de las proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos fue uno de los puntos clave de este trabajo. A destacar, la utilización de un detergente como el Tween-20 que previno la agregación y mantuvo las oleosinas en solución y el uso de un crioprotector/estabilizador como el manitol en la liofilización de las proteínas.

La estructura antigénica (antigenograma) y alergénica (alergograma) de las fracciones hidrosolubles y liposolubles obtenidas, se evaluaron mediante técnicas electroforéticas cualitativas (SDS-PAGE e inmunotransferencia), así como semicuantitativas (ELISA y DOT blot) mostrándose perfiles antigénicos y alergénicos diferentes entre las muestras evaluadas.

Tras comparar mediante ELISA inhibición la potencia biológica entre las dos fuentes de cacahuets tostados que se estudiaron, se reveló que las Ag50 de las fracciones hidrosoluble y liposoluble de los cacahuets procedentes de EE. UU. eran menores que las de los cacahuets procedentes de China, es decir, con menos cantidad de proteína se obtenía el 50% de inhibición y, por tanto, los primeros fueron los elegidos para realizar el resto del estudio.

En cuanto a la posible relación entre la procedencia de la materia prima a nivel geográfico y la alergenicidad de la misma, no existe nada descrito en la literatura, por lo que el hecho de que los cacahuets procedentes de EE. UU. sean más alergénicos que los procedentes de China no parece ser debido a esta característica.

La fuente finalmente seleccionada (cacahuets tostados 2, procedentes de EE. UU.) presentaba un perfil antigénico compatible con lo descrito en la base de datos de la IUIS:

- Fracción hidrosoluble: Ara h 1 (64 kDa), Ara h 2 (17 kDa), Ara h 3 (60 kDa), Ara h 5 (15 kDa), Ara h 6 (15 kDa), Ara h 7 (15 kDa), Ara h 8 (17 kDa), Ara h 9 (9,8 kDa), Ara h 12 (8 kDa), Ara h 13 (9 kDa), Ara h 16 (8,5 kDa) y Ara h 17 (11 kDa).
- Fracción liposoluble: Ara h 10 (16 kDa), Ara h 11 (14 kDa), Ara h 14 (17,5 kDa) y Ara h 15 (17 kDa).

De entre las diferentes características que se analizaron, cabe destacar la actividad enzimática, que se determinó a través del kit comercial API ZYM, observándose que existe una gran diferencia entre ambas fracciones, teniendo cada una de ellas un patrón característico.

Para complementar todo el trabajo *in vitro* realizado, se formularon las proteínas obtenidas en la fracción liposoluble, para su aplicación diagnóstica *in vivo*, mediante el uso de prueba cutánea, y el posterior acoplamiento de éstas a soportes de diagnóstico *in vitro*, para determinar los niveles de IgE específica y su uso como agente estimulador de la liberación de histamina en los basófilos de los pacientes sensibilizados.

En la bibliografía, todos los estudios relacionados con estas proteínas de los cuerpos lipídicos se basan en su purificación, caracterización y alergenicidad *in vitro* con técnicas como Western blot o test de activación de basófilos, pero no hay nada descrito acerca de su uso *in vivo* en pacientes alérgicos al cacahuete [Schwager, *et al.*, 2015, 2017; Jappe y Schwager, 2017].

Sería importante destacar a los pacientes número 1, 2, 20, 23, 29 y 30, ya que presentaron una prueba cutánea negativa para la fracción hidrosoluble y positiva para la fracción liposoluble, es decir, estos pacientes, a día de hoy, quedarían sin diagnosticar en un primer momento, ya que como se dijo anteriormente, la prueba cutánea es una de las pruebas diagnósticas iniciales que se realiza en la práctica clínica habitual por su facilidad y rapidez de lectura.

Actualmente, no hay ninguna referencia sobre la cuantificación de los niveles de IgE específica de las proteínas contenidas en la fracción liposoluble ya que se requiere que el alérgeno sospechoso esté inmovilizado en un soporte sólido que permita su utilización en este sentido [Larsen, *et al.*, 2018].

De este modo, tal y como está descrito anteriormente (ver página 121) y, de acuerdo al método de Sander [Sander, *et al.*, 2005], se acopló la fracción liposoluble purificada a los CAPs de estreptavidina (Phadia, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) y, se midió la IgE específica de los pacientes frente a estas proteínas, siendo ésta positiva en un 76,6% y 53,3% para la fracción hidrosoluble y liposoluble respectivamente.

Cabe destacar que los pacientes número 2, 8 y 15 presentaron niveles de IgE específica considerablemente superiores para la fracción liposoluble con respecto a la hidrosoluble, siendo éstos de 1,4 kUA/L vs. 58,4 kUA/L; 3,18 kUA/L vs. 28,7 kUA/L; 3,56 kUA/L vs. 97,2 kUA/L respectivamente.

Además, se midió la IgE específica frente a los alérgenos recombinantes Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9, observándose un porcentaje de pacientes positivos de 36,6%, 66,6%, 16,6%, 63,3%, 0% y 36,6% respectivamente.

Ara h 2 está catalogado como el alérgeno con más precisión diagnóstica en comparación con otros componentes del cacahuete [Klemans, *et al.*, 2015] y esto se correlaciona con el porcentaje de pacientes que presentó una IgE específica positiva para el mismo (66,6%).

Sobre el Ara h 6, el segundo componente más prevalente en los pacientes (63,3%), hay muy pocos estudios en la literatura. Sin embargo, comparte un 60% de homología con Ara h 2, siendo ambas proteínas comparables en tamaño molecular, secuencia de aminoácidos y estructura [Chen, *et al.*, 2013].

En el estudio de Kukkonen y colaboradores [Kukkonen, *et al.*, 2015], establecen que una combinación de Ara h 2 y Ara h 6 es capaz de diagnosticar el 100% de las reacciones moderadas-graves de los pacientes incluidos en su estudio. Van der Valk y colaboradores [van der Valk, *et al.*, 2016], establecen Ara h 6 como marcador de gravedad de los síntomas y un alérgeno a tener en cuenta cuando Ara h 1, 2, 3 y 9 son negativos y el grupo de Klemans otorga al Ara h 6 la misma importancia que al Ara h 2 [Klemans, *et al.*, 2014].

Con respecto al alérgeno Ara h 9, se encontró que un 36,6% de los pacientes estaban sensibilizados a este componente. Como miembro de la familia de las LTP, ha sido descrito por tener una gran importancia en regiones mediterráneas, debido a su reactividad cruzada con la LTP de frutas y verduras (Pru p 3 de melocotón, Pru av 3 de cereza, Mal d 3 de manzana y Cor a 8 de avellana) que tienen una alta prevalencia en dichas regiones [Enrique, *et al.*, 2006; Krause, *et al.*, 2009; Lauer, *et al.*, 2009].

El alérgeno Ara h 8 es importante en países del centro de Europa, donde la prevalencia al alérgeno mayor del abedul, Bet v 1 (homólogo de Ara h 8) es muy elevada [Mittag, *et al.*, 2004; Asarnoj, *et al.*, 2012]. La ausencia de sensibilización observada frente a Ara h 8, probablemente fue debida a que este alérgeno no es importante en países del sur de Europa.

Es importante destacar el papel de los patrones de sensibilización alérgicos en el pronóstico de la enfermedad alérgica, en lugar de tener en cuenta únicamente la positividad de IgE frente a los distintos componentes. En el caso particular del cacahuete, por ejemplo, la co-sensibilización a Ara h 2 y Ara h 6 se considera potencialmente más grave que la misma a Ara h 6 y Ara h 9 [Tontini, *et al.*, 2017].

En relación a la distribución que presenta la sensibilización frente a los diferentes componentes teniendo en cuenta la edad de los pacientes, no se encontró el mismo patrón que el descrito por Valcour [Valcour, *et al.*, 2017] para EE. UU., probablemente debido al origen de la población (España vs. EE. UU.), al rango de edad que presentaron los pacientes (0-19 años vs. 0->50 años) y, en este caso, a las diferencias en cuanto a los niveles de IgE total entre los diferentes grupos que se establecieron.

En este momento, existen 8 proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos registradas como alérgenos en la WHO/IUIS, tal y como se menciona en la Tabla 15, pertenecientes a la avellana, al cacahuete (Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 y Ara h 15) y al sésamo. Sin embargo, si la búsqueda se hace extensiva a otras bases de datos de proteínas con criterios de inclusión menos estrictos, y sin ser proteínas necesariamente alergénicas, como puede ser la base de Uniprot (<http://www.uniprot.org>), con el término “oleosin” se pueden encontrar en su parte *Swiss-Prot* (proteínas revisadas) 33 proteínas, y 1.227 en la parte TrEMBL (no revisada, analizada por métodos computacionales).

Esto hace aún mayor la necesidad de investigar este tipo de proteínas que, alérgicamente todavía no están descritas en su mayoría y que, cada vez más, marcan un diagnóstico diferencial en los pacientes alérgicos a ciertos alimentos [Barbarroja-Escudero, *et al.*, 2015, 2018; González Domínguez, *et al.*, 2016; Inácio, *et al.*, 2018].

El grupo de pacientes seleccionados fue de edad pediátrica debido a que éstos presentan más sensibilización a las oleosinas que los adultos [Datema, *et al.*, 2015]. Éstos, reconocieron mediante Western blot una serie de proteínas de entre 13 y 20 kDa, tal y como muestra la Figura 52, que pueden ser compatibles con las ya descritas (Ara h 10 – 16 kDa, Ara h 11 – 14 kDa, Ara h 14 – 17,5 kDa y Ara h 15 – 17 kDa), y otras proteínas de mayor peso molecular que no estarían descritas hasta el momento.

En el estudio de Schwager y colaboradores [Schwager, *et al.*, 2017] se realiza un Western blot con 35 pacientes en el que reconocen Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14 y Ara h 15 y una banda de peso molecular de 26-30 kDa aproximadamente que denominan como “dímeros de oleosinas”. Los resultados obtenidos por Pons y colaboradores (pioneros en el uso de oleosinas purificadas para realizar experimentos de Western blot) revelaron resultados similares observando que las oleosinas tendían a formar dímeros y oligómeros IgE reactivos [Pons, *et al.*, 1998, 2005].

Las oleosinas de diferentes fuentes alergénicas, incluidos los cacahuetes, se han asociado con reacciones adversas graves [Leduc, *et al.*, 2006; Zuidmeer-Jongejan, *et al.*, 2014; Datema, *et al.*, 2015; Jappe y Schwager, 2017; Schwager, *et al.*, 2017]. En este sentido, se observó que los pacientes que presentaron reacciones más graves tenían más IgE específica y mayor liberación de histamina para la fracción liposoluble, aunque la diferencia con la fracción hidrosoluble no fue estadísticamente significativa (Figura 50 y Figura 56).



Así mismo, no se observó ningún patrón característico en la fracción hidrosoluble ni liposoluble a nivel cualitativo en el Western blot que nos permitiera discriminar la gravedad de la reacción (Figuras 51 y 52). Únicamente se reveló una mayor intensidad de fijación de la IgE probablemente debida a la mayor titulación de los sueros de estos pacientes que presentaron reacciones más graves.

Al hablar de gravedad en un contexto general, sin diferenciar por fracciones, se observó que los pacientes que presentaron reacciones más intensas mostraban niveles de IgE específica más elevados.

En cuanto a la técnica de liberación de histamina, se realizó una curva de receptor-operador (ROC) para cada una de las fracciones utilizadas, eligiéndose como punto de corte 13,5 ng/mL de histamina liberada para la fracción hidrosoluble y 16,5 ng/mL de histamina liberada para la fracción liposoluble. Dicha liberación, fue ligeramente superior para la fracción hidrosoluble con respecto de la liposoluble, pero sin diferencias estadísticas significativas.

