



# **EVALUACIÓN CLÍNICA, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE LÍPIDOS (LTPs) COMO ALÉRGENOS DE *TRITICUM AESTIVUM* (PAN), *TRITICUM DURUM* (PASTA) Y MELOCOTÓN.**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO.  
GRADO EN MEDICINA.**



---

**Universidad de Valladolid**

**Autoras:** Alicia Moncada Salinero; Ligia Montero de la Fuente.  
Universidad de Valladolid. Promoción 2013-2019.

**Tutora de trabajo de fin de grado:** Alicia Armentia Medina.  
**Co-tutora:** Sara Martín Armentia.



## ÍNDICE

• ABREVIATURAS .....	1
• RESUMEN .....	2
• INTRODUCCIÓN .....	3
• HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	4
• MATERIAL Y MÉTODOS .....	4
• RESULTADOS .....	8
• DISCUSIÓN .....	11
• CONCLUSIONES .....	17
• BIBLIOGRAFÍA .....	18
• ANEXOS Y POSTER .....	21

**PALABRAS CLAVE:** Alergia, LTPs, asma, inmunoterapia.

### ABREVIATURAS

---

- LTPs: proteínas transportadoras de lípidos
- nsLTPs proteínas transportadoras de lípidos nativas
- rLTPs: proteínas transportadoras de lípidos recombinantes
- Tri a 14: LTP de trigo común o trigo utilizado para panadería
- Tri tu 14: LTP recombinante de trigo duro o trigo utilizado para hacer pasta
- Pru p 3: LTP de melocotón
- nsPru p 3: LTP nativa de melocotón
- BSA: seroalbúmina bovina
- BA: “Baker asthma” o asma del panadero
- WFA/WDEIA: “wheat food allergy” o alergia alimentaria a trigo/ “wheat dependent exercise induced allergy” o alergia inducida por ejercicio trigo dependiente.
- SPT: “skin prick test” o prueba cutánea de alergia
- BCT: “bronchial challenge test” o prueba de provocación inhalada
- DBPCFC: provocación oral doble-ciego placebo-control
- FEIA: enzimoimmunoensayo con marcaje fluorimétrico
- ImmunoCAP®: nombre comercial de un tipo de FEIA
- SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- HURH: Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid.

## RESUMEN

---

**INTRODUCCION:** La alergia es una reacción adversa de causa inmunológica que se presenta en un individuo tras entrar en contacto con un alérgeno. La alergia al trigo es la más común entre las alergias a cereales. Se distinguen dos cultivos, *T.aestivum* (pan) y *T.durum* (pasta). Las LTP pertenecen a la superfamilia de prolaminas, siendo la defensiva su función principal. La clínica de alergia a las LTPs provoca síntomas de aparición inmediata, en menos de una hora y graves en su mayoría. Ha sido identificada una LTP causante de su alergenicidad, conocida como Tri a 14 y ha sido relacionada con *T.aestivum*; las LTPs de *T.durum* no son conocidas y este es el principal punto de partida de este trabajo.

**HIPOTESIS Y OBJETIVOS:** Tanto el trigo común como el trigo duro están involucrados en alergia y asma. Las moléculas alergénicas del trigo duro no se han logrado identificar hasta el momento. El objetivo del estudio es demostrar que existe una LTP de trigo duro (pastas) responsable de su alergenicidad.

**MATERIAL Y METODOS:** Se incluyen en el estudio 39 sujetos en total: 7 pacientes controles y 32 con alergia; divididos a su vez en dos grupos: 20 con asma del panadero (BA) estudiados en el HURH mediante prick, IgE a trigo y provocación con harina; y 12 con alergia alimentaria a trigo (WFA/WDEIA) estudiados con las mismas pruebas y provocación oral. Se realizó un análisis inmunológico (por microarrays) en el HURH y el análisis de la estructura tridimensional y reactividad cruzada de las proteínas implicadas se realizó en la Universidad de Bochum (Dortmund University).

**RESULTADO:** Validación de la molécula recombinante de *T.durum*: Tri tu 14. Un 92% de los pacientes presentaban InmunoCAP positivo frente a rTri a 14 y valores de IgE específica positivo para extracto de trigo de harina (*T.aestivum*). Se incrementó la sensibilidad diagnóstica al utilizar LTP de trigo duro (8%). Todos los pacientes con alergia alimentaria estaban sensibilizados a Tri tu 14; solo el 77% de los asmáticos lo estaban. Pru p3 tiene mayor similitud con Tri tu 14 que con Tri a 14: los pacientes con BA reaccionan menos a Pru p3.

**CONCLUSIONES:** Se ha confirmado la existencia de Tri tu 14, LTP de *T.durum* (pasta). Los pacientes con alergia alimentaria a trigo reaccionan más frente a Tri tu 14 que a Tri a 14; al contrario que los asmáticos. El descubrimiento de nuevas LTP como alérgenos del trigo permite un diagnóstico más exacto, evita los graves riesgos por alergia a LTPs y posibilita una diana terapéutica con inmunoterapia. Las condiciones ambientales adversas y las modificaciones biotecnológicas que se realizan para que las semillas de cereales sean más resistentes frente a agresiones externas incrementa la concentración de proteínas de defensa como LTPs, aumentando la probabilidad de alergias.

## INTRODUCCIÓN

---

La alergia es una reacción adversa de causa inmunológica que se presenta en un individuo tras entrar en contacto con un alérgeno. Esto sucede en personas con sensibilización previa, incluso con mínimas cantidades.

La alergia alimentaria se estima alrededor del 1,5% en la población general, siendo mayor entre los niños menores de tres años (5-7%). Tiene un impacto económico importante en la sociedad y en el sistema sanitario; además, numerosos estudios en los últimos 10 años han demostrado que esta está asociada con un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, con efectos a nivel físico, social y emocional o psicológico. <sup>(1)</sup>

El diagnóstico de la alergia a un alimento mediada por IgE requiere: que el paciente esté sensibilizado al mismo, es decir, la presencia en su organismo de anticuerpos IgE específicos a uno o más de sus alérgenos y que se produzcan síntomas clínicos tras la exposición a ese alimento. <sup>(2)</sup>

La alergia al trigo es la más común entre las alergias a cereales. Se distinguen dos cultivos de trigo, *T.aestivum* (usado para harinas y productos de panadería) y *T.durum* (usado para pasta, pizza, bulgur, sémola y cuscús), ambos involucrados en reacciones alérgicas. Se manifiesta con una amplia gama de síntomas y síndromes clínicos, como exacerbaciones de dermatitis atópica, anafilaxia inducida por el ejercicio, esofagitis eosinofílica (EA) y asma de panadero (BA), entre otros. <sup>(3)</sup>

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) pertenecen a la superfamilia de prolaminas. Tienen una amplia presencia en el reino vegetal y su función principal es la defensiva ante agresiones externas. <sup>(4)</sup>

Las manifestaciones clínicas por las LTPs en pacientes alérgicos desencadenan síntomas de aparición inmediata, casi siempre en menos de 1 hora tras la ingestión y claramente relacionado con ella. Los cuadros clínicos pueden ser locales o sistémicos, comprometiendo la vida del paciente en los casos más graves. <sup>(4)</sup>

En el caso del trigo ha sido identificada una LTP causante de su alergenidad, conocida como Tri a 14 y ha sido relacionada con *T.aestivum*, cultivo de trigo común más utilizado en harinas de panadería. <sup>(5)</sup> Sin embargo, las LTPs de *T.durum* o cultivo de trigo duro utilizado para pastas no son conocidas, y este es el principal punto de partida de este trabajo.

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

La sobreexpresión de nsLTPs en el trigo duro se considera que incrementa la resistencia contra patógenos de las plantas. Tanto el trigo común como el trigo duro están involucrados en procesos relacionados con la alergia a alimentos y asma del panadero. Las moléculas alergénicas del trigo duro no se han logrado identificar hasta el momento, por este motivo son objeto de nuestro estudio.

El objetivo del estudio es demostrar que existe una LTP de trigo duro (pastas) responsable de su alergenicidad de forma análoga a los alérgenos ya conocidos de Tri a 14 y Pru p 3, responsables de la alergia a la harina de trigo y melocotón.

## MATERIAL Y METODOS

---

Se incluyen en el estudio 39 sujetos en total: 7 pacientes sin clínica a modo de controles y 32 con sintomatología alérgica. Éstos últimos fueron divididos a su vez en dos grupos en función de la clínica: 20 pacientes españoles con asma del panadero (BA) con hiperreactividad bronquial a harina de trigo común usado en panaderías; y 12 pacientes italianos: 8 con alergia alimentaria al trigo (WFA) y 4 con “anafilaxia inducida por ejercicio trigo dependiente” (WDEIA).

Todos los sujetos del estudio fueron preseleccionados por su sensibilización previa a Tri a 14, ya sea por SPT (para pacientes con asma del panadero) o ImmunoCAP positivo (para los pacientes alérgicos al trigo, WDEIA y los controles). *Anexo: tabla 1. Pacientes y resultados de las pruebas realizadas.*

En el caso de los pacientes italianos con WDEIA se confirmó la clínica mediante “open challenge test” que consiste en la administración de 100g de pasta cocida (*T. durum*) seguida de ejercicio. En los pacientes con alergia al trigo se confirmó mediante prueba de provocación oral doble-ciego placebo-control (DBPCFC) (5/8 pacientes). Cabe mencionar que no se realizaron estas pruebas en el caso de 3 pacientes alérgicos al trigo, dos con historia de anafilaxia severa y uno de ellos con asma del panadero asociada.

En el HURH fueron seleccionados de la base de datos de pacientes diagnosticados como alérgicos al trigo 20 sujetos con asma del panadero (BA: Baker Ashtma). Las manifestaciones alérgicas se evidenciaron mediante provocación inhalada (BCT: Bronchial challenge test) y skin prick test (SPT).

Una de las técnicas que se emplean para el diagnóstico de enfermedades alérgicas es la detección de anticuerpos IgE específicos frente a los alérgenos responsables de las mismas. Estos anticuerpos están presentes en el suero de los pacientes pudiendo ser identificados mediante un autoanalizador (ImmunoCAP®, ThermoFisher-Phadia) que permite realizar un estudio in vitro cualitativo y semicuantitativo. Todos los sueros de los pacientes del HURH que participaron en el estudio fueron sometidos a este inmunoanálisis por microarrays que incluye la posible detección de anticuerpos frente a varias moléculas y proteínas alergénicas ya identificadas. *Anexo: Fig. 13. Informe ejemplo ImmunoCAP® realizado en el HURH.*

### **Skin prick test (SPT)**

Es una prueba muy relevante en el campo de la alergología que literalmente se traduce como “prueba de pinchazo en la piel” y, como su nombre indica, consiste en exponer a nivel cutáneo el alérgeno en la piel del paciente y medir la reacción cutánea que se produce en mm<sup>2</sup>.

El SPT se realizó de acuerdo con los procedimientos estándar siguiendo las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e inmunología clínica. Todos los pacientes fueron sometidos a SPT utilizando un extracto de trigo (*T.aestivum*) (PBS 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7.4), un extracto de melocotón comercial (ALK-Abelló), y proteínas purificadas (formas nativas y recombinantes de Tri a 14 y Pru p 3). El SPT se realizó mediante la prueba del trigo y extractos de melocotón de hasta 1 mg / ml y las proteínas purificadas hasta 20 µg / ml. Se utilizó un dispositivo estéril para cada prueba.

Fosfato de histamina (10 mg / ml) y solución salina al 0,9% estéril fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. Un diámetro  $\geq 3$  mm<sup>2</sup> mayor que el control negativo a los 15 minutos de la punción se consideró un resultado positivo.

### **Pruebas de provocación en el HURH: Bronchial Challenge Test**

El BCT se realizó doble ciego como lo describe Palacin et al <sup>(6)</sup> con modificaciones<sup>(5)</sup>. Se utilizó un extracto de trigo con una concentración de proteína de 5 mg / ml y zumo de melocotón.

La espirometría se realizó siguiendo las recomendaciones de la American Thoracic Society y la Sociedad europea de Neumología. Se generaron partículas aerosolizadas utilizando un DeVilbiss 646 presurizado continuo. El nebulizador se inhaló durante 2 minutos a un volumen respiratorio normal, comenzando con el control PBS y con intervalos de 10 minutos, se fueron aumentando las concentraciones del extracto.

La dosis se determinó por valoración de punto final basada en la primera dilución con respuesta positiva al SPT. Una respuesta positiva se definió como una caída > 20% del volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada (FEV1).

Después de BCT específico, se realizaron mediciones del flujo espiratorio máximo cada hora y se registraron durante 9 horas. BCT se realizó con el mismo extracto en 5 controles sanos, todos los cuales tuvieron resultados negativos.