En cuanto a la gravedad, se observó que, en ambas fracciones, la liberación de histamina fue mucho mayor en los pacientes con reacciones 4-5, con respecto de los que habían presentado reacciones 1 y 2-3, ambas estadísticamente significativas. A nivel de fracciones individuales, la liposoluble presentó una liberación ligeramente superior a la hidrosoluble en los pacientes con reacciones más graves.

No existe un parámetro establecido para evaluar la validez aceptable de un método diagnóstico en todas las situaciones. La validez de un test depende de la patología estudiada y de las condiciones reales en el medio en el que se esté produciendo.

En general, las pruebas para confirmar un diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos [King, *et al.*, 2009]. Con esta premisa, se establecieron como puntos de corte aquellos con lo que se obtuvo al menos un 90% de especificidad.

Para la fracción hidrosoluble se alcanzó un 95,83% de sensibilidad y un 93,75% de especificidad, sin embargo, para la fracción liposoluble, alcanzando un 93,75% de especificidad sólo se llegó al 70,83% de sensibilidad.

Cabe destacar el 100% de especificidad alcanzado por la prueba cutánea de la fracción liposoluble, ya que es la única prueba de todas las testadas que llega a este nivel, siendo capaz de discriminar a todos los individuos sanos de los enfermos.

Los datos de validez y seguridad que muestran las Tablas 38, 39 y 40, ponen de manifiesto que se obtendría un diagnóstico más preciso con extractos completos que no estuvieran desengrasados, ya que es la suma de las dos fracciones la que aumenta el índice de validez de las tres pruebas diagnósticas testadas (prueba cutánea, IgE específica e histamina liberada).

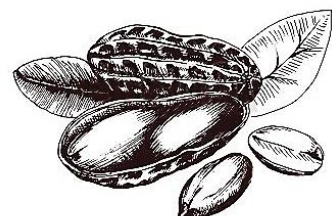
De acuerdo con los resultados obtenidos, pruebas cutáneas muy positivas, niveles de IgE específica y de liberación de histamina muy elevados frente a ambas fracciones del cacahuete, son predictivos de reacciones graves. Por esta razón, el uso combinado de las dos fracciones reduciría las tasas de provocación oral controlada, disminuyendo el riesgo que esta prueba conlleva para los pacientes.

Un diagnóstico preciso es vital, no solamente para asegurar que los pacientes alérgicos con manifestaciones clínicas eviten totalmente la exposición a cacahuete, sino también, para no sobre-diagnosticar y producir una alerta y evitación innecesaria del consumo de cacahuetes por parte de la población.

En el futuro, sería necesario ampliar la muestra de pacientes seleccionados a nivel pediátrico y realizar un estudio de las mismas características con población adulta, para dar robustez y consistencia a los datos obtenidos y demostrar la importancia clínica de las oleosinas en la población general (adultos y niños).



# CONCLUSIONES





1. El aislamiento y la purificación de las proteínas contenidas en los cuerpos lipídicos de los diferentes tipos de cacahuete analizados, se consiguió mediante la utilización de un protocolo adaptado al carácter hidrofóbico que presentan estas proteínas.
2. La estabilización de la fracción lipídica de los cacahuets, permitió estudiar las características fisicoquímicas de las proteínas contenidas en dicha fracción, estableciendo así su importancia en la respuesta alérgica en una población sensibilizada.
3. Las dos fracciones de proteínas obtenidas del cacahuete tostado seleccionado se caracterizaron antigénica y alérgicamente mediante, el uso de técnicas electroforéticas cualitativas como SDS-PAGE y Western blot y, de técnicas semicuantitativas como el ELISA, mostrando perfiles y características diferentes en cada fracción.
4. Las proteínas aisladas de la fracción liposoluble se estabilizaron y formularon para la realización de pruebas cutáneas, diagnosticando a 8 pacientes que presentaron prueba negativa frente a la fracción hidrosoluble y, siendo la única prueba diagnóstica que alcanzó un 100% de especificidad.
5. En los pacientes seleccionados, se determinaron, por un lado, los niveles de IgE específica frente a las fracciones hidro y liposoluble de los cacahuets y, por otro lado, la liberación de histamina frente a dichas fracciones. En ambos casos, los niveles fueron ligeramente superiores para la fracción hidrosoluble.
6. Los pacientes que presentaron reacciones más graves tuvieron, una tasa de IgE específica más alta y una mayor liberación de histamina para la fracción liposoluble, aunque, la diferencia con la fracción hidrosoluble no fue estadísticamente significativa.
7. El índice de validez de todas las pruebas diagnósticas testadas (prueba cutánea, IgE específica e histamina liberada) aumentó cuando se tuvieron en cuenta las dos fracciones del cacahuete.



# BIBLIOGRAFÍA







- Aalberse, J. A., Y. Meijer, N. Derksen, T. Van Der Palen-Merkus, E. Knol, y R. C. Aalberse (2013) «**Moving from peanut extract to peanut components: Towards validation of component-resolved IgE tests**», *Allergy*, 68(6):748-756.
- Aas, K. (1973) «**Biochemical and immunological basis of bronchial asthma**», *Springfield: Charles C. Thomas*, 12(6):269.
- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, y J.S. Pober (2014) ***Cellular and Molecular Immunology***, Elsevier.
- Abell, B. M., M. Hahn, L. A. Holbrook, y M. M. Moloney (2004) «**Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin**», *Plant Journal*, 37(4):461-470.
- Akdis, C. A., M. Akdis, T. Blesken, D. Wymann, S. S. Alkan, U. Müller, y K. Blaser (1996) «**Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro**», *Journal of Clinical Investigation*, 98(7):1676-1683.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wüthrich, y K. Blaser (1998) «**Role of interleukin 10 in specific immunotherapy**», *Journal of Clinical Investigation*, 102(1):98-106.
- Akdis, C. A. (2006) «**Allergy and hypersensitivity. Mechanisms of allergic disease**», *Current Opinion in Immunology*, 18(6):718-726.
- Akdis, C. A. y K. Blaser (2003) «**Histamine in the immune regulation of allergic inflammation**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(1):15-22.
- Akkerdaas, J. H., F. Schocker, S. Vieths, S. Versteeg, L. Zuidmeer, S. L. Hefle, R. C. Aalberse, K. Richter, F. Ferreira, y R. Van Ree (2006) «**Cloning of oleosin, a putative new hazelnut allergen, using a hazelnut cDNA library**», *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(1):18-23.
- Al-Lazikani, B., A. M. Lesk, y C. Chothia (2000) «**Canonical structures for the hypervariable regions of T cell  $\alpha\beta$  receptors**», *Journal of Molecular Biology*, 295(4):979-995.
- Alexander, L. G., R. B. Sessions, A. R. Clarke, A. S. Tatham, P. R. Shewry, y J. A. Napier (2002) «**Characterization and modelling of the hydrophobic domain of a sunflower oleosin**», *Planta*, 214(4):546-551.

- Allen, K. J. y J. J. Koplin (2012) «**The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis**», *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(1):35-50.
- Alonzi, C., P. Campi, F. Gaeta, F. Pineda, y A. Romano (2011) «**Diagnosing IgE-mediated hypersensitivity to sesame by an immediate-reading “contact test” with sesame oil**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(6):1627-1629.
- Alper, C. A., C. E. Larsen, D. P. Dubey, Z. L. Awdeh, D. A. Fici, y E. J. Yunis (2006) «**The haplotype structure of the human major histocompatibility complex**», *Human Immunology*, 67(1-2):73-84.
- Anagnostou, K. y A. Clark (2014) «**Peanut immunotherapy**», *Clinical and Translational Allergy*, 4:30.
- Angelina, A., S. Sirvent, C. Palladino, A. Vereda, J. Cuesta-Herranz, T. Eiwegger, R. Rodríguez, H. Breiteneder, M. Villalba, y O. Palomares (2016) «**The lipid interaction capacity of Sin a 2 and Ara h 1, major mustard and peanut allergens of the cupin superfamily, endorses allergenicity**», *Allergy*, 71(9):1284-1294.
- Arakali, S. R., T. D. Green, y C. Dinakar (2017) «**Prevalence of food allergies in South Asia**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 118(1):16-20.
- Arnheim, N. y E. M. Southern (1977) «**Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men**», *Cell*, 11(2):363-370.
- Asarnoj, A., C. Nilsson, J. Lidholm, S. Glaumann, E. Östblom, G. Hedlin, M. Van Hage, G. Lilja, y M. Wickman (2012) «**Peanut component Ara h 8 sensitization and tolerance to peanut**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(2):468-472.
- Asero, R., B. K. Ballmer-Weber, K. Beyer, A. Conti, R. Dubakiene, M. Fernandez-Rivas, K. Hoffmann-Sommergruber, J. Lidholm, T. Mustakov, J. N. G. Oude Elberink, *et al.* (2007) «**IgE-Mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives**», *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1):135-147.
- Asher, I. y N. Pearce (2014) «**Global burden of asthma among children**», *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 18(11):1269-1278.
- Astwood, J. D., J. N. Leach, y R. L. Fuchs (1996) «**Stability of Food Allergens to Digestion in Vitro**», *Nature Biotechnology*, 14(10):1269-1273.

- Aveskog, M. y L. Hellman (1998) «**Evidence for an early appearance of modern postswitch isotypes in mammalian evolution; cloning of IgE, IgG and IgA from the marsupial *Monodelphis domestica***», *European Journal of Immunology*, (28):2738-2750.
- Ballmer-Weber, B. K., J. Lidholm, M. Fernández-Rivas, S. Seneviratne, K. M. Hanschmann, L. Vogel, P. Bures, P. Fritsche, C. Summers, A. C. Knulst, *et al.* (2015) «**IgE recognition patterns in peanut allergy are age dependent: Perspectives of the EuroPrevall study**», *Allergy*, 70(4):391-407.
- Bar-El Dadon, S., C. Y. Pascual, D. Eshel, P. Teper-Bamnlker, M. D. Paloma Ibáñez, y R. Reifen (2013) «**Vicilin and the basic subunit of legumin are putative chickpea allergens**», *Food Chemistry*, 138(1):13-18.
- Barbarot, S., S. Auziere, A. Gadkari, G. Girolomoni, L. Puig, E. L. Simpson, D. J. Margolis, M. de Bruin-Weller, y L. Eckert (2018) «**Epidemiology of atopic dermatitis in adults: results from an international survey**», *Allergy*, 73(6):1284-1293.
- Barbarroja-Escudero, J., M. J. Sánchez-González, D. Antolín-Amérigo, M. Rodríguez-Rodríguez, F. Pineda, y M. Alvarez-Mon (2015) «**Diagnosis of IgE-mediated hypersensitivity to sesame seeds supplemented with lipid body proteins**», *Allergology International*, 64(4):396-398.
- Barbarroja-Escudero, J., M. J. Sánchez-González, F. Pineda, M. Rodríguez-Rodríguez, D. Antolín-Amérigo, M. Castillo, y M. Alvarez-Mon (2018) «**Identification of lipoproteins from sunflower seeds in 2 monosensitized anaphylaxis patients**», *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 28(5):334-336.
- Bavaro, S. L., L. Di Stasio, G. Mamone, E. De Angelis, R. Nocerino, R. B. Canani, A. F. Logrieco, N. Montemurro, y L. Monaci (2018) «**Effect of thermal/pressure processing and simulated human digestion on the immunoreactivity of extractable peanut allergens**», *Food Research International*, 109:126-137.
- Benedé, S., M. Garrido-Arandia, L. Martín-Pedraza, C. Bueno, A. Díaz-Perales, y M. Villalba (2017) «**Multifactorial modulation of food-induced anaphylaxis**», *Frontiers in Immunology*, 8:552.
- Berin, M. C. y H. A. Sampson (2013) «**Mucosal immunology of food allergy**», *Current biology*, 23(9):389-400.

- Beyer, K., E. Morrow, X. M. Li, L. Bardina, G. A. Bannon, A. W. Burks, y H. A. Sampson (2001) «**Effects of cooking methods on peanut allergenicity**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6):1077-1081.
- Beyer, K., L. Grabenhenrich, M. Härtl, A. Beder, B. Kalb, M. Ziegert, A. Finger, N. Harandi, R. Schlags, M. Gappa, *et al.* (2015) «**Predictive values of component-specific IgE for the outcome of peanut and hazelnut food challenges in children**», *Allergy*, 70(1):90-98.
- Bielory, L. (2000) «**Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: Ocular allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(6):1019-1032.
- Bindslev-Jensen, C., B. K. Ballmer-Welser, U. Bengtsson, C. Blanco, C. Ebner, J. Hourihane, A. C. Knulst, D. A. Moneret-Vautrin, K. Nekam, B. Niggemann, *et al.* (2004) «**Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods - Position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology**», *Allergy*, 59(7):690-697.
- Blackley, C. (1873) *Experimental researches on the causes and natura of catarrhus aestivus*. London: Bailieri Tindall & Findak Cox.
- Blanc, F., Y. M. Vissers, K. Adel-Patient, N. M. Rigby, A. R. Mackie, A. P. Gunning, N. K. Wellner, P. S. Skov, L. Przybylski-Nicaise, B. Ballmer-Weber, *et al.* (2011) «**Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity**», *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(12):1887-1894.
- Blumchen, K., H. Ulbricht, U. Staden, K. Dobberstein, J. Beschorner, L. C. L. de Oliveira, W. G. Shreffler, H. A. Sampson, B. Niggemann, U. Wahn, *et al.* (2010) «**Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(1):83-91.
- Bock, A. S., H. A. Sampson, F. M. Atkins, R. S. Zeiger, S. Lehrer, M. Sachs, R. K. Bush, y D. D. Metcafe (1988) «**Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: A manual**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82(6):986-997.
- Bock, S. A., W. -Y Lee, L. Remigio, A. Holst, y C. D. May (1978) «**Appraisal of skin tests with food extracts for diagnosis of food hypersensitivity**», *Clinical & Experimental Allergy*, 8(6):559-564.

- Bock, S. A. (2010) «**AAAAI support of the EAACI Position Paper on IgG4**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6):1410.
- Bock, S. A., A. Muñoz-Furlong, y H. A. Sampson (2007) «**Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4):1016-1018.
- Bohle, B. (2004) «**T lymphocytes and food allergy**», *Molecular nutrition & food research*, 48(6):424-33.
- De Boissieu, D. y C. Dupont (2006) «**Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: A preliminary report**», *Allergy*, 61(10):1238-1239.
- Bostock, J. (1828) «**Of the catharrus aestivus, or summer catarrh**», *Medico-Chirurgical Transactions*, 14437-14446.
- Bousquet, J., P. Chanez, I. Chanal, y F. B. Michel (1990) «**Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: A new automated specific IgE assay**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 85(6):1039-1043.
- Bousquet, J., R. F. Lockey, H. J. Malling, E. Alvarez-Cuesta, G. W. Canonica, M. D. Chapman, P. J. Creticos, J. M. Dayer, S. R. Durham, P. Demoly, *et al.* (1998) «**Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases**», *Allergy*, 102:531-42.
- Bousquet, J., P. G. Burney, T. Zuberbier, P. V. Cauwenberge, C. A. Akdis, C. Bindslev-Jensen, S. Bonini, W. J. Fokkens, F. Kauffmann, M. L. Kowalski, *et al.* (2009) «**GA2LEN (Global Allergy and Asthma European Network) addresses the allergy and asthma "epidemic"**», *Allergy*, 64(7):969-977.
- Bousquet, J., P. Van Cauwenberge, y N. Khaltaev (2001) «**Allergic rhinitis and its impact on asthma**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(5):S147-334.
- Bradford, M. M. (1976) «**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**», *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254.
- Braga, T., M. Grujic, A. Lukinius, L. Hellman, M. Abrink, y G. Pejler (2007) «**Serglycin proteoglycan is required for secretory granule integrity in mucosal mast cells**», *The Biochemical journal*, 403(1):49-57.

- Breiteneder, H. y E. N. C. Mills (2005) «**Molecular properties of food allergens**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1):14-24.
- Brozek, J. L., J. Bousquet, I. Agache, A. Agarwal, C. Bachert, S. Bosnic-Anticevich, R. Brignardello-Petersen, G. W. Canonica, T. Casale, N. H. Chavannes, *et al.* (2017) «**Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4):950-958.
- Bunyavanich, S., S. L. Rifas-Shiman, T. A. Platts-Mills, L. Workman, J. E. Sordillo, C. A. Camargo, M. W. Gillman, D. R. Gold, y A. A. Litonjua (2014) «**Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(5):1373-1382.
- Burk, C. M., M. Kulis, N. Leung, E. H. Kim, A. W. Burks, y B. P. Vickery (2016) «**Utility of component analyses in subjects undergoing sublingual immunotherapy for peanut allergy**», *Clinical and Experimental Allergy*, 46(2):347-353.
- Burks, A. W., S. M. Jones, R. A. Wood, D. M. Fleischer, S. H. Sicherer, R. W. Lindblad, D. Stablein, A. K. Henning, B. P. Vickery, A. H. Liu, *et al.* (2012) «**Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children**», *New England Journal of Medicine*, 367(3):233-243.
- Burks, A. W., R. A. Wood, S. M. Jones, S. H. Sicherer, D. M. Fleischer, A. M. Scurlock, B. P. Vickery, A. H. Liu, A. K. Henning, R. Lindblad, *et al.* (2015) «**Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Long-term follow-up of a randomized multicenter trial**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5):1240-1248.
- Burks, A. W., H. A. Sampson, M. Plaut, G. Lack, y C. A. Akdis (2018) «**Treatment for food allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1):1-9.
- Buslepp, J., R. Zhao, D. Donnini, D. Loftus, M. Saad, E. Appella, y E. J. Collins (2001) «**T cell activity correlates with oligomeric peptide-major histocompatibility complex binding on T cell surface**», *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50):47320-8.
- Cabanillas, B., S. J. Maleki, J. Rodríguez, C. Burbano, M. Muzquiz, M. A. Jiménez, M. M. Pedrosa, C. Cuadrado, y J. F. Crespo (2012) «**Heat and pressure treatments effects on peanut allergenicity**», *Food Chemistry*, 132(1):360-366.

- Cabanos, C., H. Urabe, M. R. Tandang-Silvas, S. Utsumi, B. Mikami, y N. Maruyama (2011) «**Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1**», *Molecular Immunology*, 49(1-2):115-123.
- Caffarelli, C., G. Cavagni, S. Giordano, I. Stapane, y C. Rossi (1995) «**Relationship between oral challenges with previously uningested egg and egg-specific IgE antibodies and skin prick tests in infants with food allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 95(6):1215-1220.
- Cai, Q., W. J. Zhang, Q. Q. Zhu, y Q. Chen (2016) «**Influence of heat treatment on the structure and core IgE-binding epitopes of rAra h 2.02**», *Food Chemistry*, 202:404-408.
- Canonica, G. W., J. Bousquet, T. Casale, R. F. Lockey, C. E. Baena-Cagnani, R. Pawankar, P. C. Potter, P. J. Bousquet, L. S. Cox, S. R. Durham, *et al.* (2009) «**Sublingual immunotherapy: World allergy organization position paper 2009**», *Allergy*, 2(11):223-281.
- Carrard, A., D. Rizzuti, y C. Sokollik (2015) «**Update on food allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(12):1511-1520.
- Carvalho, A. de O. y V. M. Gomes (2007) «**Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review**», *Peptides*, 28(5):1144-1153.
- Casale, T. B. y J. R. Stokes (2011) «**Future forms of immunotherapy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1):8-15.
- Van Cauwenberge, P., C. Bachert, G. Passalacqua, J. Bousquet, G. W. Canonica, S. R. Durham, W. J. Fokkens, P. H. Howarth, V. Lund, H. J. Malling, *et al.* (2000) «**Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis**», *Allergy*, 55(2):116-134.
- Chad, L., M. Ben-Shoshan, Y. Asai, S. Cherkaoui, R. Alizadehfar, Y. St-Pierre, L. Harada, M. Allen, y A. Clarke (2013) «**A majority of parents of children with peanut allergy fear using the epinephrine auto-injector**», *Allergy*, 68(12):1605-1609.
- Cehade, M. y S. S. Aceves (2010) «**Food allergy and eosinophilic esophagitis**», *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(3):231-237.
- Chen, J., Y. Hu, K. J. Allen, M. H. K. Ho, y H. Li (2011) «**The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(4):356-360.



- Chen, J. C. F., C. C. Y. Tsai, y J. T. C. Tzen (1999) «**Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds**», *Plant and Cell Physiology*, 40(10):1079-1086.
- Chen, M. C. M., C. L. Chyan, T. T. T. Lee, S. H. Huang, y J. T. C. Tzen (2004) «**Constitution of stable artificial oil bodies with triacylglycerol, phospholipid, and caleosin**», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12):3982-3987.
- Chen, X., Q. Wang, R. El-Mezayen, Y. Zhuang, y S. C. Dreskin (2013) «**Ara h 2 and Ara h 6 have similar allergenic activity and are substantially redundant**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 160(3):251-258.
- Chivato, T., E. Valovirta, R. Dahl, J. de Monchy, A. Bloch Thomsen, S. Palkonen, y L. Jacobsen (2012) «**Allergy, living and learning: Diagnosis and treatment of allergic respiratory diseases in Europe**», *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 22(3):168-179.
- Chruszcz, M., S. J. Maleki, K. A. Majorek, M. Demas, M. Bublin, R. Solberg, B. K. Hurlburt, S. Ruan, C. P. Mattisoehn, H. Breiteneder, *et al.* (2011) «**Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen**», *Journal of Biological Chemistry*, 286(45):39318-39327.
- Chua, K. Y., G. A. Stewart, W. R. Thomas, R. J. Simpson, R. J. Dilworth, T. M. Plozza, y K. J. Turner (1988) «**Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases**», *Journal of Experimental Medicine*, 167(1):175-182.
- Clark, A. T. y P. W. Ewan (2003) «**Food allergy in childhood**», *Archives of Disease in Childhood*, 88(1):79-81.
- Cohen, S. G. (2008) «**Food allergens: Landmarks along a historic trail**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6):1521-1524.
- Comstock, S. S., S. J. Maleki, y S. S. Teuber (2016) «**Boiling and frying peanuts decreases soluble peanut (*Arachis hypogaea*) allergens Ara h 1 and Ara h 2 but does not generate hypoallergenic peanuts**», *PLoS ONE*, 11(6):e0157849.
- Cooke, R., J. Barnard, S. Hebdal, y A. Stull (1935) «**Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (Hay Fever)**», *Journal of Experimental Medicine*, 62(6):733-750.