### **Estudio molecular**

Los análisis más sofisticados a nivel molecular requerían procedimientos y materiales no disponibles en nuestro hospital por lo que se realizaron enviando los sueros de nuestros pacientes desde el HURH a la Universidad de Bochum (Dortmund University) al igual que los sueros de los 12 pacientes italianos.

Para obtener conclusiones acerca de las LTPs de trigo ha sido necesario un minucioso estudio molecular. En primer lugar, era necesario obtener suficiente LTPs de Tri tu 14 (trigo duro), molécula con la que queremos demostrar alergenicidad específica. La purificación de esta LTP directamente para extraer nsLTP Tri tu 14 (molécula nativa presente en el trigo duro) no proporciona suficiente rendimiento por lo que es necesario purificarla mediante una clonación molecular y obtener así una LTP Tri tu 14 recombinante.

Posteriormente se realizaron pruebas comparativas para demostrar su validez mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y tridimensional respecto a otras LTPs conocidas previamente.

A continuación, se expusieron los sueros de los pacientes alérgicos, obteniendo la reactividad correspondiente, para demostrar que la nueva molécula recombinante es válida para la comparación con las otras LTPs objeto de estudio.

Una vez quedó validada la molécula recombinante, se utilizó para medir la reactividad de los sueros de nuestros pacientes a dicha LTP. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis InmunoCAP® enfrentando los sueros de los pacientes con las LTPs a estudio y comprobar que LTP es mas potente. Se enfrentó Tri tu 14 con Tri a 14, Tri tu 14 frente a extracto de trigo completo, Tri tu 14 frente a Pru p3 y Tri a 14 frente a Pru p 3.

En segundo lugar, se realizó una selección de dos sueros de pacientes con diferente clínica (asma/ alergia alimentaria) para evaluar las propiedades de reactividad cruzada.

### **Clonación molecular y purificación de *T. durum* LTP y recombinante Tri a 14 y Pru p 3**

El cDNA de longitud completa de *T. durum* LTP Tri tu 14 (TdLTP4, número de acceso de Gen-Bank JF799976) fue clonado y secuenciado. Para la expresión recombinante

en *K. pastoris* (X33), se clonó un gen sintético optimizado de un codón (GeneArt Life Technologies, Regensburg, Alemania) en los sitios de restricción EcoRI y XbaI del plásmido de expresión de levadura pPICZαA. Tri tu 14 se expresó como proteína no marcada y se purificó como se describe<sup>(7)</sup> con ligeras modificaciones. Posteriormente se indujo la expresión de proteínas en 3 litros de cultivo de *K. pastoris* con metanol al 0,5% a una OD600 = 1.0 durante 5-6 días a 30 ° C. El sobrenadante se separó del cultivo celular mediante centrifugación a 6.000 g durante 20 minutos y se sometió a filtración de flujo cruzado (Ultrasette, 3 kDa, Pall, Dreieich, Alemania). El filtrado (400 ml) se dializó contra NaAc (50 mM, pH 5,0) y se aplicó a cromatografía de intercambio catiónico HiTrap SP / HP (GE Healthcare, Munich, Alemania).

La nsPru p 3 se purificó como se describe en otra parte<sup>(8)</sup> Thermo Fisher (Scientific, Uppsala, Suecia) proporcionó amablemente el Tri a 14.01 recombinante.

### **Caracterización fisicoquímica de alérgenos y extractos de proteínas**

Los extractos de proteínas del trigo duro (cultivo de trigo tunecino “Om Rabia3”) y el trigo común se prepararon a partir de grano entero y salvado, respectivamente, utilizando el método descrito<sup>(9)</sup> con algunas modificaciones. Las proteínas de semillas / salvado (20 g cada una) se extrajeron con 100 ml de Tris-HCl (100 mM), EDTA (10 mM, pH 4.5) durante 1 hora a 4 ° C. El extracto se sometió a centrifugación (10.000 g durante 30 minutos a 4 ° C), se pasó por un filtro de 0,45 µm y se almacenó a 4 °C para los ensayos de ELISA y de liberación de histamina.

Se sometieron Tri tu 14 recombinante, rTri a 14, nPru p 3 (2 µg / línea) y extractos de *T. durum* y *T. aestivum* (15 µg / línea) a SDS-PAGE (16%) en condiciones reductoras y GelCode Blue Tinción segura de proteínas (Fisher Scientific, Nidderau, Alemania). La concentración de proteínas de los extractos de trigo se determinó mediante el reactivo de Bradford Roti-Nanoquant 5 × (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania), mientras que el contenido de proteínas de las proteínas purificadas se determinó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Fisher Scientific). El modelado de la estructura 3D de Tri tu 14 se realizó utilizando Swissmodel ([www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org))<sup>(10)</sup> y maíz nsLTP como plantilla. La superposición de las estructuras se realizó utilizando el Sistema de Gráficos Moleculares PyMOL, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

### **Ensayos de unión a IgE y reactividad cruzada**

Los valores específicos de IgE se determinaron mediante el uso de ImmunoCAP para rTri tu 14 y para rTri a 14.01, rPru p 3 y *T. aestivum* wheat (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). Los niveles específicos de IgE se consideraron positivos si ≥0.35 kUA/L. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism mediante

análisis de estadística descriptiva y posteriormente análisis de correlación de los resultados.

La detección de nsLTP en extracto de trigo duro se realizó mediante un ensayo de inhibición de inmunotransferencia de IgE. El extracto de trigo duro se sometió a SDS-PAGE (100 µg de proteína / cm) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana, se incubó durante la noche con un suero combinado (Sueros de pacientes # 26 y # 27, 1: 8) que contenía 200 µg / ml de inhibidores (ya sea rTri tu 14 y nPru p 3 o BSA como control). La visualización se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal IgE-AP (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) y el kit de reactivo de sustrato AP (Bio-Rad, Munich, Alemania).

La reactividad cruzada entre los diferentes nsLTP se evaluó mediante ensayos ELISA de inhibición de IgE. <sup>(11)</sup>

### Pruebas de potencia alergénica

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante no alérgico y se eliminó la FcεRI de la IgE mediante tratamiento con ácido láctico como se describe en otra parte <sup>(12)</sup>. Posteriormente, las células se sensibilizaron pasivamente con el suero del paciente. La liberación de histamina se realizó con *T. aestivum* y extracto de *T. durum* (1 ng / ml-10 µg / ml) y con rTri tu 14 purificada, rTri a 14 y nPru p 3 (100 pg / ml-1 µg / ml). Los niveles de liberación de histamina inducidos por alérgenos ≥10% del contenido total de histamina de las células se consideraron positivos.

## RESULTADOS

---

### 1. Validación de la molécula recombinante de *T.durum*.

- La LTP nativa (nsLTP) de *T.durum* (Tri tu 14) comparte un 52% de la secuencia de aminoácidos con la nsLTP del melocotón (Pru p3) y un 48% y 41% con las dos isoformas de nsLTP de *T. aestivum* (Tri a 14.01 y 14.02) respectivamente. *Anexos: Fig. 1.*
- La superposición de las estructuras tridimensionales de las LTPs de Tri a 14, Pru p3 y Tri tu 14 pone de manifiesto que la proporción de aminoácidos conservados expuestos en la superficie parece mayor entre Tri tu 14 y Pru p3 que entre Tri tu 14 y Tri a 14. *Anexos: Fig. 2.*
- Se generó Tri tu 14 recombinante (rTri tu 14) con el propósito de afinar el diagnóstico y evaluar su potencia alergénica.



- La masa molecular aparente de Tri tu 14 estimada por electroforesis (SDS-PAGE) se ajusta a la masa teórica de alrededor de 8,95 kDa, y es comparable con la de rTri a 14.01 y nPru p 3. *Anexos: Fig. 3.*
2. Reactividad IgE ante Tri tu 14 en pacientes con alergia alimentaria a trigo y asma del panadero
- Con el objetivo de medir la sensibilización IgE a Tri tu 14 se realizó un análisis ImmunoCAP® y los valores específicos para IgE Tri tu 14 se correlacionaron con los valores de IgE para trigo (*T.aestivum*), Tri a 14.01 y Pru p3.
  - Como se ha explicado previamente la sensibilización a Tri a 14 (ImmunoCAP® o SPT positivo) fue el criterio de inclusión en este estudio, tanto para casos como controles. Solo un 92% (23/25) de los pacientes que presentaban ImmunoCAP® positivo a rTri a 14 (25/25) mostraron también valores de IgE específica positivos para extracto de trigo (*T.aestivum*). Es destacable que, sin embargo, los dos restantes sí fueron reactivos a Tri tu 14, lo que se traduce en un incremento de la sensibilidad diagnóstica al utilizar LTP de trigo adicional al extracto del cereal para este subgrupo de pacientes (8%, 2/25). *Anexos: Fig. 4.*
  - Los pacientes con FA/WDEIA (9/12) presentaron niveles superiores de IgE específicos frente a Tri Tu 14 (media = 17.14 kUA / L, mediana = 8.75 kUA/L) que frente al extracto de cereal completo (media = 5.40 kUA / L, mediana = 2.28 kUA / L) *anexos: fig.5.*, diferencia que fue menos prominente en los pacientes con asma del panadero, con valores de IgE específicos a Tri tu 14 (media = 10.58 kUA / L, mediana = 2.85 kUA / L) en comparación con el trigo (media = 5.14 kUA / L, mediana = 4,6 kUA / L). *Anexos: fig.6.* Estos hallazgos se reflejaron en los resultados de InmunoCAP mostrando una correlación débil ( $R = 0.16$ ) entre los niveles de IgE específicos para el extracto de trigo y Tri tu 14 en pacientes con FA / WDEIA. *Anexos: fig. 7.*
  - Los valores específicos para Tri tu 14 y Tri a 14 revelaron una buena correlación general ( $R = 0,886$ ). Dicha correlación fue más pronunciada en el subgrupo de pacientes alérgicos a FA / WDEIA ( $R = 0,930$ ). *Anexos: fig. 7.* Cabe destacar que todos los pacientes (100%) con FA / WDEIA estaban sensibilizados a Tri tu 14, mientras que solo el 77% (10/13) de los asmáticos lo estaban (*anexo fig.6*).
  - Dado que los datos anteriores sugieren que la sensibilización a Tri tu 14 está fuertemente asociada con FA / WDEIA, se analizó con más detalle el compromiso de Pru p 3 en la sensibilización al trigo. La sensibilización de IgE a Pru p 3 se pudo detectar en el 80% (20/25) de todos los pacientes, en el 69%

(9/13) de los pacientes con asma de panadero y en el 92% (11/12) de los pacientes con FA / WDEIA. *Anexos: fig. 6.*

- El valor de IgE específico más alto se presentó para Tri Tu 14 (mediana = 5.29 kUA / L), mientras que para Tri a 14 fueron menores (mediana = 1.79 kUA / L). En el caso de los dos subgrupos, los pacientes con FA/WDEIA revelaron una mediana de la IgE específica para Tri tu 14 superior en comparación a los de asma del panadero (8.75 kUA / L vs 2.85 kUA / L). *Anexos: fig. 4.*

### 3. Propiedades reactividad cruzada IgE Tri Tu 14 con sueros seleccionados.

La reactividad cruzada de IgE entre Tri tu 14, Tri a 14 y Pru p 3 se analizó adicionalmente utilizando sueros individuales en experimentos de inhibición cruzada de ELISA dependientes de la dosis. Los resultados de dos pacientes, un paciente con asma de panadero (n°15) y un paciente con alergia alimentaria al trigo (n°26), ambos con una fuerte reactividad a cada uno de los nsLTP analizados (clases CAP  $\geq 4$ ) se muestran en la *Fig.8*.

Usando el suero n° 15 y Tri tu 14, Tri tu 14 en sí mismo puede superar la unión a IgE (autoinhibición) hasta el 100%. Al aplicar Tri a 14 como inhibidor, casi no se pudo observar la competencia de la unión a IgE, mientras que Pru p 3 es capaz de inhibir la unión de IgE a Tri tu 14 hasta un 70% incluso a bajas concentraciones. Tri tu 14, pero también Pru p 3, mostró solo hasta el 20% de la capacidad inhibitoria. Por el contrario, la unión a IgE se anuló casi completamente al preincubar el suero con *T. durum* y el extracto de *T aestivum*, lo que indica la presencia de nsTLPs de Tri a 14 (cruzadas) reactivas en ambas semillas de trigo. Sorprendentemente, no se demostró que ninguno de los nsLTP de trigo ni los extractos de trigo compitieran con la unión de IgE a Pru p 3. *Anexo: Fig.8.*

Es de destacar que el suero n°26 mostró diversas propiedades de reactividad cruzada. El uso de Tri tu 14 en la fase sólida Pru p 3, así como en Tri a 14 y los extractos de trigo muestran una clara capacidad inhibitoria que indica la presencia de Tri tu 14 reactiva nsLTP en ambas semillas de trigo. A diferencia del suero n°15, las tres nsLTP poseen importantes propiedades de reactividad cruzada que indican la superposición de los epítomos de IgE para este paciente. Curiosamente, la reactividad cruzada de IgE entre Pru p 3 y Tri tu 14 (pero de nuevo no entre Pru p 3 y Tri a 14) fue más pronunciada en el paciente alérgico n°26, que no fue el caso del paciente n°15 que expresaba BA. *Anexos: fig. 8.* BSA utilizado como control negativo no mostró actividad inhibitoria no específica en todos los entornos experimentales.