- Costa, J. J., P. F. Weller, y S. J. Galli (1997) «**The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils**», *Journal of the American Medical Association*, 278(22):1815-22.
- Cramer, R. (2013) «**The crux with a reliable in vitro and in vivo diagnosis of allergy**», *Allergy*, 68(6):693-694.
- Cummings, A. J., R. C. Knibb, R. M. King, y J. S. Lucas (2010) «**The psychosocial impact of food allergy and food hypersensitivity in children, adolescents and their families: a review**», *Allergy*, 65(8):933-945.
- Dang, T. D., M. Tang, S. Choo, P. V. Licciardi, J. J. Koplin, P. E. Martin, T. Tan, L. C. Gurrin, A. L. Ponsonby, D. Tey, *et al.* (2012) «**Increasing the accuracy of peanut allergy diagnosis by using Ara h 2**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4):1056-1063.
- Darsow, U. y J. Ring (2002) «**Atopic eczema, allergy, and the atopy patch test**», *Allergy and Clinical Immunology International*, 14(4):39-43.
- Datema, M. R., L. Zuidmeer-Jongejan, R. Asero, L. Barreales, S. Belohlavkova, F. De Blay, P. Bures, M. Clausen, R. Dubakiene, D. Gislason, *et al.* (2015) «**Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(2):382-91.
- Demoly, P., N. F. Adkinson, K. Brockow, M. Castells, A. M. Chiriac, P. A. Greenberger, D. A. Khan, D. M. Lang, H. S. Park, W. Pichler, *et al.* (2014) «**International Consensus on drug allergy**», *Allergy*, 69(4):420-437.
- Dhami, S., H. Zaman, E.-M. Varga, G. J. Sturm, A. Muraro, C. A. Akdis, D. Antolín-Amérigo, M. B. Bilò, D. Bokanovic, M. A. Calderon, *et al.* (2017) «**Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis**», *Allergy*, 72(3):342-365.
- Dias, G. A. C., G. V. Pires, S. O. R. do Valle, S. D. Dortas Júnior, S. Levy, A. T. França, I. Baiardini, y W. G. Canonica (2016) «**Impact of chronic urticaria on the quality of life of patients followed up at a university hospital**», *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(6):754-759.
- Dinulos, J., A. Trickett, y C. Crudele (2017) «**New science and treatment paradigms for atopic dermatitis**», *Current Opinion in Pediatrics*, 30(1):161-168.

- Doan, T., R. Melvold, S. Viselli, y C. Waltenbaugh (2007) *Immunology*. Editado por R. Harvey. Lippincott Williams & Wilkins.
- Doña, I., N. Blanca-López, M. Torres, J. García-Campos, I. García-Núñez, F. Gómez, M. Salas, C. Rondón, M. Canto, y M. Blanca (2012) «**Response patterns in drug hypersensitivity drug hypersensitivity reactions: Response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients**», *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 22(225):363-371.
- Downs, M. L., A. Simpson, A. Custovic, A. Semic-Jusufagic, J. Bartra, M. Fernandez-Rivas, S. L. Taylor, J. L. Baumert, y E. N. C. Mills (2016) «**Insoluble and soluble roasted walnut proteins retain antibody reactivity**», *Food Chemistry*, 194:1013-1021.
- Dreborg, S. y T. Foucard (1983) «**Allergy to Apple, Carrot and Potato in Children with Birch Pollen Allergy**», *Allergy*, 38(3):167-172.
- Dunham, I., C. a Sargent, J. Trowsdale, y R. D. Campbell (1987) «**Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis**», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20):7237-41.
- Dunlop, J. H. y C. A. Keet (2018) «**Epidemiology of Food Allergy**», *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1):13-25.
- Dworski, R., H. U. Simon, A. Hoskins, y S. Yousefi (2011) «**Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5):1260-1266.
- Eberlein-Konig, B., S. Ullmann, P. Thomas, y B. Przybilla (1995) «**Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization**», *Clinical and Experimental Allergy*, 25(8):704-712.
- Ebner, C., T. Birkner, R. Valenta, H. Rumpold, M. Breitenbach, O. Scheiner, y D. Kraft (1991) «**Common epitopes of birch pollen and apples-Studies by western and northern blot**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(4):588-594.
- Engvall, E. y P. Perlmann (1971) «**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G**», *Immunochemistry*, 8(9):871-874.

- Enrique, E., F. Pineda, T. Malek, J. Bartra, M. Basagaña, R. Tella, J. V. Castelló, R. Alonso, J. A. De Mateo, T. Cerdá-Trias, *et al.* (2005) «**Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5):1073-1079.
- Enrique, E., M. Utz, J. A. De Mateo, J. V. Castelló, T. Malek, y F. Pineda (2006) «**Allergy to lipid transfer proteins: Cross-reactivity among pomegranate, hazelnut, and peanut**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 96(1):122-123.
- Enrique, E., T. Malek, F. Pineda, R. Palacios, J. Bartra, R. Tella, M. Basagaña, R. Alonso, y A. Cisteró-Bahíma (2008) «**Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A follow-up study**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 100(3):283-284.
- Feeney, M., G. Du Toit, G. Roberts, P. H. Sayre, K. Lawson, H. T. Bahnson, M. L. Sever, S. Radulovic, M. Plaut, G. Lack, *et al.* (2016) «**Impact of peanut consumption in the LEAP Study: Feasibility, growth, and nutrition**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4):1108-1118.
- Fernández-Rivas, M., S. Garrido Fernández, J. A. Nadal, M. D. A. D. De Durana, B. E. García, E. González-Mancebo, S. Martín, D. Barber, P. Rico, y A. I. Tabar (2009) «**Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract**», *Allergy*, 64(6):876-883.
- Fernandez, T. D., C. Mayorga, A. Ariza, J. L. Corzo, y M. J. Torres (2014) «**Allergic reactions to antibiotics in children**», *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(4):278-285.
- Ferrer, M. y A. P. Kaplan (2007) «**Progress and Challenges in the Understanding of Chronic Urticaria**», *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 3(1):31-35.
- Fleischer, D. M., A. W. Burks, B. P. Vickery, A. M. Scurlock, R. A. Wood, S. M. Jones, S. H. Sicherer, A. H. Liu, D. Stablein, A. K. Henning, *et al.* (2013) «**Sublingual immunotherapy for peanut allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1):119-127.
- Frandsen, G. I., J. Mundy, y J. T. C. Tzen (2001) «**Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin**», *Physiologia Plantarum*, 301-307.

- Fuentes-Aparicio, V., E. Alonso-Lebrero, L. Zapatero, S. Infante, R. Lorente, M. Angeles Muñoz-Fernández, y R. Correa-Rocha (2014) «**Induction of Treg cells after oral immunotherapy in hen's egg-allergic children**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(1):103-106.
- Galli, S. J., J. R. Gordon, y B. K. Wershil (1993) «**Mast cell cytokines in allergy and inflammation**», *Agents and actions. Supplements*, 43:209-220.
- Garcia-Blanca, A., A. Aranda, N. Blanca-Lopez, D. Perez, F. Gomez, C. Mayorga, M. J. Torres, A. Diaz-Perales, J. R. Perkins, M. Villalba, *et al.* (2015) «**Influence of age on IgE response in peanut-allergic children and adolescents from the Mediterranean area**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 26(6):497-502.
- Gell, P. y R. Coombs (1963) *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Blackwell.
- Gershoni, J. M. y G. E. Palade (1983) «**Protein blotting: principles and applications**», *Analytical Biochemistry*, 131(1):1-15.
- Gilfillan, A. M., R. D. Peavy, y D. D. Metcalfe (2009) «**Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation**», *Immunologic Research*, 43(1-3):15-24.
- van Ginkel, C. D., G. N. van der Meulen, E. Bak, B. M. J. Flokstra-de Blok, B. J. Kollen, G. H. Koppelman, y A. E. J. Dubois (2018) «**Retrospective observational cohort study regarding the effect of breastfeeding on challenge-proven food allergy**», *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Gleich, G. J., E. M. Zimmermann, L. L. Henderson, y J. W. Yunginger (1982) «**Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: A six-year prospective study**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(4):261-271.
- Global Atlas of Allergy** (2014) *European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)*.
- Global Initiative for Asthma (2018) «**Global strategy for asthma management and prevention**», *National Institutes of Health*. National Heart, Lung and Blood Institute.
- Golden, D. B. K. (2015) «**Anaphylaxis to insect stings**», *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35(2):287-302.

- González Domínguez, L., C. Muñoz Archidona, A. Moreira Jorge, S. Quevedo Teruel, T. Bracamonte Bermejo, M. Castillo Fernández, F. Pineda de la Losa, y L. Á. Echeverría Zudaire (2016) «**Oil body associated proteins in children with nuts allergy. Allergens to consider in IgE-mediated nuts allergy**», *Clinical and Translational Allergy*, 6(1):PP44.
- Greaves, M. (2000) «**Chronic urticaria**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(4):664-672.
- Green, P. H. R., B. Lebowitz, y R. Greywoode (2015) «**Celiac disease**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5):1099-1106.
- Groschwitz, K. R. y S. P. Hogan (2009) «**Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1):3-20.
- Guillon, B., H. Bernard, M. F. Drumare, S. Hazebrouck, y K. Adel-Patient (2016) «**Heat processing of peanut seed enhances the sensitization potential of the major peanut allergen Ara h 6**», *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(12):2722-2735.
- Gultekin, F. y D. K. Doguc (2013) «**Allergic and immunologic reactions to food additives**», *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(1):6-29.
- Gupta, M., A. Cox, A. Nowak-Węgrzyn, y J. Wang (2018) «**Diagnosis of Food Allergy**», *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1):39-52.
- Haahtela, T., L. von Hertzen, M. Mäkelä, y M. Hannuksela (2008) «**Finnish Allergy Programme 2008-2018--time to act and change the course**», *Allergy*, 63(6):634-645.
- Haahtela, T., E. Valovirta, P. Kauppi, E. Tommila, K. Saarinen, L. von Hertzen, y M. J. Mäkelä (2012) «**The Finnish Allergy Programme 2008-2018 - scientific rationale and practical implementation**», *Asia Pacific Allergy*, 2(4):275.
- Van Hage-Hamsten, M., M. Kronqvist, O. Zetterström, E. Johansson, V. Niederberger, S. Vrtala, H. Grönlund, R. Grönneberg, y R. Valenta (1999) «**Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: Results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(5):969-977.
- Hallstrand, T. S. y W. R. Henderson (2010) «**An update on the role of leukotrienes in asthma**», *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(1):60-66.

- Hamilton, R. G. (2010) «**Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2):S284-296.
- Han, W., J. Mou, J. Sheng, J. Yang, y Z. Shao (1995) «**Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution.**», *Biochemistry*, 34(26):8215-8220.
- Han, Y., J. Kim, y K. Ahn (2012) «**Food allergy**», *Korean Journal of Pediatrics*, 55(5):153-158.
- Hansen, K. S., B. K. Ballmer-Weber, D. Lüttkopf, P. S. Skov, B. Wüthrich, C. Bindslev-Jensen, S. Vieths, y L. K. Poulsen (2003) «**Roasted hazelnuts-allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge**», *Allergy*, 58(2):132-138.
- Hansen, T. K., C. Bindslev-Jensen, P. Stahl Skov, y L. K. Poulsen (1996) «**Codfish allergy in adults. Specific tests for IgE and histamine release vs double-blind placebo-controlled challenges**», *Clinical and Experimental Allergy*, 26(11):1276-1285.
- Haroun-Díaz, E., J. Azofra, E. González-Mancebo, M. de las Heras, C. Pastor-Vargas, V. Esteban, M. Villalba, A. Díaz-Perales, y J. Cuesta-Herranz (2017) «**Nut allergy in two different areas of Spain: Differences in clinical and molecular pattern**», *Nutrients*, 9(8):909.
- Hellman, L. T., S. Akula, M. Thorpe, y Z. Fu (2017) «**Tracing the origins of IgE, mast cells, and allergies by studies of wild animals**», *Frontiers in Immunology*, (8):1749.
- Henry, W. (1803) «**Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures**», *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 93:29-42.
- Hiller, R., S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, *et al.* (2002) «**Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment.**», *The FASEB journal*, 16(3):414-416.
- Hitomi, K., S. Tahara-Hanaoka, S. Someya, A. Fujiki, H. Tada, T. Sugiyama, S. Shibayama, K. Shibuya, y A. Shibuya (2010) «**An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions**», *Nature Immunology*, 11(7):601-607.

- Ho, M. H. K., S. L. Lee, W. H. S. Wong, P. Ip, y Y. L. Lau (2012) «**Prevalence of self-reported food allergy in Hong Kong children and teens-a population survey**», *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 30(4):275-284.
- Ho, M. H. K., W. H. S. Wong, y C. Chang (2014) «**Clinical spectrum of food allergies: A comprehensive review**», *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46(3):225-240.
- Hoffmann-Sommergruber, K., S. Pfeifer, y M. Bublin (2015) «**Applications of Molecular Diagnostic Testing in Food Allergy**», *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(9):56.
- Hofmann, A. M., A. M. Scurlock, S. M. Jones, K. P. Palmer, Y. Lokhnygina, P. H. Steele, J. Kamilaris, y A. W. Burks (2009) «**Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(2):286-291.
- Holgate, S. T. y R. Polosa (2008) «**Treatment strategies for allergy and asthma**», *Nature Reviews Immunology*, 8(3):218-230.
- Hourihane, J. O. B., S. A. Kilburn, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, S. L. Taylor, y J. O. Warner (1997) «**An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: A randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(5):596-600.
- Huang, C.Y., C.I. Chung, Y.C. Lin, Y.I. C. Hsing, y A. H. C. Huang (2009) «**Oil Bodies and Oleosins in Physcomitrella Possess Characteristics Representative of Early Trends in Evolution**», *Plant Physiology*, 150(3):1192-1203.
- Huang, M.-D. y A. H. C. Huang (2015) «**Bioinformatics Reveal Five Lineages of Oleosins and the Mechanism of Lineage Evolution Related to Structure/Function from Green Algae to Seed Plants**», *Plant Physiology*, 169(1):453-470.
- Hurlburt, B. K., L. R. Offermann, J. K. McBride, K. A. Majorek, S. J. Maleki, y M. Chruszcz (2013) «**Structure and function of the peanut panallergen Ara h 8**», *Journal of Biological Chemistry*, 288(52):36890-36901.
- Inácio, F., F. Semedo, F. Pineda, M. Castillo, A. Pires, y S. Correia (2018) «**A very unusual expression of anaphylaxis to almonds – a case of allergy to oil body allergens**», *Allergy*, 73(105):838.



- Irvine, A. D., W. H. I. McLean, y D. Y. M. Leung (2011) «**Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases**», *New England Journal of Medicine*, 365(14):1315-1327.
- Ishizaka, K., T. Ishizaka, y M. M. Hornbrook (1966) «**Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity**», *The Journal of Immunology*, 97(1):75-85.
- Janson, C., J. Anto, P. Burney, S. Chinn, R. de Marco, J. Heinrich, D. Jarvis, N. Kuenzli, B. Leynaert, C. Luczynska, *et al.* (2001) «**The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II**», *The European respiratory journal*, 18(3):598-611.
- Jappe, U., J. Nikolic, A. Opitz, A. Homann, P. Zabel, y M. Gavrovic-Jankulovic (2016) «**Apparent IgE negative anaphylactic reaction to banana combined with kiwi allergy – complementary diagnostic value of purified single banana allergens**», *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(7):1220-1222.
- Jappe, U. y C. Schwager (2017) «**Relevance of lipophilic allergens in food allergy diagnosis**», *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(9):61.
- Javaloyes, G., M. J. Goikoetxea, I. García Nuñez, A. Aranda, M. L. Sanz, M. Blanca, A. Diaz Perales, J. Da Souza, I. Esparza, V. Del Pozo, *et al.* (2012) «**Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(6):1432-1434.
- Jayaram, S. y A. K. Bal (1991) «**Oleosomes (lipid bodies) in nitrogen-fixing peanut nodules**», *Plant, Cell & Environment*, 14(2):195-203.
- Jiménez-Díaz, C. (1932) *El asma y otras enfermedades alérgicas*. España.
- Johansson, S. y H. Deuschl (1976) «**Immunoglobulins in nasal secretions with special reference to IgE**», *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 52(1-4):364-375.
- Johansson, S. G. y T. Bieber (2002) «**New diagnostic classification of allergic skin disorders**», *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2(5):403-406.
- Johansson, S. G. O. y H. Bennich (1967) «**Studies on a new class of human immunoglobulins. 1. Immunological properties. Nobel symposium 3, gamma globulins, structure and control of biosynthesis**» Stockholm, 193.

- Jones, S. M., L. Pons, J. L. Roberts, A. M. Scurlock, T. T. Perry, M. Kulis, W. G. Shreffler, P. Steele, K. A. Henry, M. Adair, *et al.* (2009) «**Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(2):292-300.
- Jones, S. M., A. W. Burks, C. Keet, B. P. Vickery, A. M. Scurlock, R. A. Wood, A. H. Liu, S. H. Sicherer, A. K. Henning, R. W. Lindblad, *et al.* (2016) «**Long-term treatment with egg oral immunotherapy enhances sustained unresponsiveness that persists after cessation of therapy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4):1117-1127.
- Jones, S. M., A. W. Burks, y C. Dupont (2014) «**State of the art on food allergen immunotherapy: Oral, sublingual, and epicutaneous**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2):318-323.
- Jutel, M., U. R. Müller, M. Fricker, S. Rihs, W. J. Pichler, y C. Dahinden (1996) «**Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils**», *Clinical and Experimental Allergy*, 26(10):1112-1118.
- Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. R. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, *et al.* (2001) «**Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors**», *Nature*, 413(6854):420-425.
- Jutel, M., M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszczyk, K. Blaser, y C. A. Akdis (2003) «**IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy**», *European Journal of Immunology*, 33(5):1205-1214.
- Jutel, M., L. Jaeger, R. Suck, H. Meyer, H. Fiebig, y O. Cromwell (2005) «**Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(3):608-613.
- Jutel, M., N. G. Papadopoulos, H. Gronlund, H. J. Hoffman, B. Bohle, P. Hellings, G. J. Braunsthal, A. Muraro, P. Schmid-Grendelmeier, T. Zuberbier, *et al.* (2014) «**Recommendations for the allergy management in the primary care**», *Allergy*, 69(6):708-718.
- Jutel, M., M. Akdis, y C. a Akdis (2009) «**Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology**», *Clinical and experimental allergy*, 39(12):1786-1800.

- Kasperska-Zajac, A., Z. Brzoza, y B. Rogala (2008) «**Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy**», *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 2(1):72-76.
- Kay, A. (2008) *Allergy and allergic diseases*. Oxford: Blackwell Science.
- Kaya, A., M. Erkoçoğlu, E. Civelek, B. Çakir, y C. N. Kocabaş (2013) «**Prevalence of confirmed IgE-mediated food allergy among adolescents in Turkey**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 24(5):456-462.
- Keet, C. A., S. Seopaul, S. Knorr, S. Narisety, J. Skripak, y R. A. Wood (2013) «**Long-term follow-up of oral immunotherapy for cow's milk allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(3):737-739.
- Kenneth, M. (2016) *Janeway's Immunobiology*. 9th ed.
- Kim, E. H., J. A. Bird, M. Kulis, S. Laubach, L. Pons, W. Shreffler, P. Steele, J. Kamilaris, B. Vickery, y A. W. Burks (2011) «**Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Clinical and immunologic evidence of desensitization**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3):640-646.
- Kinet, J. P. (1999) «**The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology**», *Annual Review of Immunology*, 17:931-972.
- King, R. M., R. C. Knibb, y J. O. B. Hourihane (2009) «**Impact of peanut allergy on quality of life, stress and anxiety in the family**», *Allergy*, 64(3):461-468.
- Klemans, R. J. B., D. Otte, M. Knol, E. F. Knol, Y. Meijer, F. H. J. Gmelig-Meyling, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, A. C. Knulst, y S. G. M. A. Pasmans (2013) «**The diagnostic value of specific IgE to Ara h 2 to predict peanut allergy in children is comparable to a validated and updated diagnostic prediction model**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1):157-163.
- Klemans, R. J. B., E. F. Knol, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, y A. C. Knulst (2014) «**The diagnostic accuracy of specific IgE to Ara h 6 in adults is as good as Ara h 2**», *Allergy*, 68(8):1112-1114.
- Klemans, R. J. B., H. van Os-Medendorp, M. Blankestijn, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, E. F. Knol, y A. C. Knulst (2015) «**Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: A systematic review**», *Clinical and Experimental Allergy*, 45(4):720-730.

- Klose, J. (1975) «**Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals**», *Humangenetik*, 26(3):231-243.
- Knol, E. F., F. P. J. Mul, H. Jansen, J. Calafat, y D. Roos (1991) «**Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(3 Pt 1):328-338.
- Koletzko, S. y B. Koletzko (2009) «**Allergen avoidance approaches in food allergy management**», *Nestle Nutrition Workshop Series: Pediatric Program*, 64:169-184.
- Kolset, S. O. y H. Tveit (2008) «**Serglycin - Structure and biology**», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8):1073-1085.
- Kopper, R. A., N. J. Odum, M. Sen, R. M. Helm, J. S. Stanley, y A. W. Burks (2005) «**Peanut protein allergens: The effect of roasting on solubility and allergenicity**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 136(1):16-22.
- Krause, S., G. Reese, S. Randow, D. Zennaro, D. Quaratino, P. Palazzo, M. A. Ciardiello, A. Petersen, W. M. Becker, y A. Mari (2009) «**Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4):771-778.
- Kukkonen, A. K., A. S. Pelkonen, S. Mäkinen-Kiljunen, H. Voutilainen, y M. J. Mäkelä (2015) «**Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: A double-blind placebo-controlled study**», *Allergy*, 70(10):1239-1245.
- Kulis, M., B. P. Vickery, y A. W. Burks (2011) «**Pioneering immunotherapy for food allergy: Clinical outcomes and modulation of the immune response**», *Immunologic Research*, 49(1-3):216-226.
- De la Hoz, B., T. Dordal, E. Enrique, J. Quiralte, y C. Vidal (2012) «**Alergias respiratorias 2020**», Euromedice Ediciones Medicas.
- Lacy, P. (2017) «**Eosinophil Cytokines in Allergy**», en *Cytokine Effector Functions in Tissues*, 173-218.
- Laemmli, U. K. (1970) «**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**», *Nature*, 227(5259):680-685.
- Laín Entralgo, P. (1982) «**Medicina árabe**», en *Historia de la medicina*. Madrid, 127-145.