#### 4. Tri tu 14 revela potencia alergénica

Con el objetivo de evaluar la potencia alergénica de los nsLTPs de trigo y melocotón en pacientes alérgicos al trigo, se realizó un ensayo de liberación de mediadores in vitro con basófilos sensibilizados pasivamente. Tri tu 14 y Pru p 3 pudieron desencadenar una liberación de histamina de hasta el 20% y 60% en los pacientes nº15 y nº26 respectivamente. En el caso del paciente nº15, Tri a 14 no mostró potencia biológica alguna mientras que en el paciente nº26 produjo una liberación de hasta el 20%. *Anexos: Fig.9.*

## DISCUSIÓN

---

La alergia es una reacción adversa de causa inmunológica que se presenta en un individuo tras entrar en contacto con un alérgeno. Sucede en personas con sensibilización previa, incluso con mínimas cantidades. Se desconoce la incidencia real de este problema, aunque se estima alrededor del 1,5% en la población general, siendo mayor entre los niños menores de tres años (5-7%).<sup>(3)(13)</sup>

Por otro lado, las reacciones adversas reproducibles que no están mediadas por mecanismos inmunológicos se denominan intolerancias alimentarias. El diagnóstico de la alergia a un alimento mediada por IgE requiere: que el paciente esté sensibilizado al mismo, es decir, la presencia en su organismo de anticuerpos IgE específicos a uno o más de sus alérgenos y que se produzcan síntomas clínicos tras la exposición a ese alimento.

La alergia tiene un impacto económico importante en la sociedad y en el sistema sanitario. Además, numerosos estudios en los últimos 10 años han demostrado que ésta está asociada con un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, con efectos a nivel físico, social y emocional o psicológico.<sup>(1)</sup>

Los síntomas que presentan los pacientes varían en función del grado de sensibilización y exposición a ese alimento. El 80% de los casos presentan manifestaciones cutáneas (prurito, rash peribucal, urticaria-angioedema, edema de glotis). Con un 30 % se siguen en frecuencia los síntomas digestivos (dolor cólico, vómitos, diarrea). Los cuadros respiratorios (tos, rinitis, asma) son consecuencia de inhalación más que ingestión del

alimento. Es destacable la posibilidad de shock anafiláctico no tanto por su frecuencia sino por su potencial letalidad. <sup>(14)</sup>

La más común entre las alergias a cereales es la alergia al trigo. Las respuestas inmunológicas a las proteínas de grano pueden ser mediadas y / o no mediadas por IgE. Se manifiesta con una amplia gama de síntomas y síndromes clínicos, como exacerbaciones de dermatitis atópica, anafilaxia inducida por el ejercicio, esofagitis eosinofílica (EA) y asma de panadero (BA). <sup>(15)</sup>

El diagnóstico se basa en la historia clínica, pruebas cutáneas (SPT), de provocación y de laboratorio. El gold estándar es la provocación oral doble ciego placebo control (DBPCFC) bajo supervisión médica; aunque la cuantificación de la IgE específica y SPT puede ser suficiente en casos de reacciones graves.

La anafilaxia inducida por ejercicio trigo dependiente (WDEIA) es una forma rara de alergia al trigo que generalmente se presenta en adolescentes o adultos jóvenes con reacciones severas y anafilaxia. El cuadro ocurre de manera impredecible con la ingesta de trigo, aunque no siempre que se consume. En la mayoría de los pacientes están presentes uno o más cofactores para que ocurra una reacción; siendo tras ejercicio físico lo más frecuente, aunque también está descrito después del consumo de alcohol o AINEs. <sup>(16)</sup>

El asma del panadero es el asma ocupacional más frecuente en la población, hace referencia a las reacciones respiratorias y naso-oculares que se producen tras inhalar harina de trigo, causando frecuentemente rinitis y asma. Estos pacientes suelen tolerar la ingestión de trigo, lo que retrasa el diagnóstico. La prueba gold estándar para el diagnóstico es la provocación bronquial con harinas de trigo y centeno, pero esta prueba puede ser difícil de realizar en centros no especializados. <sup>(17)</sup>

Los trabajadores cerealistas (agricultores, molineros, empaquetadores de piensos) y aquellos que trabajan en el ambiente panadero y confitero están sometidos a multitud de estímulos antigénicos. <sup>(6)</sup> En nuestra zona de Castilla, se suele trabajar en pequeñas factorías familiares con pésimas condiciones de aireación, a lo que se le añade el hecho de que no suelen usar medidas de protección por las molestias que provocan. El problema radica en que las harinas que emplean liberan gran cantidad de partículas antigénicas en dispersión. <sup>(18)</sup>

Debido a la gran prevalencia de este tipo de asma en nuestra región (el 25% de los pacientes expuestos padecen asma profesional), se ha investigado lográndose aislar, purificar y evaluar la alergenicidad de las diferentes proteínas del *T.aestivum* (principal

especie de trigo cultivada para hacer pan) con el objetivo de alcanzar un mayor control ambiental y terapéutico de esta enfermedad. <sup>(5)</sup>

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) pertenecen a la superfamilia de prolaminas. Tienen una amplia presencia en el reino vegetal, siendo su principal función la defensiva. Presentan una mayor concentración en las cubiertas vegetales, lo que explica la mayor alergenicidad de la piel respecto a la pulpa de ciertos alimentos (sobre todo las rosáceas: melocotón, pavia, albaricoque, ciruela, etc.). Sus propiedades estructurales les confieren una gran estabilidad, siendo resistentes a las altas temperaturas, a la proteólisis y a cambios bruscos en el pH. Esto facilita la sensibilización por vía digestiva y su persistencia tras los procesamientos llevados a cabo por la industria alimentaria.

Las LTPs en alimentos se encuentran en frutas (albaricoque, cereza, ciruela, fresa, limón, manzana, melocotón, naranja, pera y uva), frutos secos (almendra, avellana, cacahuete, castaña y nuez), verduras, hortalizas o productos derivados de las semillas de los cereales, además de otras partes de las plantas como los pólenes (entre otros Artemisia, Olea, plátano de sombra y Parietaria, las hojas o el látex, etc). <sup>(4)</sup>

Las manifestaciones clínicas por las LTPs en pacientes alérgicos desencadenan síntomas de aparición inmediata, casi siempre en menos de 1 hora tras la ingestión y claramente relacionado con ella. Los cuadros clínicos pueden ser locales o sistémicos, comprometiendo la vida del paciente en los casos más graves.

La LTP de melocotón, Pru p3, es el alérgeno más relevante en la alergia a frutas rosáceas en la población española, y suele ser el sensibilizante primario en la mayoría de los pacientes alérgicos a esta familia de alérgenos. <sup>(19)</sup>

Se distinguen dos cultivos de trigo, *T.aestivum* (usado para harinas y productos de panadería) y *T.durum* (usado para pasta, pizza, bulgur, sémola y cuscús), ambos involucrados en reacciones alérgicas. La inducción de la expresión de las nsLTP aumenta la tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental y a los patógenos, estas moléculas defensivas responsables de la alergenicidad, se han identificado solamente para *T.aestivum*, pero no para *T.durum*. <sup>(20)</sup>

27 alérgenos de *T.aestivum*, incluyendo el alérgeno mayor nsLTP Tri a 14, han sido registrados en la base de datos de la OMS/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Por tanto, la evaluación de la alergenicidad de nsLTP de *T.durum* es el objetivo del presente estudio.

Para la evaluación de la alergenicidad de un determinado alimento se debe comenzar por la selección de un grupo de pacientes con una correcta caracterización clínica corroborada mediante una provocación oral doble ciego controlada con placebo positiva o historia de anafilaxia documentada, condición que contraindica la realización de provocación oral por el alto riesgo que conlleva. <sup>(15)</sup>

En este estudio fueron reclutados 32 pacientes alérgicos al trigo: 20 españoles con asma del panadero y 12 italianos con FA/WDEIA siendo la positividad del ImmunoCAP® a Tri a 14 el principal criterio de inclusión. 25/32 pacientes fueron positivos, 13 con BA y 12 con FA/WDEIA. La alergia al trigo fue confirmada clínicamente en el grupo con BA mediante test de provocación bronquial con *T.aestivum*, y con pasta mediante DBPCFC o provocación oral seguida de ejercicio en los pacientes con FA/WDEIA.

Para analizar las proteínas alergénicas, en primer lugar, se separan físicamente mediante SDS-PAGE para posteriormente realizar un inmunoblot que incluye transferencia e incubación de las proteínas con los sueros de los pacientes alérgicos.

Otro sistema de análisis se basa en el enzoinmunoensayo con marcaje fluorimétrico (FEIA, por sus siglas en inglés), siendo el más utilizado en la práctica clínica para la determinación de IgE específica en suero. Las unidades empleadas son kilo unidades de IgE por litro (kU/L: 1 U = 2,4 ng de IgE). <sup>(21)</sup>

Los ensayos de inhibición de CAP (ImmunoCAP®: nombre comercial de un tipo de FEIA) se basan en la unión de IgE específica a antígenos en solución inhibiendo así la unión entre IgE y el antígeno inmovilizado en la fase sólida. Estos ensayos se emplean en experimentos de competición de IgE específica con el objetivo de evaluar la reactividad cruzada entre diferentes alérgenos. <sup>(22)</sup> Mediante dicho ensayo, la nsLTP de *T.durum* fue identificado como alérgeno en el 88% de los pacientes sensibilizados previamente a Tri a 14, designándose con el nombre de Tri tu 14 por la OMS/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Además, los resultados del ImmunoCAP® revelaron que, gracias a la adición de Tri tu 14 al extracto de trigo completo, se incrementó la sensibilidad diagnóstica en 2/25 pacientes previamente negativos. Cabe destacar que debido a que los pacientes del presente estudio fueron preseleccionados por su IgE reactiva frente a Tri a 14, solo podemos especular sobre la prevalencia de sensibilización a Tri tu 14 en este grupo de sujetos.

Los resultados del ImmunoCAP® apuntan que la sensibilización a Tri tu 14 es más prominente en el grupo de pacientes con FA/WDEIA puesto que todos ellos expresaron IgE específica para Tri Tu 14 (R=0.930), mientras que en el grupo con BA 3/13 no mostraron dicha sensibilización (R=0.781). Además, estos niveles fueron mucho más altos en los primeros (FA/WDEIA).

Por otro lado, la sensibilización a Pru p 3 fue más prominente en FA/WDEIA que en pacientes con BA. Esto es concordante con las conclusiones de otros autores que afirman que Pru p 3 tiene un rol importante como sensibilizador en la alergia a alimentos.

(8)(19)

El fenómeno de la reactividad cruzada ocurre cuando anticuerpos IgE específicos frente a un determinado alérgeno reconocen una proteína de otra fuente alérgica con características similares. La presencia de IgE específica frente a un alérgeno no siempre es clínicamente relevante, la existencia de reactividad cruzada es una de las causas frecuentes de estos falsos positivos. Esto se explica por la presencia de componentes alérgicos homólogos en distintas fuentes alérgicas, en ocasiones no relacionadas taxonómicamente. <sup>(23)</sup>

Para que exista el fenómeno de reactividad cruzada entre dos proteínas, debe darse una homología en su secuencia de aminoácidos superior al 70%, siendo improbable si comparten menos del 50%. En otros casos, es debido a la similitud de sus estructuras terciarias. <sup>(24)</sup>

La reactividad cruzada entre estructuras moleculares contenidas en alimentos y aeroalérgenos da lugar a fenómenos clínicos o síndromes como el síndrome látex-frutas, cuya base molecular son las quitinasas o gramíneas-rosáceas con la profilina como responsable, y a la familia de inhibidores de alfa-amilasas de cereales de diferentes harinas implicados en la alergia ocupacional conocida como "asma del panadero". Por otra parte, la sensibilización frente a alérgenos como las LTP son causas de reactividad cruzada inmunológica entre alimentos (frutos secos, leguminosas y/o semillas, rosáceas y otras frutas, hortalizas y vegetales). <sup>(3)</sup> *Anexo: fig. 10.*

Tras los experimentos de inhibición cruzada de las IgE séricas de dos pacientes diferentes (nº15 con BA y nº26 con WFA/WDEIA) se han extraído resultados que concluyen que Tri tu 14 está ligado a la FA/WDEIA. En ellos, la reactividad cruzada de las IgE específicas frente a Pru p 3 y las LTPs de trigo (Tri tu 14 en particular) fue claramente demostrada. Por el contrario, la reactividad cruzada entre Pru p 3 y Tri a 14 fue menos prominente en el paciente con BA. Estos resultados están en la línea de trabajo de Palacin <sup>(25)</sup> y quienes observaron una menor reactividad cruzada entre las IgE frente a Tri a 14 y otros alérgenos de las frutas como Pru p 3. Esta idea se refuerza en nuestros resultados, donde solo Tri tu 14 y Pru p 3 pero no Tri a 14 es capaz de inducir una liberación de histamina relevante en células efectoras pasivas sensibilizadas.

Esta estrecha asociación entre la sensibilización entre Tri tu 14 y Pru p 3 y la reactividad cruzada frente ambas nsLTPs puede explicarse por los sitios específicos de unión conservados en ambas moléculas. Aunque Tri tu 14 muestra una secuencia de aminoácidos muy similar a la de Tri a 14 (48%) y con Pru p 3 (52%) parece que Tri tu 14 y Pru p 3 comparten una mayor proporción de aminoácidos conservados en su superficie lo que puede definir la reactividad cruzada de los epítomos conformacionales de IgE. En este caso, se deduce que la reactividad cruzada es debida a la similitud del lugar de unión para la IgE en superficie y no a la secuencia lineal de aminoácidos.

Para extraer alguna conclusión sobre la importancia de Tri tu 14 para los pacientes con WFA/WDEIA y su asociación con Pru p 3 se precisan estudios posteriores más extensos. Estas conclusiones han de ser interpretadas con cautela puesto que nuestros experimentos estaban determinados por las condiciones experimentales del estudio y los sueros de los que disponíamos.

Por los presentes resultados consideramos a la molécula Tri tu 14, una nsLTP extraída de las semillas de *T.durum*, un alérgeno válido verificado de esta especie de trigo.

Las plantas son la base alimentaria de animales, insectos y microorganismos (hongos, bacterias y virus). Para defenderse han desarrollado mecanismos equivalentes a una respuesta de hipersensibilidad acumulando sustancias antimicrobianas y produciendo proteínas relacionadas con la patogénesis, cuya síntesis está regulada por genes de defensa. Algunos autores han demostrado que en condiciones de estrés estos genes inducen el aumento de producción proteínas como las nsLTPs, lo cual implica un mayor riesgo de reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados.<sup>(20)</sup> En este experimento no fue posible identificar la concentración de proteína Tri tu 14 en las semillas del cereal, sin embargo, por todo lo anterior nos atrevemos a especular que el nivel de Tri tu 14 es variable y depende del estadio de desarrollo de la planta y de sus condiciones ambientales.

Con los años se intuyó que de la manipulación de dichos genes podrían obtenerse semillas de vegetales más resistentes a plagas. Por ello el hombre ha ido modificando sus cultivos junto con la selección natural hasta llegar a la de los cultivos de especies transgénicas tan complejos de la actualidad.<sup>(3)</sup>

Es bien conocido el hecho de que las especies transgénicas han resultado útiles para aumentar la producción agrícola y lograr reducir el uso de fertilizantes y pesticidas. Sin embargo, en la línea de lo que ya se ha mencionado, esta manipulación genética también podría ser la causante de la respuesta en las plantas incrementando las proteínas de defensa, cuyas repercusiones sanitarias están traduciéndose en un



aumento de las reacciones de hipersensibilidad. Es decir, el peligro clínico de plantas transgénicas es la sobreexpresión de dichas proteínas de defensa alergénicas (p.e. para obtener resistencias a hongos o parásitos). Esta es la razón por la que cobra gran importancia el conocimiento de estas proteínas y su actividad biológica en el ser humano, pues el riesgo sería mínimo utilizando proteínas de defensa no alergénicas. Se abriría, de esta forma, un camino para el campo de la biotecnología hacia la manipulación genética de las plantas con el objetivo de crear cultivos resistentes a plagas, pero menos alergénicas.

El descubrimiento de nuevas LTP como alérgenos del trigo permite tener un objetivo claro en la terapéutica de la alergia mediante inmunoterapia, como ya se está realizando con Pru p 3.<sup>(26) (27) (28)</sup> *Anexos. Figs. 11 y 12.* De esta manera reducir el alto riesgo de anafilaxias por las LTPs y el cuadro de gravedad que implica si logramos que el tratamiento llegue a ser eficaz.

## CONCLUSIONES

---

1. Se ha confirmado la existencia de LTP Tri tu 14 de *T.durum* (trigo duro). Por primera vez ha sido identificado un alérgeno del *T.durum* y descrito como nsLTP Tri tu 14.
2. Los resultados en nuestro estudio sugieren que Tri tu 14, más que Tri a 14, está asociado con WFA/WDEIA y Pru p 3 es marcador de riesgo de alergia a alimentos. Tri a 14 ha revelado mayor asociación de hipersensibilidad en pacientes con BA.
3. Diagnóstico de alergia: con las LTP la fiabilidad diagnóstica aumenta. La purificación y aislamiento óptimos de los alérgenos para su utilización en test in vivo e in vitro puede ser de gran importancia en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas, especialmente en individuos con antecedentes de reacciones de gravedad como anafilaxia, en el que la única forma de diagnóstico es mediante test in vitro.
4. Terapéutica: el siguiente paso es el desarrollo de inmunoterapia específica con LTPs de trigo. El descubrimiento de nuevas LTP como alérgenos del trigo permite tener un objetivo claro en el tratamiento mediante inmunoterapia, como ya se está realizando con Pru p 3, así evitar anafilaxias por las LTPs y su gravedad.
5. La sobreexpresión de Tri tu 14 en los cereales del trigo por agresiones externas (p.e. microbios o manipulación genética) incrementará su alergenidad y el

riesgo para los individuos sensibilizados a esta nsLTP. Esto puede explicar el aumento en la incidencia de reacciones anafilácticas al trigo.

6. El conocimiento de estas proteínas y su actividad biológica en el ser humano abre un camino en el campo de la biotecnología con el objetivo de crear cultivos resistentes a plagas, pero menos alergénicas mediante la manipulación genética de las semillas de trigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A la Dra. Alicia Armentia por su paciencia infinita y dedicación.

Al personal del hospital por su colaboración desinteresada en este trabajo y a los pacientes por su participación en el mismo.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

1. Lieberman JA, Sicherer SH. Quality of life in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. junio de 2011;11(3):236-42.
2. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Nutr Res N Y N*. enero de 2011;31(1):61-75.
3. Armentia A, Martín-Armentia S, Martín-Armentia B, Santos J. Alergia a los alimentos. 2015;46.
4. A Orovitg Cardona<sup>1</sup>, J Cuesta Herranz<sup>2</sup>. Manejo de la alergia a vegetales por profilinas y LTP - *Journal of investigational Allergology and Clinical Immunology*. *Investig Allergol Clin Immunol* 2011. 10 de noviembre de 2011;21(Supplement 4):56-69.
5. Armentia A, Garrido-Arandia M, Cubells-Baeza N, Gómez-Casado C, Díaz-Perales A. Bronchial Challenge With Tri a 14 as an Alternative Diagnostic Test for Baker's Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(5):352-7.
6. Armentia A, Díaz-Perales A, Castrodeza J, Dueñas-Laita A, Palacin A, Fernández S. Why can patients with baker's asthma tolerate wheat flour ingestion? Is wheat pollen allergy relevant? *Allergol Immunopathol (Madr)*. agosto de 2009;37(4):203-4.
7. Pokoj S, Lauer I, Fötisch K, Himly M, Mari A, Enrique E, et al. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer proteins. *Protein Expr Purif*. enero de 2010;69(1):68-75.

8. Toda M, Reese G, Gadermaier G, Schulten V, Lauer I, Egger M, et al. Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2011;128(5):1022-1030.e1-7.
9. Palacin A, Quirce S, Armentia A, Fernández-Nieto M, Pacios LF, Asensio T, et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2007;120(5):1132-8.
10. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. julio de 2014;42(Web Server issue):W252-258.
11. Wangorsch A, Larsson H, Messmer M, García-Moral A, Lauer I, Wolfheimer S, et al. Molecular cloning of plane pollen allergen Pla a 3 and its utility as diagnostic marker for peach associated plane pollen allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2016;46(5):764-74.
12. Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 8 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704374>
13. Martín BC. Alergia a alimentos: reactividad alérgica y efectos de los tratamientos enzimáticos, térmicos y de presión. :124.
14. Alicia Armentia, Javier Santos, Blanca Martín-Armentia, Sara Martín-Armentia. Food allergy. *Anales de la real academia de medicina y cirugía de valladolid*. 4 de junio de 2015;53:143-88.
15. Lucas JSA, Atkinson RG. What is a food allergen? *Clin Exp Allergy*. 2008;38(7):1095-9.
16. Scherf KA, Brockow K, Biedermann T, Koehler P, Wieser H. Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. enero de 2016;46(1):10-20.
17. García-Casado G, Armentia A, Sánchez-Monge R, Malpica JM, Salcedo G. Rye flour allergens associated with baker's asthma. Correlation between in vivo and in vitro activities and comparison with their wheat and barley homologues. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. abril de 1996;26(4):428-35.
18. Wheat as an Allergen: Baker's Asthma, Food and Wheat Pollen Allergy [Internet]. [citado 4 de abril de 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/300348105\\_Wheat\\_as\\_an\\_Allergen\\_Baker's\\_Asthma\\_Food\\_and\\_Wheat\\_Pollen\\_Allergy](https://www.researchgate.net/publication/300348105_Wheat_as_an_Allergen_Baker's_Asthma_Food_and_Wheat_Pollen_Allergy)

19. Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Rodríguez-Pérez R, Benito C, Sánchez-Monge R, Salcedo G, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*. octubre de 2003;112(4):789-95.
20. Boutrot F, Guirao A, Alary R, Joudrier P, Gautier M-F. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochim Biophys Acta*. 15 de agosto de 2005;1730(2):114-25.
21. López-Torrejón G, Crespo JF, Sánchez-Monge R, Sánchez-Jiménez M, Álvarez J, Rodríguez J, et al. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. agosto de 2005;35(8):1065-72.
22. Marchuet C, José M. Alergia a cupresáceas en la población del Vallés Occidental [Internet]. 2016 [citado 11 de abril de 2019]. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/175869>
23. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy*. marzo de 2004;59(3):243-67.
24. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. agosto de 2000;106(2):228-38.
25. Palacín A, Gómez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PloS One*. 2012;7(12):e50799.
26. Gómez-Casado C, Garrido-Arandia M, Gamboa P, Blanca-López N, Canto G, Varela J, et al. Allergenic Characterization of New Mutant Forms of Pru p 3 as New Immunotherapy Vaccines. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2013 [citado 8 de abril de 2019];2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845429/>
27. Pereira C, Bartolomé B, Asturias JA, Ibarrola I, Tavares B, Loureiro G, et al. Specific sublingual immunotherapy with peach LTP (Pru p 3). One year treatment: a case report. *Cases J* [Internet]. 12 de mayo de 2009 [citado 8 de abril de 2019];2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2740081/>
28. Compresión de la Inmunoterapia | ALK - España [Internet]. [citado 11 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.alk.net/es/id/compresion-de-la-inmunoterapia>

## ANEXOS

**Tabla 1.**

PACIENTES		SD	CLINICA	SPT TRIGO	SPT Tri a 14	PROV	IgE Trigo	IgE Tri a 14	IgE Tri tu 14	IgE Pru p3
1	42/M	BA	As	20	28	pos	4,86	1,56	0,35	0,38
2	19/H	BA	As	87	29	pos	5,53	0,36	0,16	0,33
3	19/H	BA	As, An	22	8	neg	100	0,1	0,05	0,14
4	29/H	BA	As, An	38.5	32	pos	7,6	4,95	11,8	27,1
5	44/H	BA	As	18	11	pos	1,6	0,1	0,01	0,01
6	20/M	BA	As	29	30	pos	4,63	0,95	0,36	0,17
7	32/M	BA	As	36	26	pos	7,3	1,9	0,09	0,03
8	35/M	BA	As	28.5	36	pos	4,6	7,18	9,24	22
9	19/H	BA	As	22	22	pos	1,4	6,32	8,08	20
10	62/H	BA	As, U	20	24	pos	2,5	0,37	0,01	0,04
11	16/H	BA	As, An	38	32	neg	4,2	0,1	0,01	0,01
12	56/H	BA	As, An	42	46	neg	36	0,26	0,27	0,27
13	71/M	BA	As, An	18	6	neg	3,66	0,06	0,03	0,1
14	26/H	BA	As, U	28	10	pos	17,2	0,12	0,35	0,53
15	22/H	BA	As, An	38	42	pos	22,1	25,2	53,9	>100
16	36/H	BA	As, U	25	26	pos	2,42	1,7	2,85	4,36
17	20/M	BA	As	26	22	pos	1,56	0,53	0,91	2,1
18	38/H	BA	As, U	18	12	neg	1,59	0,1	0,02	0,04
19	26/M	BA	As, U	28	26	pos	2,05	1,25	11,3	8,1
20	25/H	BA	As	18	18	pos	0,32	0,53	2,75	1,09
21	65/M	FA	Ang, U	Nr	Nr	pos	1,75	2,74	13,3	2,8
22	46/M	WDEI A	An	Nr	Nr	pos	2	1,79	1,88	1,42
23	26/H	WDEI A	Ang, U	Nr	Nr	pos	1,42	8,15	12,2	6,94
24	24/H	WDEI A	Ang, U	Nr	Nr	pos	2,82	13,9	19,4	18,8
25	31/H	FA	U, D	Nr	Nr	pos	1,68	1,37	5,29	4,56
26	37/H	FA	An	Nr	Nr	Nr	2,55	70,7	>100	>100
27	27/M	FA	An	Nr	Nr	Nr	3,61	6,78	34,8	45,1
28	28/H	WDEI A	Ang, U	Nr	Nr	pos	0,75	1,26	1,31	0,1
29	24/M	FA + BA	Gi	Nr	Nr	Nr	39,3	0,54	0,93	1,07
30	47/M	FA	U	Nr	Nr	pos	0,13	0,75	0,77	3,83
31	65/M	FA	U, Gi	Nr	Nr	pos	3,49	4,42	14,7	17
32	26/M	FA	U	Nr	Nr	pos	5,27	15,5	1,07	42,5
33	43/H	NO	NO	Nr	Nr	Nr	1,21	6,97	23,5	37,7
34	40/H	NO	NO	Nr	Nr	Nr	5,48	1,22	2,88	3,81
35	49/H	NO	NO	Nr	Nr	Nr	2,04	0,71	1,24	1,66