- Lange, L., K. Beyer, y J. Kleine-Tebbe (2014) «**Benefits and limitations of molecular diagnostics in peanut allergy: Part 14 of the series Molecular Allergology**», *Allergo Journal International*, 23(5):158-163.
- Larché, M., C. A. Akdis, y R. Valenta (2006) «**Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy**», *Nature Reviews Immunology*, 6(10):761-771.
- Larsen, L. F., N. Juel-Berg, K. S. Hansen, E. N. Clare Mills, R. van Ree, L. K. Poulsen, y B. M. Jensen (2018) «**A comparative study on basophil activation test, histamine release assay, and passive sensitization histamine release assay in the diagnosis of peanut allergy**», *Allergy*, 73(1):137-144.
- Lauer, I., N. Dueringer, S. Pokoj, S. Rehm, G. Zoccatelli, G. Reese, M. S. Miguel-Moncin, A. Cistero-Bahima, E. Enrique, J. Lidholm, *et al.* (2009) «**The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut**», *Clinical and Experimental Allergy*, 39(9):1427-1437.
- Leduc, V., D. A. Moneret-Vautrin, J. T. C. Tzen, M. Morisset, L. Guerin, y G. Kanny (2006a) «**Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients**», *Allergy*, 61(3):349-356.
- Leduc, V., D. A. Moneret-Vautrin, J. T. C. Tzen, M. Morisset, L. Guerin, y G. Kanny (2006b) «**Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients**», *Allergy*, 61(3):349-356.
- Leickly, F. E., K. M. Kloefer, J. E. Slaven, y G. Vitalpur (2018) «**Peanut Allergy: An Epidemiologic Analysis of a Large Database**», *The Journal of Pediatrics*, 192:223-228.
- Lin, L.-J., S. S. K. Tai, C.-C. Peng, y J. T. C. Tzen (2002) «**Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies**», *Plant physiology*, 128(4):1200-11.
- Lin, L. J., P. C. Liao, H. H. Yang, y J. T. C. Tzen (2005) «**Determination and analyses of the N-termini of oil-body proteins, steroleosin, caleosin and oleosin**», *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8):770-776.
- Longo, G., I. Berti, A. W. Burks, B. Krauss, y E. Barbi (2013) «**IgE-mediated food allergy in children**», *The Lancet*, 16(382):1656-1664.
- Loveless, M. H. (1940) «**Immunological studies of pollinosis: I. The presence of two antibodies related to the same pollen-antigen in the serum of treated Hay-Fever patients**», *The Journal of Immunology*, 38(1):25-50.

- Loveless, M. H. (1950) «**Milk allergy: a survey of its incidence. Experiments with a masked ingestion test**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 21(6):489-499.
- De Lucca, A. J., T. E. Cleveland, y D. E. Wedge (2005) «**Plant-derived antifungal proteins and peptides**», *Canadian Journal of Microbiology*, 51(12):1001-1014.
- MacGinnitie, A. J., R. Rachid, H. Gragg, S. V. Little, P. Lakin, A. Cianferoni, J. Heimall, M. Makhija, R. Robison, R. S. Chinthrajah, *et al.* (2017) «**Omalizumab facilitates rapid oral desensitization for peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3):873-881.
- Maizels, R. M. (2005) «**Infections and allergy - Helminths, hygiene and host immune regulation**», *Current Opinion in Immunology*, 17(6):656-661.
- Maleki, S. J., S. Y. Chung, E. T. Champagne, y J. P. Raufman (2000) «**The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4):763-768.
- Maleki, S. J., O. Viquez, T. Jacks, H. Dodo, E. T. Champagne, S. Y. Chung, y S. J. Landry (2003) «**The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(1):190-195.
- Malley, A. y F. Perlman (1969) «**Induction of both reaginic and blocking antibodies with a low molecular weight fraction of timothy pollen extract**», *Journal of Allergy*, 43(2):59-64.
- Mallol, J., J. Crane, E. von Mutius, J. Odhiambo, U. Keil, y A. Stewart (2013) «**The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis**», *Allergologia et Immunopathologia*, 41(2):73-85.
- Mari, A. (2008) «**When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools**», *Clinical and Experimental Allergy*, 38(7):1089-1094.
- Marsh, D., L. Lichtenstein, y D. Campbell (1970) «**Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component**», *Immunology*, 18(5):705-722.

- Marsh, S. G. E., E. D. Albert, W. F. Bodmer, R. E. Bontrop, B. Dupont, H. A. Erlich, M. Fernández-Viña, D. E. Geraghty, R. Holdsworth, C. K. Hurley, *et al.* (2010) «**Nomenclature for factors of the HLA system, 2010**», *Tissue Antigens*, 75(4):291-455.
- May, C. D. (1976) «**Objective clinical and laboratory studies of immediate hypersensitivity reactions to foods in asthmatic children**», *Journal of allergy and clinical immunology*, 58(4):500-515.
- McGowan, E. C., E. C. Matsui, R. Peng, P. M. Salo, D. C. Zeldin, y C. A. Keet (2016) «**Racial/ethnic and socioeconomic differences in self-reported food allergy among food-sensitized children in National Health and Nutrition Examination Survey III**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 117(5):570-572.
- McWilliam, V., J. Koplin, C. Lodge, M. Tang, S. Dharmage, y K. Allen (2015) «**The prevalence of tree nut allergy: a systematic review**», *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(9):54.
- Meng, C., W. Michael, y L. Susan (2018) «**Preventing peanut allergy**», *Pediatric allergy, immunology and pulmonology*, 31(1):2-8.
- Metcalfe, D. D., R. D. Peavy, y A. M. Gilfillan (2009) «**Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4):639-646.
- Mittag, D., J. Akkerdaas, B. K. Ballmer-Weber, L. Vogel, M. Wensing, W. M. Becker, S. J. Koppelman, A. C. Knulst, A. Helbling, S. L. Hefle, *et al.* (2004) «**Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6):1410-1417.
- Mondoulet, L., E. Paty, M. F. Drumare, S. Ah-Leung, P. Scheinmann, R. M. Willemot, J. M. Wal, y H. Bernard (2005) «**Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins**», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11):4547-4553.
- Moreno, F. J. y A. Clemente (2008) «**2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?**», *The Open Biochemistry Journal*, 2:16-28.
- Mueller, G. A., R. A. Gosavi, A. Pomés, S. Wünschmann, A. F. Moon, R. E. London, y L. C. Pedersen (2011) «**Ara h 2: Crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity**», *Allergy*, 66(7):878-885.

- Mueller, G. A., S. J. Maleki, y L. C. Pedersen (2014) «**The molecular basis of peanut allergy**», *Current allergy and asthma reports*, 14(5):429.
- Müller, U., D. Lüttkopf, A. Hoffmann, A. Petersen, W. M. Becker, F. Schocker, B. Niggemann, F. Altmann, D. Kolarich, D. Haustein, *et al.* (2000) «**Allergens in raw and roasted hazelnuts (*Corylus avellana*) and their cross-reactivity to pollen**», *European Food Research Technology*, 212(1):2-12.
- Mullol, J., A. Valero, I. Alobid, J. Bartra, A. Navarro, T. Chivato, N. Khaltaev, y J. Bousquet (2008) «**Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008). The perspective from Spain**», *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18(1):327-334.
- Muñoz-Furlong, A. (2003) «**Daily coping strategies for patients and their families**», *Pediatrics*, 111(6):1654-1661.
- Muñoz-López F (2011) «**Pediatrics, Down's syndrome and allergic disease**», *International Medical Review on Down's Syndrome*, 15(1):8-13.
- Murphy, D. J., J. N. Keen, J. N. O'Sullivan, D. M. Y. Au, E. W. Edwards, P. J. Jackson, I. Cummins, T. Gibbons, C. H. Shaw, y A. J. Ryan (1991) «**A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins**», *BBA - Gene Structure and Expression*, 1088(1):86-94.
- Namork, E. y B. A. Stensby (2015) «**Peanut sensitization pattern in Norwegian children and adults with specific IgE to peanut show age related differences**», *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 11(1):32.
- Nesbit, J. B., B. K. Hurlburt, C. H. Schein, H. Cheng, H. Wei, y S. J. Maleki (2012) «**Ara h 1 structure is retained after roasting and is important for enhanced binding to IgE**», *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(11):1739-1747.
- Niederberger, V., F. Horak, S. Vrtala, S. Spitzauer, M.-T. Krauth, P. Valent, J. Reisinger, M. Pelzmann, B. Hayek, M. Kronqvist, *et al.* (2004) «**Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease**», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(2):S14677-14682.
- Niggemann, B., C. Rolinck-Werninghaus, A. Mehl, C. Binder, M. Ziegert, y K. Beyer (2005) «**Controlled oral food challenges in children - When indicated, when superfluous?**», *Allergy*, 60(7):865-870.



- Nørgaard, A. y C. Bindslev-Jensen (1992) «**Egg and milk allergy in adults: Diagnosis and characterization**», *Allergy*, 47(5):503-509.
- Nwaru, B. I., L. Hickstein, S. S. Panesar, G. Roberts, A. Muraro, y A. Sheikh (2014) «**Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis**», *Allergy*, 69(8):992-1007.
- O'Farrell, P. H. (1975) «**High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins**», *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10):4007-4021.
- Oddy, W. H. (2017) «**Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease**», *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(2):26-36.
- Olaguibel Rivera, J. M. (2006) «**IgE: aproximación histórica**», *Archivos de Bronconeumología*, 42:3-5.
- Olszewski, A., L. Pons, F. Moutété, I. Aimone-Gastin, G. Kanny, D. A. Moneret-Vautrin, y J. L. Guéant (1998) «**Isolation and characterization of proteic allergens in refined peanut oil**», *Clinical and Experimental Allergy*, 28(7):850-859.
- Oppenheimer, J. J., H. S. Nelson, S. A. Bock, F. Christensen, y D. Y. M. Leung (1992) «**Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90(2):256-262.
- Ortolani, C., M. Ispano, E. Pastorello, A. Bigi, y R. Ansaloni (1988) «**The oral allergy syndrome**», *Annals of Allergy*, 61(6 Pt 2):47-52.
- Ortolani, C., C. Bruijnzeel-Koomen, U. Bengtsson, C. Bindslev-Jensen, B. Björkstén, A. Høst, M. Ispano, R. Jarish, C. Madsen, K. Nekam, *et al.* (1999) «**Controversial aspects of adverse reactions to food**», *Allergy*, 54(1):27-45.
- Osborne, N. J., J. J. Koplin, P. E. Martin, L. C. Gurrin, A. J. Lowe, M. C. Matheson, A. L. Ponsonby, M. Wake, M. L. K. Tang, S. C. Dharmage, *et al.* (2011) «**Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3):668-676.
- Padlan, E. A. (1994) «**Anatomy of the antibody molecule**», *Molecular Immunology*, 31(3):169-217.

- Pajno, G. B., M. Fernandez-Rivas, S. Arasi, G. Roberts, C. A. Akdis, M. Alvaro-Lozano, K. Beyer, C. Bindslev-Jensen, W. Burks, M. Ebisawa, *et al.* (2018) «**EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy**», *Allergy*, 73(4):799-815.
- Palladino, C. y H. Breiteneder (2018) «**Peanut allergen**», *Molecular Immunology*, 100:58-70.
- Panzani, R. (1985) «**Cypress and Food Allergy : Was It Suspected in Antiquity ?**», *Journal of Asthma*, 22(4):223-226.
- Parthibane, V., S. Rajakumari, V. Venkateshwari, R. Iyappan, y R. Rajasekharan (2012) «**Oleosin is bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities**», *Journal of Biological Chemistry*, 287(3):1946-1954.
- Pastorello, E. A. (1993) «**Skin tests for diagnosis of IgE-mediated allergy**», *Allergy*, 48(14):S57-62.
- Patriarca, G., D. Schiavino, V. Pecora, C. Lombardo, E. Pollastrini, A. Aruanno, V. Sabato, A. Colagiovanni, A. Rizzi, T. De Pasquale, *et al.* (2009) «**Food allergy and food intolerance: Diagnosis and treatment**», *Internal and Emergency Medicine*, 4(1):11-24.
- Pauli, G., A. Purohit, J. P. Oster, F. de Blay, S. Vrtala, V. Niederberger, D. Kraft, y R. Valenta (1999) «**Clinical evaluation of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 118(2-4):216-217.
- Peavy, R. D. y D. D. Metcalfe (2008) «**Understanding the mechanisms of anaphylaxis**», *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(4):310-315.
- Pejler, G., M. Åbrink, M. Ringvall, y S. Wernersson (2007) «**Mast Cell Proteases**», *Advances in Immunology*, 95:167-255.
- Pejler, G., M. Åbrink, y S. Wernersson (2009) «**Serglycin proteoglycan: Regulating the storage and activities of hematopoietic proteases**», *BioFactors*, 35(1):61-68.
- Peng, C. C., V. S. Y. Lee, M. Y. Lin, H. Y. Huang, y J. T. C. Tzen (2007) «**Minimizing the central hydrophobic domain in oleosin for the constitution of artificial oil bodies**», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14):5604-5610.
- Penn, D. J. y W. K. Potts (1999) «**The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes**», *The American Naturalist*, 153(2):145-164.