36	54/H	NO	NO	Nr	Nr	Nr	2,17	8,25	3,93	13,2
37	28/M	NO	NO	Nr	Nr	Nr	0,14	0,38	0,99	2,03
38	46/H	NO	NO	Nr	Nr	Nr	2,02	1,62	1,26	4,84
39	26/M	NO	NO	Nr	Nr	Nr	2,48	4,56	10,9	15,2

Tabla 1. Pacientes y resultados de pruebas realizadas. Leyenda: pacientes: nº/edad/sexo; SD: síndrome: BA=Baker asthma o asma del panadero, FA: food allergy o alergia alimentaria a trigo, WDEIA: wheat dependent exercise induced anaphylaxis o anafilaxia inducida por ejercicio trigo dependiente, NO: ausencia de clínica. Clínica: As: asma, An: Anafilaxia, U: urticaria, Ang: angioedema, Gi: clínica gastrointestinal, D: dermatitis. SPT: skin prick test, Prov: provocación bronquial u oral según la clínica (pos: positivo, neg: negativo, Nr: no realizado). IgE: cuantificación de anticuerpo IgE para cada alérgeno.

## Figura 1.

```

Tri tu 14    AVSCGQVSSALSPCISYARGNGASPSAACC SGVRS LASSARSTADK 46
Tri a 14.01 -IDCGHVD SLVRPCLSYVQGG-PG PSGQCCDGVKNLHNQARSQSDR 44
Pru p 3     -ITCGQVSSSLAPCIPYVRGGGAVPP-ACCNGIRNVNNLARTTPDR 44
           : **:*. * : **: *. :*. * **.*: :. : **: *:

Tri tu 14    QAACKCIKSAA---AGLNAGKAAGIPTKCGVSVPYAIISSSVDCSKIR 90
Tri a 14.01 QSACNCLKGIARGIHN LNEDNARSIPPKCGVNLPTYISLNIDCSRV- 90
Pru p 3     QAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGKCGVSI PYKISASTNCATVK 91
           *:***:*. * : .:* .:* .:* *****: ** ** . :*: :

```

Ilustración 1. Secuencia de aminoácidos de las LTP a estudio y coincidencias entre ellas.

## Figura 2.

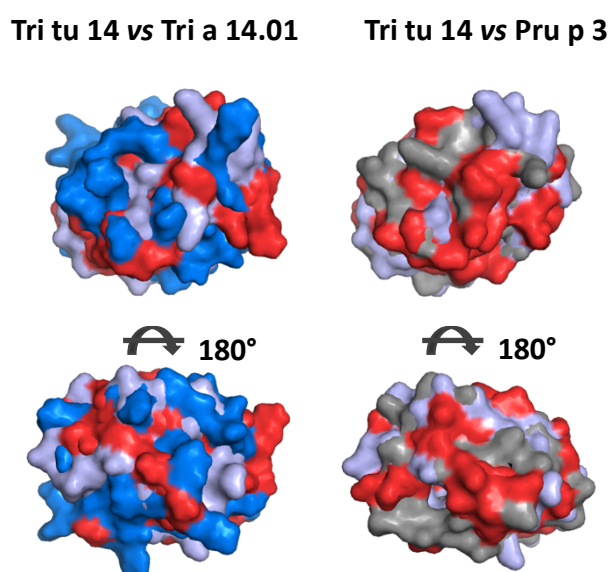
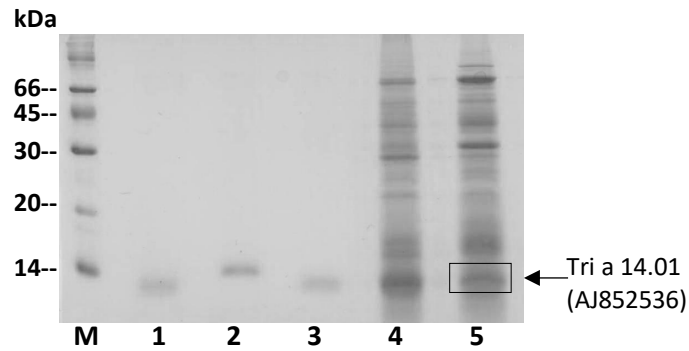


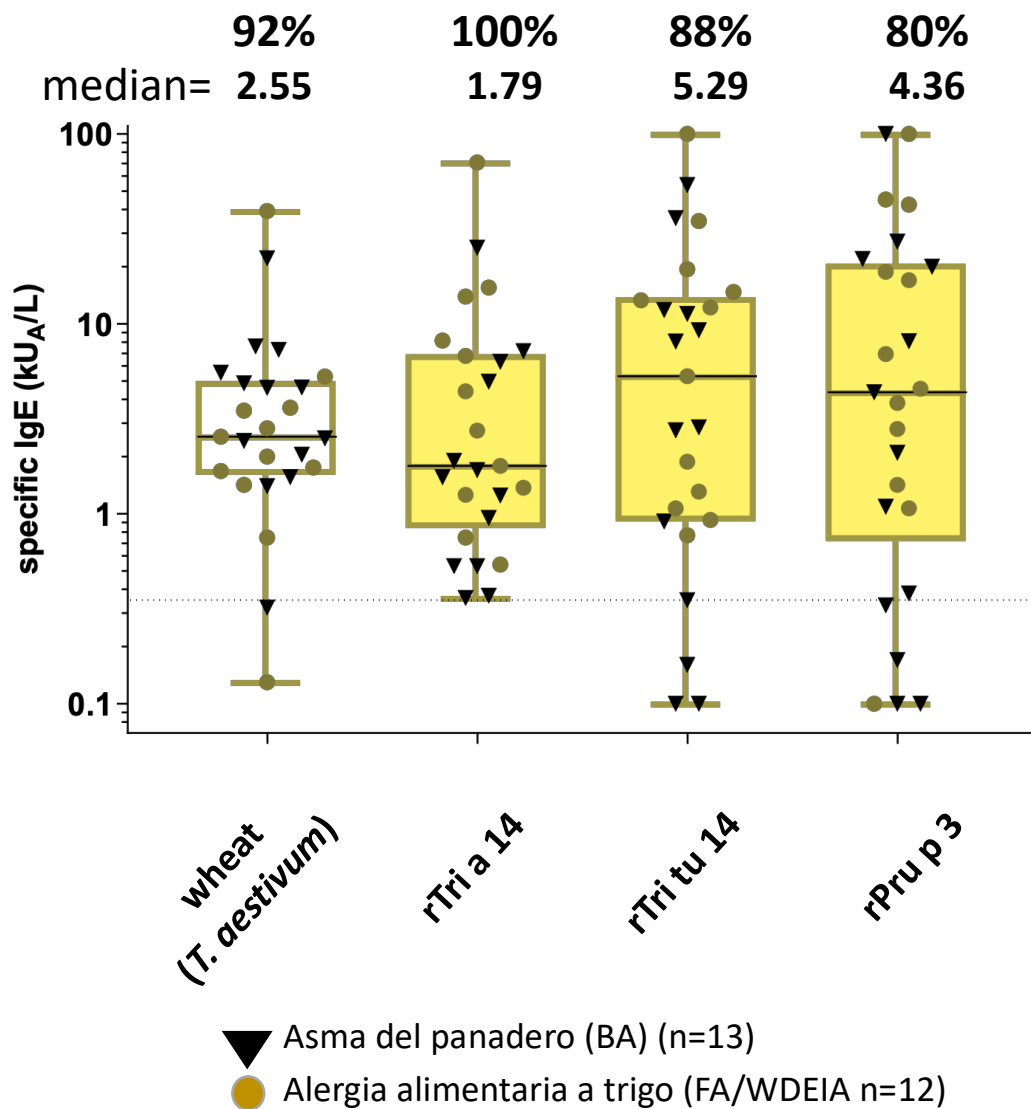
Ilustración 2. Estructuras tridimensionales de las LTP a estudio superpuestas para analizar la proporción de aminoácidos conservados expuestos en superficie. Tri tu 14 solapada con Tri a 14 y Pru p 3. En ROJO los puntos coincidentes de las estructuras proteicas.

**Figura 3.**



*Ilustración 3. Electroforesis de LTP purificadas rTri tu 14 (2 µg, línea 1), rTri a 14.01 (2 µg, línea 2), nPru p 3 (2 µg, línea 3), T.aestivum (15 µg, línea 4) y extracto de T.durum (15 µg, línea 5).*

**Figura 4.**



*Ilustración 4. Box plots con los valores de IgE específicos obtenidos de los sueros de nuestros pacientes respecto a extracto de trigo completo, LTP Tri a 14 de T.aestivum (pan), LTP Tri tu 14 (pasta), Pru p 3 (melocotón).*

Figura 5.

**Alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA n=12)**

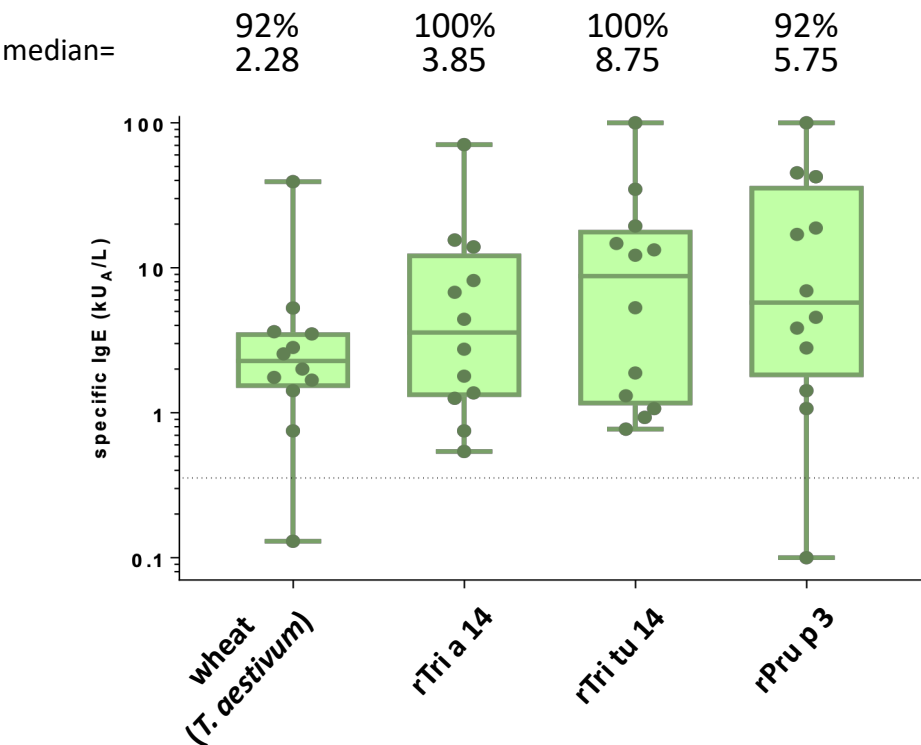


Ilustración 5. Diagrama de cajas con IgE específica para cada alérgeno a estudio en los pacientes con alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA).

Figura 6.

**Asma del panadero (BA: n=13)**

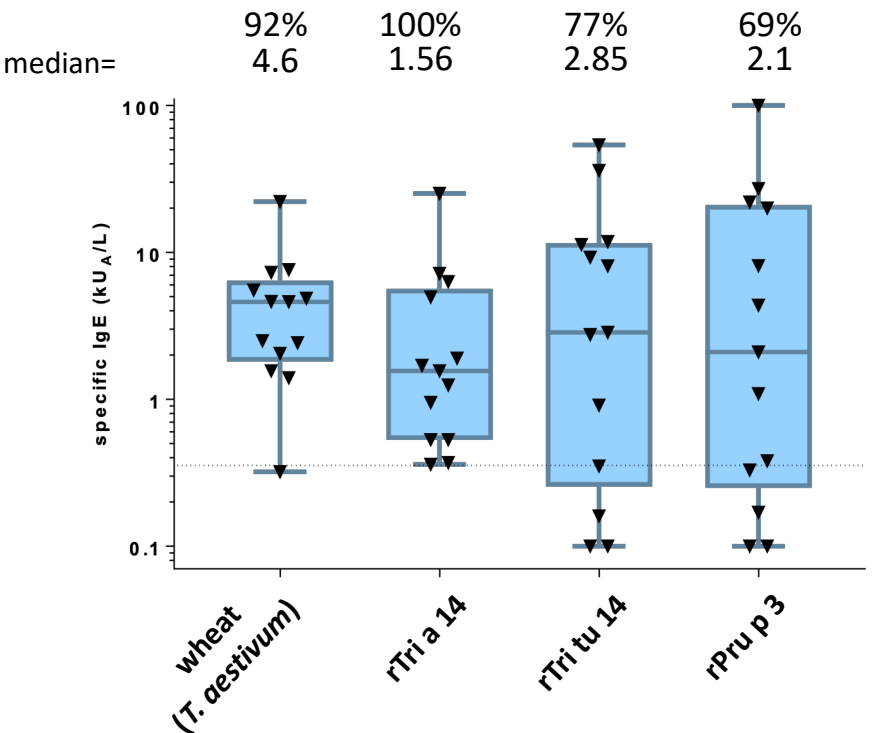
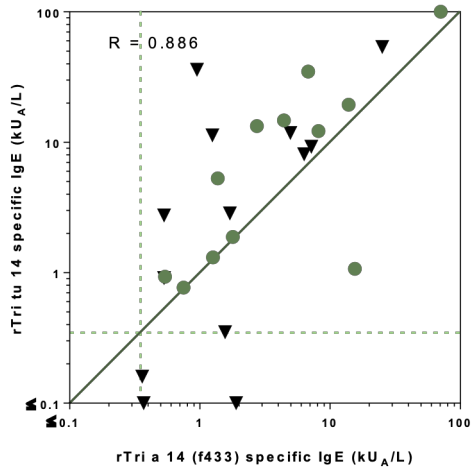


Ilustración 6. Diagrama de cajas con valores de IgE específica para cada alérgeno a estudio en los pacientes con asma del panadero.



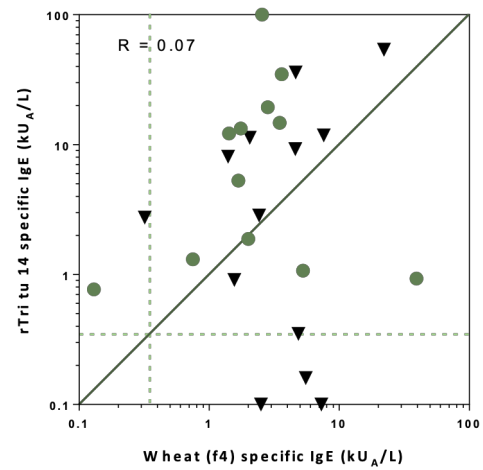
**Figura 7**

**A rTri tu 14 vs rTri a 14**



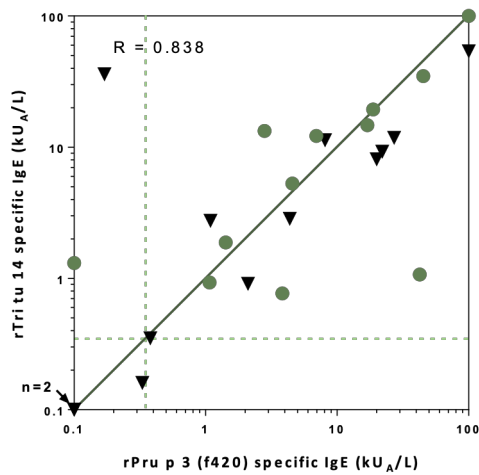
R = 0.78 Asma del panadero (BA) ▼  
R = 0.93 Alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA) ●

**B rTri tu 14 vs wheat**



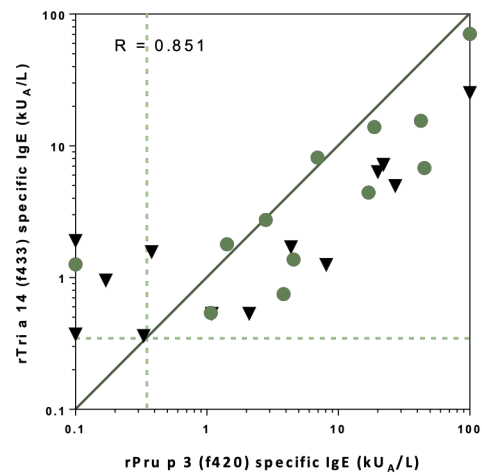
R = 0.76 Asma del panadero (BA) ▼  
R = -0.16 Alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA) ●

**C rTri tu 14 vs rPru p 3**



R = 0.79 Asma del panadero (BA) ▼  
R = 0.90 Alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA) ●

**D rTri a 14 vs rPru p 3**



R = 0.99 Asma del panadero (BA) ▼  
R = 0.92 Alergia alimentaria al trigo (FA/WDEIA) ●

*Ilustración 7. Análisis de correlación de IgE específica liberada en cada paciente con cada LTP.*

Figura 8.

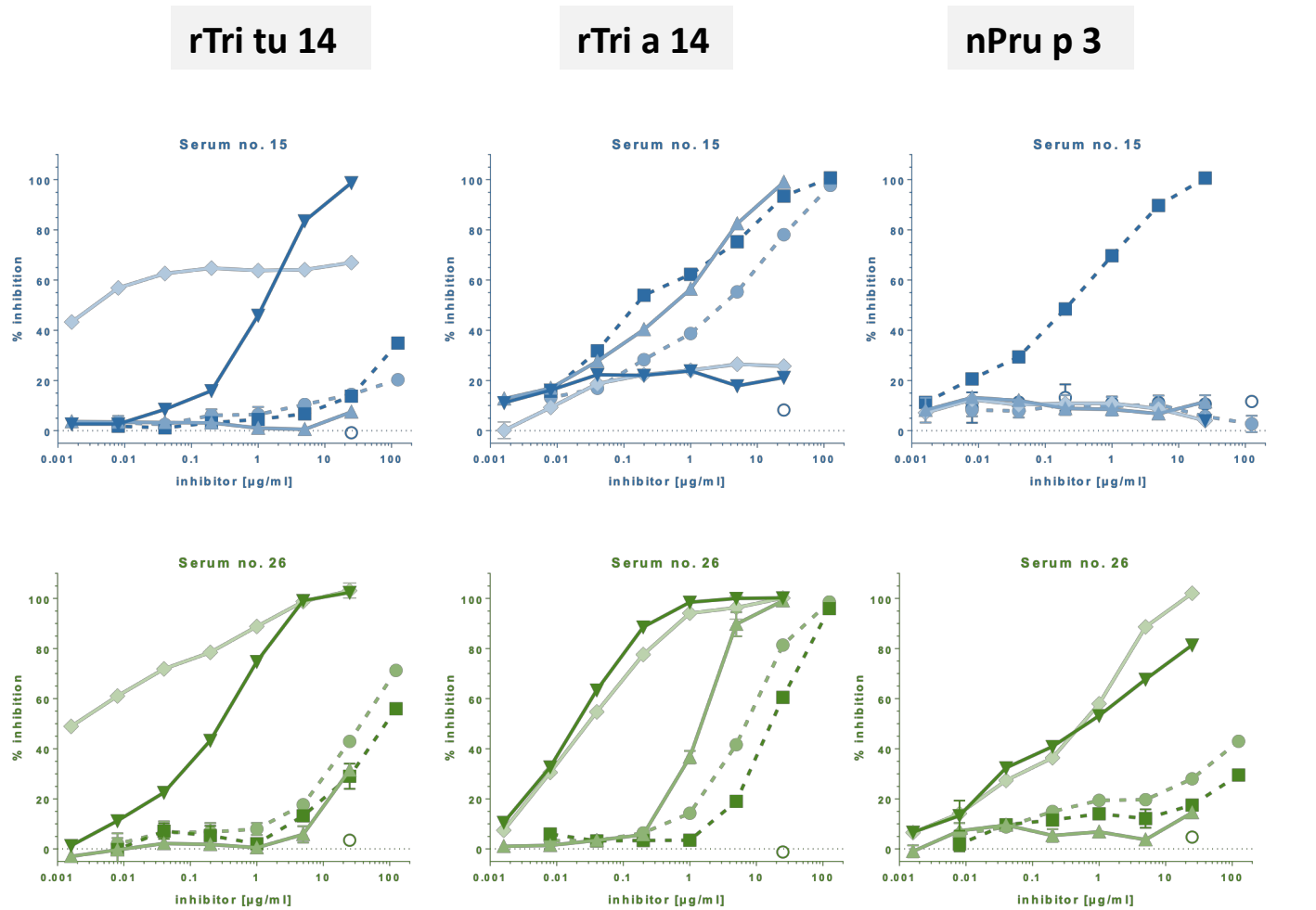


Ilustración 8. La reactividad cruzada de IgE entre Tri tu 14, Tri a 14 y Pru p 3 se analizó adicionalmente utilizando sueros individuales en experimentos de inhibición cruzada de ELISA dependientes de la dosis. **Suero nº 15 = asma del panadero (BA)** y **Suero nº26=alergia alimentaria a trigo**

▼ rTri tu 14    ■ *Triticum durum* extract  
 ▲ rTri a 14    ● *Triticum aestivum* extract  
 ◆ nPru p 3    ○ BSA

Figura 9.

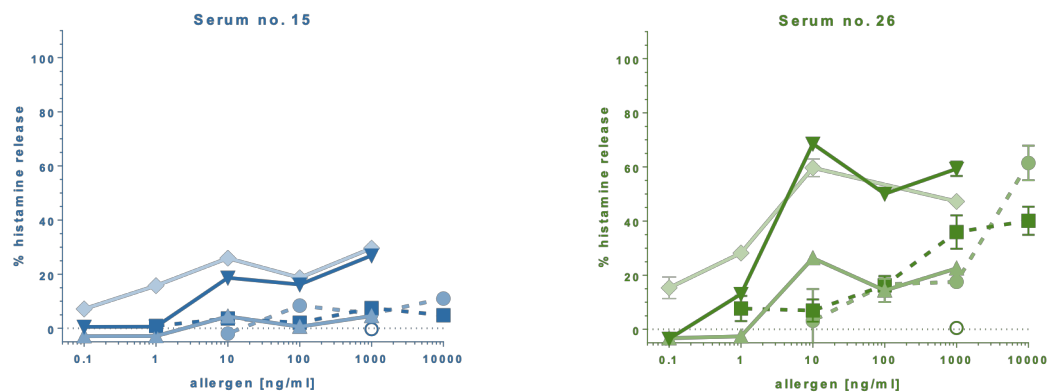
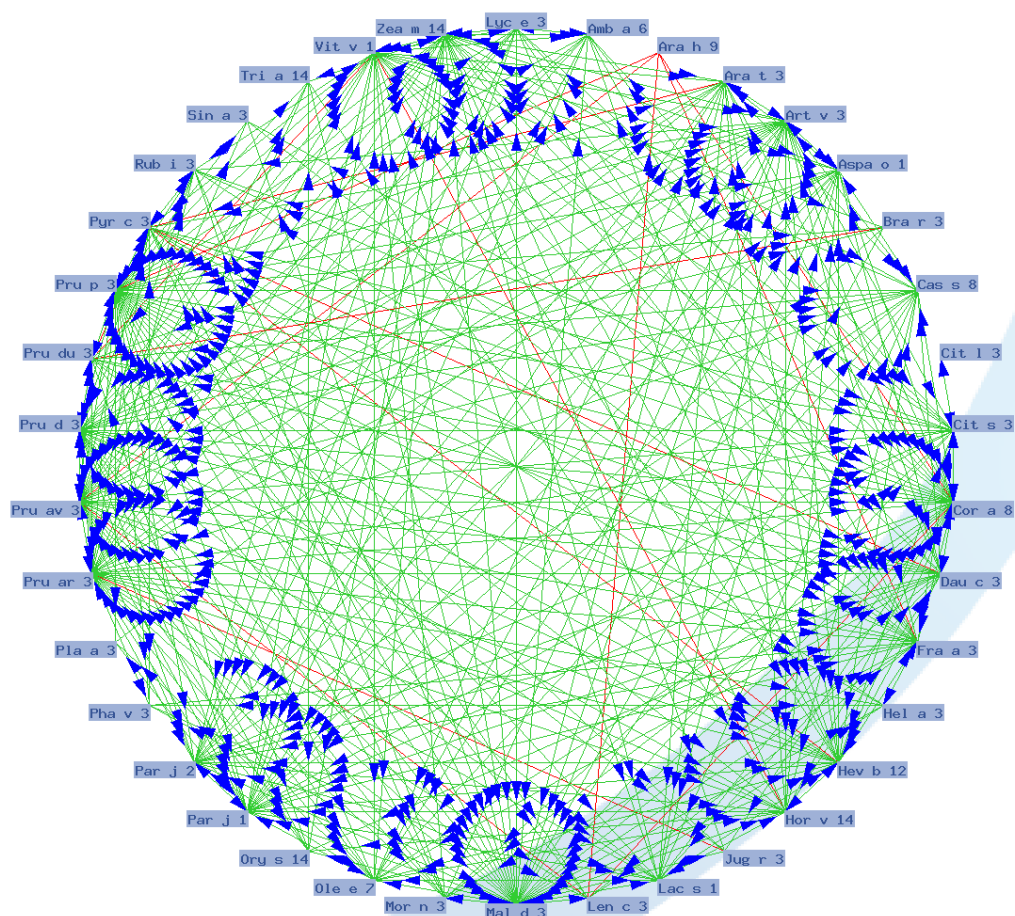



Ilustración 9. Ensayo de liberación de histamina in vitro con basófilos sensibilizados pasivamente.