- Pérez-Novo, C. A., G. Holtappels, S. L. Vinall, L. Xue, N. Zhang, C. Bachert, y R. Pettipher (2010) «**CRTH2 mediates the activation of human Th2 cells in response to PGD2 released from IgE/anti-IgE treated nasal polyp tissue**», *Allergy*, 65(3):304-310.
- Perrier, C. y B. Corthésy (2011) «**Gut permeability and food allergies**», *Clinical and Experimental Allergy*, 41(1):20-28.
- Petersen, A., S. Rennert, S. Kull, W. M. Becker, H. Notbohm, T. Goldmann, y U. Jappe (2014) «**Roasting and lipid binding provide allergenic and proteolytic stability to the peanut allergen Ara h 8**», *Biological Chemistry*, 395(2):239-250.
- Pettipher, R. y T. T. Hansel (2010) «**Antagonists of the prostaglandin D2 receptor CRTH2**», *Drugs News Perspect*, 21(6):317-322.
- Pfaar, O., S. Bonini, V. Cardona, P. Demoly, T. Jakob, M. Jutel, J. Kleine-Tebbe, L. Klimek, S. Klysner, M. V. Kopp, *et al.* (2018) «**Perspectives in allergen immunotherapy: 2017 and beyond**», *Allergy* 104, S5-23.
- Pineda, F. (2017) «**The future of immunotherapy with individual allergens: Immunotherapy with fungi**», *Allergologia et Immunopathologia*, 45(1):S36-38.
- Pirquet, C. V. (1906) «**Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern**», *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 34(30):1297-1300.
- Pitt, T. J., A. B. Becker, M. Chan-Yeung, E. S. Chan, W. T. A. Watson, R. Chooniedass, y M. B. Azad (2017) «**Reduced risk of peanut sensitization following exposure through breast-feeding and early peanut introduction**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2):620-625.
- Plewako, H., K. Wosińska, M. Arvidsson, J. Björkander, P. S. Skov, L. Håkansson, y S. Rak (2006) «**Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(4):346-353.
- Poljak, R. J. (1991) «**Structure of antibodies and their complexes with antigens**», *Molecular Immunology*, 28(12):1341-1345.
- Pons, L., C. Chery, a Romano, F. Namour, M. C. Artesani, y J.-L. Guéant (2002) «**The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts**», *Allergy*, 57(72):88-93.

- Pons, L., C. Chéry, N. Mrabet, H. Schohn, F. Lopicque, y J. L. Guéant (2005) «**Purification and cloning of two high molecular mass isoforms of peanut seed oleosin encoded by cDNAs of equal sizes**», *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7):659-68.
- Pons, L., A. Olszewski, y J. L. Guéant (1998) «**Characterization of the oligomeric behavior of a 16.5 kDa peanut oleosin by chromatography and electrophoresis of the iodinated form**», *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 706(1):131-40.
- Portier, P. y C. Richet (1902) «**De l'acción anaphylactique des certains venins**», *CR Séances Mem Soc Biol*, 54:170-172.
- Potaczek, D. P. y M. Kabesch (2012) «**Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants**», *Clinical and Experimental Allergy*, 42(6):852-871.
- Prausnitz, C. y H. Küstner (1921) «**Studien über die Uebermpfindlichkeit**», *Zentralbl Bakteriol*, 86:160-169.
- Prescott, S. y K. J. Allen (2011) «**Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(2):155-160.
- Prescott, S. L., R. Pawankar, K. J. Allen, D. E. Campbell, J. K. H. Sinn, A. Fiocchi, M. Ebisawa, H. A. Sampson, K. Beyer, y B. W. Lee (2013) «**A global survey of changing patterns of food allergy burden in children**», *World Allergy Organization Journal*, 6(1):21.
- Prieto, L., R. Palacios, D. Aldana, A. Ferrer, C. Perez-Frances, V. Lopez, y R. Rojas (2010) «**Effect of allergen-specific immunotherapy with purified Alt a1 on AMP responsiveness, exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH: a randomized double blind study**», *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 6(1):27.
- Primeau, M. N., R. Kagan, L. Joseph, H. Lim, C. Dufresne, C. Duffy, D. Prhcal, y A. Clarke (2000) «**The psychological burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut-allergic children**», *Clinical and Experimental Allergy*, 30(8):1135-1143.
- Puxeddu, I., A. M. Piliponsky, I. Bachelet, y F. Levi-Schaffer (2003) «**Mast cells in allergy and beyond**», *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(12):1601-1607.

- Rabinovitch, N., D. Shah, y B. J. Lanser (2015) «**Look before you LEAP: Risk of anaphylaxis in high-risk infants with early introduction of peanut**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3):822.
- Van Ree, R., W. a Van Leeuwen, P. H. Dieges, R. G. Van Wijk, N. De Jong, P. Z. Brewczynski, a M. Kroon, P. P. Schilte, K. Y. Tan, I. F. Simon-Licht, *et al.* (1997) «**Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy**», *Clinical and Experimental Allergy*, 27(1):68-74.
- Reisinger, J., F. Horak, G. Pauli, M. Van Hage, O. Cromwell, F. König, R. Valenta, y V. Niederberger (2005) «**Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2):347-354.
- Ring, J. y H. Behrendt (1999) «**Anaphylaxis and anaphylactoid reactions: classification and pathophysiology**», *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 17(4):387-399.
- Romagnani, S. (2004) «**Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(3):395-400.
- Sampson, H. A. (1988) «**Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 82(5 Pt 1):718-726.
- Sampson, H. A. (1999) «**Food allergy. Part 2: Diagnosis and management**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(6):981-989.
- Sampson, H. A. (2015) «**Historical background, definitions and differential diagnosis**», *Chemical Immunology and Allergy*, 101:1-7.
- Sampson, H. A. y R. Albergo (1984) «**Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 74(1):26-33.
- Sampson, H.A. y D.G. Ho (1997) «**Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(4):444-451.

- Sánchez-López, J., V. Gázquez, N. Rubira, L. Valdesoiro, M. Guilarte, A. Garcia-Moral, N. Depreux, L. Soto-Retes, M. De Molina, O. Luengo, *et al.* (2017) «**Food allergy in Catalonia: Clinical manifestations and its association with airborne allergens**», *Allergologia et Immunopathologia*, 45(1):48-54.
- Sander, I., S. Kespohl, R. Merget, N. Goldscheid, P. O. Degens, T. Brüning, y M. Raulf-Heimsoth (2005) «**A new method to bind allergens for the measurement of specific IgE antibodies**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 136(1):39-44.
- Sastre, J., P. Ojeda, y J. M. Ribera (2017) ***Alergológica 2015. Características generales de la muestra: Descripción sociodemográfica y sanitaria de la población de estudio.*** SEAIC.
- Satitsuksanoa, P., A. Głobińska, K. Jansen, W. van de Veen, y M. Akdis (2018) «**Modified Allergens for Immunotherapy**», *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(2):9.
- Savage, J., S. Sicherer, y R. Wood (2016) «**The Natural History of Food Allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 4(2):196-203.
- Schloss, O. (1912) «**A case of allergy to common foods**», *American Journal of Diseases of Children*, 3:342-362.
- Schloss, O. (1915) «**Allergy to common food**», *Archives of Paediatrics and Adolescent Medicine*, 32:349.
- Schmid, P., D. Simon, H. U. Simon, C. A. Akdis, y B. Wüthrich (2001) «**Epidemiology, clinical features, and immunology of the “intrinsic” (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis)**», *Allergy*, 56(9):841-849.
- Schmitt, D. A., J. B. Nesbit, B. K. Hurlburt, H. Cheng, y S. J. Maleki (2010) «**Processing can alter the properties of peanut extract preparations**», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2):1138-1143.
- Schneider, L. C., R. Rachid, J. Lebovidge, E. Blood, M. Mittal, y D. T. Umetsu (2013) «**A pilot study of omalizumab to facilitate rapid oral desensitization in high-risk peanut-allergic patients**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(6):1368-1374.
- Schroeder, J. T. (2009) «**Basophils beyond effector cells of allergic inflammation**», *Advances in immunology*, 101:123-161.

- Schwager, C., S. Kull, S. Krause, F. Schocker, A. Petersen, W. M. Becker, y U. Jappe (2015) «**Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (oleosins) from peanuts**», *PLoS ONE*, 10(4): e0123419.
- Schwager, C., S. Kull, J. Behrends, N. Röckendorf, F. Schocker, A. Frey, A. Homann, W. M. Becker, y U. Jappe (2017) «**Peanut oleosins associated with severe peanut allergy—importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(5):1331-1338.
- Shen, H. -D, S. R. Wang, R. B. Tang, Z. -N Chang, S. N. Su, y S. H. Han (1988) «**Identification of allergens and antigens of Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) pollen by immunoblot analysis**», *Clinical & Experimental Allergy*, 18(4):401-409.
- Shewry, P. R. (1995) «**Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis**», *The Plant Cell Online*, 7(7):945-956.
- Sicherer, S. H., T. J. Furlong, A. Muñoz-Furlong, A. W. Burks, y H. A. Sampson (2001) «**A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(1):128-132.
- Sicherer, S. H., R. A. Wood, D. Stablein, R. Lindblad, A. W. Burks, A. H. Liu, S. M. Jones, D. M. Fleischer, D. Y. M. Leung, y H. A. Sampson (2010) «**Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6):1191-1197.
- Sicherer, S. H. y H. A. Sampson (2018) «**Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1):41-58.
- Sicherer, S.H. y H.A Sampson (2014) «**Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment**», *Journal of allergy and Clinical Immunology*, 133(2):291-307.
- Simon, D., S. Hoesli, N. Roth, S. Staedler, S. Yousefi, y H. U. Simon (2011) «**Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1):194-199.
- Simons, F.E.R. (2010) «**Anaphylaxis**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2):S161-181.