**Figura 10.**



*Ilustración 10. Mapa de reactividades cruzadas de LTPs identificadas hasta el momento.*

Figura 11.



**ALK**  
 ALK-ABELLÓ, S.A. - MIGUEL FLETA, 19 - 28037 MADRID  
 ATENCIÓN AL CLIENTE  
 e-mail: [alk@alkabell.com](mailto:alk@alkabell.com)  
 e-mail: [recepcion\\_pedidos\\_customer\\_service@alk-abell.com](mailto:recepcion_pedidos_customer_service@alk-abell.com)  
 Fax: [913 276 146](tel:913276146)  
 Teléfonos Atención Telefónica: [913 276 142](tel:913276142) / [913 276 143](tel:913276143) - Especialistas: [913 276 144](tel:913276144)  
 Teléfono ALK Directo: [910 102 155](tel:910102155)

DOCTOR/A. \_\_\_\_\_

COLEGIADO/A N°: \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20\_\_

CIUDAD \_\_\_\_\_

FIRMA \_\_\_\_\_

Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (ver reverso)\*

**PACIENTE:** ES IMPRESCINDIBLE INDICAR TODOS LOS DATOS  
Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (ver reverso)\*

Apellidos \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Calle \_\_\_\_\_ Número \_\_\_\_\_

Localidad \_\_\_\_\_

C.P. \_\_\_\_\_ Provincia \_\_\_\_\_

Tel. \_\_\_\_\_ N.I.F. \_\_\_\_\_

**OFICINA DE FARMACIA:**

N.I.F. o C.I.F.: \_\_\_\_\_

TELÉFONO: \_\_\_\_\_

FAX: \_\_\_\_\_

E-MAIL: \_\_\_\_\_

**SLIToneULTRA**  
(ENVASES MONODOSIS)

		%
510	DERMAT. MEZCLA (D. PTERONYSSINUS)	100
503	DERMAT. PTERONYSSINUS	100
1110	D. PTERONYSSINUS + LEPIDOGLYPHUS	100
992	DERMAT. MEZCLA + BLOMIA	100
1242	ÁRBOLES MEZCLA (ALNUS, BETULA, CORYLUS)	100
108	BETULA VERRUCCOSA	100
1043	CUPRESSUS MEZCLA (C. ARIZONICA, C. SPANISH)	100
154	OLEA EUROPAEA	100
1010	GRAMINEAS (ANTHRAXANTHUM, DACTYLUS, LOLIUM, PHLEUM, POA, SECALE)	100
302	AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA	100
360	PARIETARIA OFFICINALIS	100
1012	GRAMINEAS# + CYNODON	100
993	GRAMINEAS# + BETULA	100
1013	GRAMINEAS# + CUPRESSUS	100
1014	GRAMINEAS# + OLEA	100
1015	GRAMINEAS# + ARTEMISIA	100
1011	GRAMINEAS# + PARIETARIA	100
994	GRAMINEAS# + PLANTAGO	100
402	ALTERNARIA ALTERNATA	100
555	GATO	100
553	PERRO	100

#GRAMINEAS: ANTHRAXANTHUM, DACTYLUS, LOLIUM, PHLEUM, POA

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> 90 MONODOSIS	<input type="checkbox"/> 90 MONODOSIS
<input type="checkbox"/> 180 MONODOSIS	<input type="checkbox"/> 180 MONODOSIS

**Pharmalgen VENENO DE HIMENÓPTEROS**

		%
801	APIS MELLIFERA	100
802	VESPULA SPP.	100
809	POLISTES DOMINULUS	100

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> 1 VIAL 4 + 9 VIALES DILUYENTES	<input type="checkbox"/> 4 VIALES 4 + 4 DILUYENTES

**Aquagen SQ**

		%
801	APIS MELLIFERA	100
802	VESPULA SPP.	100

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> 1 VIAL 4 + 4 VIALES DILUYENTES	<input type="checkbox"/> 1 VIAL 4 + 1 VIAL DILUYENTE

**Alutard SQ Venenos**

		%
801	APIS MELLIFERA	100
802	VESPULA SPP.	100

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> VIALES 1,2,3,4	<input type="checkbox"/> UN VIAL 4

**OBSERVACIONES**

**Pangramin ULTRA**

		%
136	DERMAT. MEZCLA (D. PTERONYSSINUS)	100
138	DERMAT. PTERONYSSINUS	100
173	LEPIDOGLYPHUS DESTRUCTOR	100
097	D. PTERONYSSINUS + LEPIDOGLYPHUS	100
038	DERMAT. MEZCLA + BLOMIA <sup>(1)</sup>	100
206	ÁRBOLES MEZCLA (ALNUS, BETULA, CORYLUS)	100
242	CUPRESSUS ARIZONICA	100
224	OLEA EUROPAEA	100
007	GRAMINEAS#	100
245	PARIETARIA JUDAICA	100
244	SALSOLA KALI	100
1455	GRAMINEAS# + CUPRESSUS	100
011	GRAMINEAS# + OLEA	100
012	GRAMINEAS# + PARIETARIA	100
1459	GRAMINEAS# + SALSOLA <sup>(1)</sup>	100
034	OLEA + PARIETARIA <sup>(1)</sup>	100
021	OLEA + SALSOLA	100
318	ALTERNARIA ALTERNATA	100
452	GATO	100
402	PERRO	100

#GRAMINEAS: DACTYLUS, FESTUCA, LOLIUM, PHLEUM, POA, SECALE

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> VIALES A,B,B	<input type="checkbox"/> 2 VIALES B
	<input type="checkbox"/> 4 VIALES B

(1) DERMAT. MEZCLA + BLOMIA; GRAMINEAS + SALSOLA; OLEA + PARIETARIA Disponibles a partir de Septiembre de 2017.

AMBROSIA, ARTEMISIA, PLANTAGO y CABALLO Disponibles a partir de Diciembre de 2017.

19259 9 F

**SLIT - LÁTEX**

		%
945	LÁTEX	100

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
<input type="checkbox"/> VIALES 0,1,2,3,4	<input type="checkbox"/> 2 VIALES 4

**SLIT - Melocotón**

		%
717	MELOCOTÓN	100

INICIACIÓN	MANTENIMIENTO
ENVASE AB: <input type="checkbox"/> ENVASE A (VIAL 4 + 3 DILUYENTES) ENVASE B (4 VIALES 4)	<input type="checkbox"/> 2 ENVASES B (4 VIALES 4 POR ENVASE)

SI DESEA TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO, ES IMPRESCINDIBLE INDICAR LOS DATOS DEL PACIENTE, ASÍ COMO, EL NÚMERO DE REFERENCIA O LA COMPOSICIÓN DEL TRATAMIENTO ANTERIOR SI NO APARECIERAN INDICADOS EN ESTA HOJA DE PRESCRIPCIÓN.

Nº DE REFERENCIA PREVIO \_\_\_\_\_

COMPOSICIÓN \_\_\_\_\_

EJEMPLAR PARA: ALK-ABELLÓ, S.A. - DPTO. ATENCIÓN AL CLIENTE - MIGUEL FLETA, 19 - 28037 MADRID

Ilustración 11. Ejemplo de formulario de tratamiento mediante inmunoterapia utilizada actualmente para diferentes alérgenos conocidos, entre ellos Pru p 3, para pacientes del servicio de alergología del HURH.



Figura 12.

**Pautas de Administración**

**Pangramin ULTRA**  
Pauta Plus

Vial	Semana	Dosis
Vial A 100 STU/ml	1	0,2 ml
	2	0,4 ml
	3	0,8 ml
Vial B 1.000 STU/ml	4	0,1 ml
	5	0,2 ml
	6	0,4 ml
	7	0,8 ml
Vial B 1.000 STU/ml	9	0,8 ml
	13	0,8 ml

Pauta Cluster

Vial	Día	Dosis
Vial A 100 STU/ml	1	0,1 ml
		0,2 ml
	8	0,4 ml
Vial B 1.000 STU/ml		0,6 ml
	15	0,1 ml
	22	0,2 ml
Vial B 1.000 STU/ml		0,4 ml
	36	0,4 ml
	64	0,8 ml

Administración: En ambos pautas, una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, ésta se repetirá a las dos semanas para continuar posteriormente con una inyección cada cuatro semanas hasta finalizar el tratamiento.

**Pharmalgen**  
Veneno de Himenópteros  
**Aquagen SQ**  
Apis mellifera

Pauta Convencional Corta - 9 semanas

Vial	Semana	Dosis
Vial 2: 1 µg/ml	1	0,1 ml
Vial 3: 10 µg/ml	2	0,1 ml
	3	0,5 ml
	4	0,1 ml
Vial 4: 100 µg/ml	5	0,2 ml
	6	0,4 ml
	7	0,6 ml
	8	0,8 ml
	9	1 ml

Pauta Cluster - 4 semanas

Vial	Semana	Dosis
Vial 3: 10 µg/ml	1	0,5 ml
		0,1 ml
	2	0,2 ml
Vial 4: 100 µg/ml		0,5 ml
	3	0,5 ml
	4	1 ml

Pauta Cluster - 3 semanas

Vial	Semana	Dosis
Vial 3: 10 µg/ml	1	0,5 ml
		0,1 ml
	2	0,2 ml
Vial 4: 100 µg/ml		0,2 ml
	2	0,5 ml
	3	1 ml

Administración: En las pautas cluster el intervalo entre dosis será de 30 minutos. Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, ésta se repetirá a las dos semanas para continuar con una inyección mensual.

**Alutard SQ Venenos**

Pauta de 14 semanas

Vial 1	Semana	Dosis
Vial 1 100 U-SQ/ml	1	0,2 ml
	2	0,4 ml
	3	0,8 ml
Vial 2 1.000 U-SQ/ml	4	0,2 ml
	5	0,4 ml
	6	0,8 ml
Vial 3 10.000 U-SQ/ml	7	0,2 ml
	8	0,4 ml
	9	0,8 ml
	10	0,1 ml
Vial 4 100.000 U-SQ/ml	11	0,2 ml
	12	0,4 ml
	13	0,6 ml
	14	0,8 ml
	15	1,0 ml

Pauta de 6 semanas

Vial	Semana	Dosis
Vial 1 100 U-SQ/ml		0,1 ml
Vial 2 1.000 U-SQ/ml	1	0,1 ml
Vial 3 10.000 U-SQ/ml		0,1 ml
Vial 3 10.000 U-SQ/ml	2	0,2 ml
		0,2 ml
	3	0,5 ml
Vial 4 100.000 U-SQ/ml		0,5 ml
	4	0,2 ml
	5	0,4 ml
	6	0,6 ml
	7	1 ml

Administración: Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, el intervalo entre inyecciones irá aumentando de forma gradual. Según el criterio del alergólogo el intervalo podrá aumentar de 1 a 2, 4 y 6 u 8 semanas.