- Singh, R. K., S. Gupta, S. Dastidar, y A. Ray (2010) «**Cysteinyl leukotrienes and their receptors: Molecular and functional characteristics**», *Pharmacology*, 85(6):336-349.
- Singh, R. K., R. Tandon, S. G. Dastidar, y A. Ray (2013) «**A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma**», *Journal of Asthma*, 50(9):922-931.
- Siraganian, R. P. (1974) «**An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine**», *Analytical Biochemistry*, 57(2):383-94.
- Skolnick, H. S., M. K. Conover-Walker, C. B. Koerner, H. A. Sampson, W. Burks, y R. A. Wood (2001) «**The natural history of peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2):367-374.
- Sörensen, S. P. L. (1909) «**Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen**», *Biochemische Zeitschrift*, 21:131-200.
- Spergel, J. M. (2006) «**Nonimmunoglobulin E-Mediated immune reactions to foods**», *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 2(2):78-85.
- Stahl Skov, P., H. Mosbech, S. Norn, y B. Weeke (1985) «**Sensitive Glass Microfibre-Based Histamine Analysis for Allergy Testing in Washed Blood Cells: Results Compared with Conventional Leukocyte Histamine Release Assay**», *Allergy*, 40(3):213-218.
- Stallings, V. A. y M. P. Oria (2016) «**Finding a path to safety in food allergy: assessment of the global burden, causes, prevention, management, and public policy**», *The National Academies Press*, 576.
- Stapel, S. O., R. Asero, B. K. Ballmer-Weber, E. F. Knol, S. Strobel, S. Vieths, y J. Kleine-Tebbe (2008) «**Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report**», *Allergy*, 63(7):793-796.
- Stone, K. D., C. Prussin, y D. D. Metcalfe (2010) «**IgE, mast cells, basophils, and eosinophils**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2):S73-80.
- Takasugi, M., E. Muta, K. Yamada, y H. Arai (2017) «**A new method to evaluate anti-allergic effect of food component by measuring leukotriene B4 from a mouse mast cell line**», *Cytotechnology*, 70(1):177-184.
- Tankersley, M. S. y D. K. Ledford (2015) «**Stinging Insect Allergy: State of the Art 2015**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 3(3):315-322.



- Tao, B., K. Bernardo, P. Eldi, N. Chegeni, M. Wiese, A. Colella, A. Kral, J. Hayball, W. Smith, K. Forsyth, *et al.* (2016) «**Extended boiling of peanut progressively reduces IgE allergenicity while retaining T cell reactivity**», *Clinical and Experimental Allergy*, 46(7):1004-1014.
- Teodorowicz, M., R. J. Terlouw, A. Jansen, H. F. J. Savelkoul, y J. Ruinemans-Koerts (2016) «**Immunological Characterization of Dutch Sesame Seed-Allergic Patients**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 169(1):13-22.
- Thyagarajan, A., S. M. Jones, A. Calatroni, L. Pons, M. Kulis, C. S. Woo, M. Kamalakannan, B. P. Vickery, A. M. Scurlock, A. Wesley Burks, *et al.* (2012) «**Evidence of pathway-specific basophil anergy induced by peanut oral immunotherapy in peanut-allergic children**», *Clinical and Experimental Allergy*, 42(8):1197-1205.
- Du Toit, G., Y. Katz, P. Sasieni, D. Mesher, S. J. Maleki, H. R. Fisher, A. T. Fox, V. Turcanu, T. Amir, G. Zadik-Mnuhin, *et al.* (2008) «**Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(5):984-991.
- Du Toit, G., G. Roberts, P. H. Sayre, M. Plaut, H. T. Bahnson, H. Mitchell, S. Radulovic, S. Chan, A. Fox, V. Turcanu, *et al.* (2013) «**Identifying infants at high risk of peanut allergy: The Learning Early about Peanut Allergy (LEAP) screening study**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1):135-143.
- Du Toit, G., G. Roberts, P. H. Sayre, H. T. Bahnson, S. Radulovic, A. F. Santos, H. A. Brough, D. Phippard, M. Basting, M. Feeney, *et al.* (2015) «**Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy**», *New England Journal of Medicine*, 372(9):803-813.
- Du Toit, G., P. H. Sayre, G. Roberts, K. Lawson, M. L. Sever, H. T. Bahnson, H. R. Fisher, M. Feeney, S. Radulovic, M. Basting, *et al.* (2018) «**Allergen specificity of early peanut consumption and effect on development of allergic disease in the Learning Early About Peanut Allergy study cohort**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4):1343-1353.
- Tontini, C., L. Marinangeli, N. Maiello, S. Abbadessa, D. Villalta, y L. Antonicelli (2017) «**Ara h 6 sensitization in peanut allergy: Friend, foe or innocent bystander?**», *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 49(1):18-21.

- Towbin, H., T. Staehelin, y J. Gordon (1979) «**Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9):4350-4354.
- Treudler, R., A. Franke, A. Schmiedeknecht, B. Ballmer-Weber, M. Worm, T. Werfel, U. Jappe, T. Biedermann, J. Schmitt, R. Brehler, *et al.* (2017) «**BASALIT trial: double-blind placebo-controlled allergen immunotherapy with rBet v 1-FV in birch-related soya allergy**», *Allergy*, 72(8):1243-1253.
- Trivedi, N. N. y G. H. Caughey (2010) «**Mast cell peptidases: Chameleons of innate immunity and host defense**», *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(3):257-267.
- Tscheppe, A. y H. Breiteneder (2017) «**Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy**», *International Archives of Allergy and Immunology*, 172(4):187-202.
- Tsoupras, a B., C. Iatrou, C. Frangia, y C. a Demopoulos (2009) «**The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants**», *Infectious disorders drug targets*, 9(4):390-399.
- Turner, P. J., S. Mehr, R. Sayers, M. Wong, M. H. Shamji, D. E. Campbell, y E. N. C. Mills (2014) «**Loss of allergenic proteins during boiling explains tolerance to boiled peanut in peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(3):751-753.
- Tzen, J. T. C. (2012) «**Integral proteins in plant oil bodies**», *ISRN Botany*, 20:121-16.
- Uhm, T. G., B. S. Kim, y Y. Chung (2012) «**Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma**», *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 4(2):68-79.
- Ulloa, F. T. de (1800) *Observaciones prácticas sobre el cacahuete, o maní de América: su producción en España, bondad del fruto, y sus varios usos, particularmente para la extracción de aceite; modo de cultivarle y beneficiarle por el bien de la nación.* Valencia.
- US Food and Drug Administration (FDA) (2004) «**Guidance for industry: Questions and answers regarding food allergens, including the food allergen labeling and consumer protection Act of 2004 (Edition 4); Final Guidance**», *Guidance*.

- Valcour, A., J. E. Jones, J. Lidholm, M. P. Borres, y R. G. Hamilton (2017) «**Sensitization profiles to peanut allergens across the United States**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 119(3):262-266..
- Valenta, R., F. Ferreira, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, V. Niederberger, I. Swoboda, y S. Vrtala (2010) «**From Allergen Genes to Allergy Vaccines**», *Annual Review of Immunology*, 28(1):211-241.
- Valenta, R., H. Hochwallner, B. Linhart, y S. Pahr (2015) «**Food allergies: The basics**», *Gastroenterology*, 148(6):1120-1131.
- Valenta, R. y D. Kraft (1996) «**Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(4):893-895.
- Van der Valk, J. P. M., M. W. J. Schreurs, R. el Bouch, N. J. T. Arends, y N. W. de Jong (2016) «**Mono-sensitisation to peanut component Ara h 6: a case series of five children and literature review**», *European Journal of Pediatrics*, 175(9):1227-1234.
- Varshney, P., S. M. Jones, A. M. Scurlock, T. T. Perry, A. Kemper, P. Steele, A. Hiegel, J. Kamilaris, S. Carlisle, X. Yue, *et al.* (2011) «**A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: Clinical desensitization and modulation of the allergic response**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3):654-660.
- Vereda, A., M. Van Hage, S. Ahlstedt, M. D. Ibañez, J. Cuesta-Herranz, J. Van Odijk, M. Wickman, y H. A. Sampson (2011) «**Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3):603-607.
- Verhoeckx, K. C. M., Y. M. Vissers, J. L. Baumert, R. Faludi, M. Feys, S. Flanagan, C. Herouet-Guicheney, T. Holzhauser, R. Shimojo, N. van der Bolt, *et al.* (2015) «**Food processing and allergenicity**», *Food and Chemical Toxicology*, 80:223-240.
- Verneris, M., M. Aveskogh, B. Munday, y L. Hellman (2002) «**Evidence for an early appearance of modern post-switch immunoglobulin isotypes in mammalian evolution (II); cloning of IgE, IgG1 and IgG2 from a monotreme, the duck-billed platypus, *Ornithorhynchus anatinus***», *European Journal of Immunology*, 32:2145-2155.
- Verrill, L., R. Bruns, y S. Luccioli (2015) «**Prevalence of self-reported food allergy in U.S. adults: 2001, 2006, and 2010**», *Allergy and Asthma Proceedings*, 36(6):458-467.

- Vickery, B. P., A. M. Scurlock, M. Kulis, P. H. Steele, J. Kamilaris, J. P. Berglund, C. Burk, A. Hiegel, S. Carlisle, L. Christie, *et al.* (2014) «**Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2):468-475.
- Vickery, B. P., J. P. Berglund, C. M. Burk, J. P. Fine, E. H. Kim, J. I. Kim, C. A. Keet, M. Kulis, K. G. Orgel, R. Guo, *et al.* (2017) «**Early oral immunotherapy in peanut-allergic preschool children is safe and highly effective**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1):173-181.
- Vieths, S., A. Hoffmann, T. Holzhauser, U. Müller, J. Reindl, y D. Haustein (1998) «**Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis**», *Allergy*, 53(46):S65-71.
- Virkud, Y. V., A. W. Burks, P. H. Steele, L. J. Edwards, J. P. Berglund, S. M. Jones, A. M. Scurlock, T. T. Perry, R. D. Pesek, y B. P. Vickery (2017) «**Novel baseline predictors of adverse events during oral immunotherapy in children with peanut allergy**», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3):882-888.
- Weber, K. y M. Osborn (1969) «**The reliability of molecular weight determinations by sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**», *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16):4406-4412.
- Van Weemen, B. K. y A. H. W. M. Schuurs (1971) «**Immunoassay using antigen-enzyme conjugates**», *The FEBS Letters*, 15(3):232-236.
- WHO (2007) «**World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Geneva, Switzerland**», *Chronic respiratory disease*, 1-146.
- Wide, L., H. Bennich, y S. G. O. Johansson (1967) «**Diagnosis of Allergy By an in-Vitro Test for Allergen Antibodies**», *The Lancet*, 290(7526):1105-1107.
- Williams, A. P., M. T. Krishna, y A. J. Frew (2004) «**The safety of immunotherapy**», *Clinical and Experimental Allergy*, 34(4):513-514.
- Witke, W. (2004) «**The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes**», *Trends in Cell Biology*, 14(8):461-469.

Woods, R. K., F. Thien, J. Raven, E. H. Walters, y M. Abramson (2002) «**Prevalence of food allergies in young adults and their relationship to asthma, nasal allergies, and eczema**», *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 88(2):183-189.

Wyman, M. (1872) *Autumnal catarrh (hay fever)*. New York: Hurd and Houghton.

Yost, C. C., A. S. Weyrich, y G. A. Zimmerman (2010) «**The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses**», *Biochimie*, 92(6):692-697.

Zachowski, A., F. Guerbette, M. Grosbois, A. Jolliot-Croquin, y J. C. Kader (1998) «**Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein**», *European Journal of Biochemistry*, 257(2):443-448.

Zambonino, M. A., J. L. Corzo, C. Muñoz, G. Requena, A. Ariza, C. Mayorga, A. Urda, M. Blanca, y M. J. Torres (2014) «**Diagnostic evaluation of hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics in a large population of children**», *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(1):80-87.

Zoss, A, R., A. Koch, C, y S. Hirose, R (1937) «**Alum-ragweed precipitate: Preparation and clinical investigation**», *Allergy*, 8(4):329–335.

Zuidmeer-Jongejan, L., M. Fernández-Rivas, M. G. T. Winter, J. H. Akkerdaas, C. Summers, A. Lebens, A. C. Knulst, P. Schilte, P. Briza, G. Gadermaier, *et al.* (2014) «**Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms**», *Clinical and Translational Allergy*, 4(1):4.