**SLIT-Látex**  
Pauta de iniciación

Frasco	Día	Gotas
Frasco 0: 5x10 <sup>-8</sup> µg/ml	1	1
		10
		1
Frasco 1: 5x10 <sup>-5</sup> µg/ml	2	10
		1
		10
Frasco 2: 0,05 µg/ml	3	1
		10
		1
Frasco 3: 5 µg/ml	4	10
		1
		2
Frasco 4: 500 µg/ml	5	3
		4
		10
	25	

Administración: El tratamiento de iniciación se administrará bajo supervisión directa del especialista con un intervalo entre dosis de 15 minutos. Una vez alcanzada la dosis máxima se administrará en el domicilio 5 gotas del frasco 4, diariamente, hasta acabar el contenido del frasco 4.

**SLIT-Melocotón**  
Pauta de iniciación

Frasco	Día	Gotas
Frasco 1: 0,05 µg Pru p 3/ml	1	1
		10
		1
Frasco 2: 0,5 µg Pru p 3/ml	2	10
		1
		10
Frasco 3: 5 µg Pru p 3/ml	3	1
		10
		1
Frasco 4: 50 µg Pru p 3/ml	4	2
		5
		10
	20	

Administración: El tratamiento de iniciación se administrará bajo supervisión directa del especialista con un intervalo entre dosis de 15 minutos. Una vez alcanzada la dosis máxima se administrará en el domicilio 5 gotas del frasco 4, diariamente, hasta acabar el contenido del frasco 4.

**SLIToneULTRA**

Alérgenos	Envase monodosis diario	Días
Pólenes, hongos y ácaros	50 SRU/día	1-5
	150 SRU/día	6-10
	300 SRU/día	11 - hasta finalizar el tratamiento
Epitelios	50 SRU/día	1-5
Cupressus mezcla	100 SRU/día	6 - hasta finalizar el tratamiento
	50 SRU/día	Toda el tratamiento

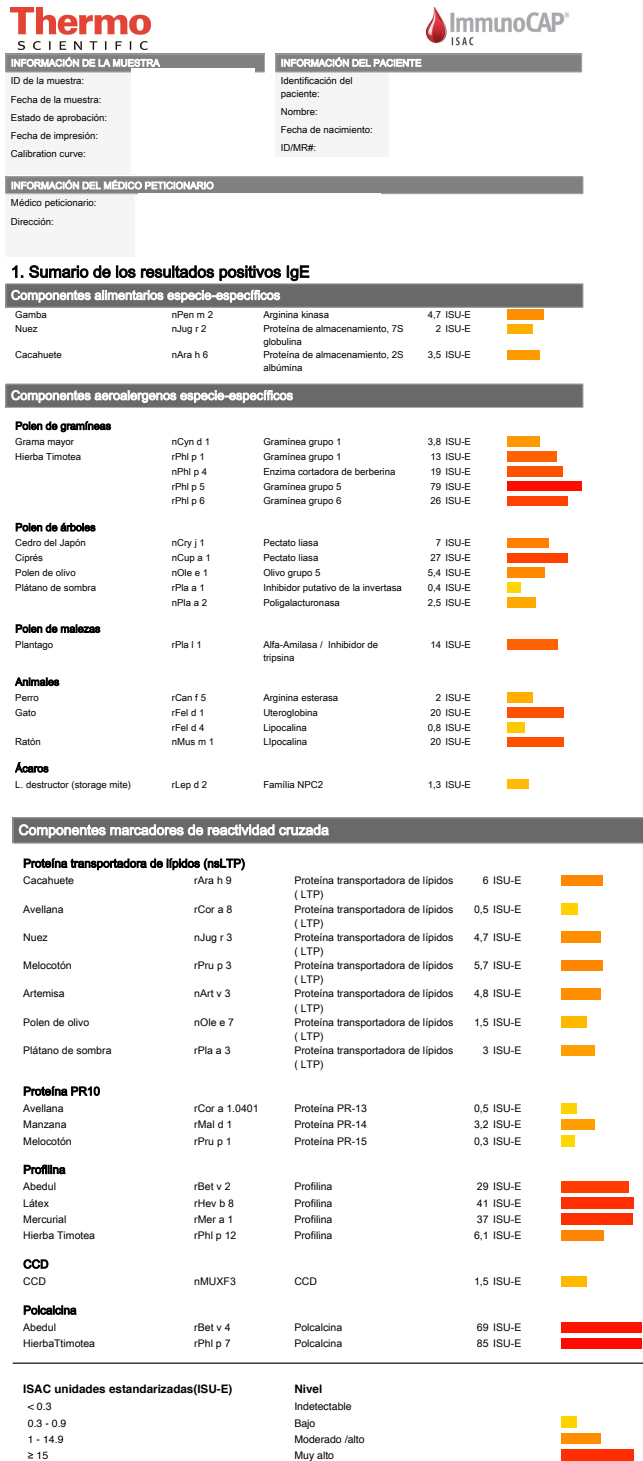
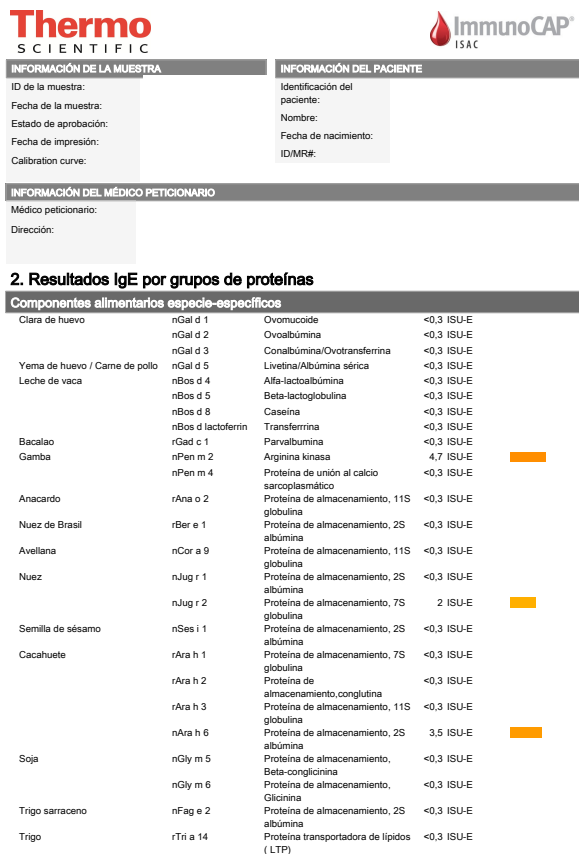
ALK-ABELLÓ, S.A. - MIGUEL FLETA, 19 - 28037 MADRID  
TEL 915 276 100 - FAX 915 276 122 - <http://www.alk.net/es>

TengoAlergia.es

Ilustración 12. Pautas de administración de inmunoterapia, como se puede ver en la imagen, se utiliza Pru p 3 para la desensibilización a melocotón.

**Figura 13.**

*Ilustración 13. Ejemplo de análisis ImmunoCAP realizado a un paciente del servicio de alergología del HURH*



**INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON  
MEDICAMENTOS (CEIm)**

Dña. ROSA Mª CONDE VICENTE, Secretario Técnico del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud Valladolid Oeste

**CERTIFICA:**

Que este Comité ha tenido conocimiento del Proyecto de Investigación, Trabajo Fin de Grado (TFG), titulado: **"Evaluación clínica, identificación y caracterización molecular de proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) como alérgenos de *Triticum aestivum* (pan), *triticum durum* (pasta) y melocotón"**, Ref. CEIm: PI144-19, Protocolo versión 1.0, y considera que:

Una vez evaluados los aspectos éticos del mismo, acuerda que no hay inconveniente alguno para su realización, por lo que emite **INFORME FAVORABLE**.

Este Proyecto de Investigación será realizado por las alumnas D<sup>a</sup> Alicia Moncada Salinero y D<sup>a</sup> Lúgía Montero de la Fuente, siendo su tutora en el Hospital Universitario Río Hortega la Dra. Alicia Armentia Medina.

Lo que firmo en Valladolid, a 20 de Mayo de 2019

  
  
**Fdo. Dña. Rosa Mª Conde Vicente**  
**Secretario Técnico CEIm**



## EVALUACIÓN CLÍNICA, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE LÍPIDOS (LTPs) COMO ALÉRGENOS DE *TRITICUM AESTIVUM* (PAN), *TRITICUM DURUM* (PASTA) Y MELOCOTÓN.

**Autoras:** Alicia Moncada Salinero; Ligia Montero de la Fuente. Universidad de Valladolid. Promoción 2013-2019.

**Tutor de trabajo de fin de grado:** Alicia Armentia Medina. **Co-tutor:** Sara Martín Armentia



### INTRODUCCIÓN

La alergia es una reacción adversa de causa inmunológica que se presenta en un individuo tras entrar en contacto con un alérgeno. La alergia al trigo es la más común entre las alergias a cereales. Se distinguen dos cultivos involucrados en alergia y asma: *T.aestivum* (pan) y *T.durum* (pasta).



Las LTP pertenecen a la superfamilia de prolaminas, siendo la principal función la defensiva. La clínica de alergia a las LTPs provoca síntomas de aparición inmediata, en < 1h y graves.

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Una LTP presente en *T.aestivum* (Tri a 14) ha sido identificada como responsable de la alergenidad de esta variedad cereal usado para pan. Sin embargo, los alérgenos del *T.durum* (usado para pastas) no son conocidos.

El objetivo es la evaluación clínica, identificación y caracterización molecular de una LTP como alérgeno de *T.durum*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyen en el estudio 39 sujetos en total: 7 pacientes controles y 32 con alergia; divididos a su vez en dos grupos: 20 con asma del panadero (BA) estudiados en el HURH mediante prick, IgE a trigo y provocación con harina; y 12 con alergia alimentaria a trigo (WFA/WDEIA) estudiados con las mismas pruebas y provocación oral. Se realizó un análisis inmunológico (análisis molecular por microarrays) en el HURH y el análisis de la estructura tridimensional de las proteínas implicadas se realizó en la Universidad de Bochum (Dortmund University).



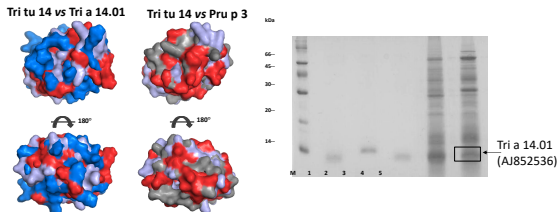
- BA: baker asthma → asma del panadero
- FA/WDEIA: food allergy/wheat dependent exercise induced allergy → alergia alimentaria al trigo/alergia inducida por el ejercicio trigo dependiente

### RESULTADOS

Validación de la molécula recombinante de *T.durum*: Tri tu 14:

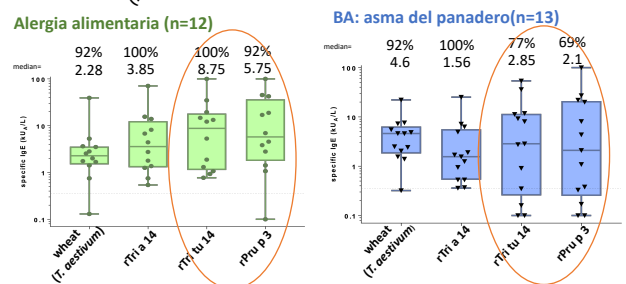
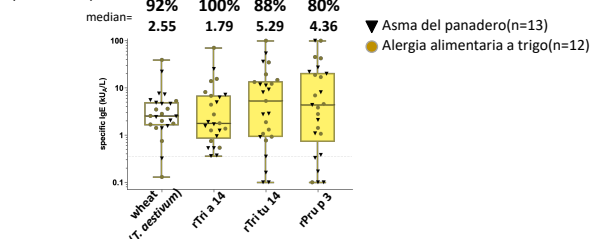
La superposición de las estructuras tridimensionales: Tri tu 14 solapada con Tri a 14 y Pru p 3. En **ROJO** los puntos coincidentes de las estructuras proteicas. Aminoácidos conservados en la superficie mayor entre Tri tu 14 y Pru p 3 que entre Tri tu 14 y Tri a 14.

La masa molecular aparente de Tri tu 14 es comparable con la de rTri a 14.01 y nPru p 3.



### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

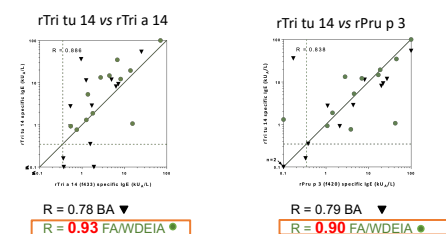
Reactividad IgE ante Tri tu 14 en pacientes con alergia alimentaria a trigo y asma del panadero. Un 92% (23/25) presentaban ImmunoCAP + rTri a 14 (25/25) y valores de IgE específica + para extracto de trigo (*T.aestivum*). 2/25 restantes sí reactivos a Tri tu 14 → incremento de la sensibilidad diagnóstica al utilizar LTP de trigo (8%, 2/25).



El 100% de pacientes con **Alergia alimentaria** estaban sensibilizados a Tri tu 14, mientras que solo el 77% de los **asmáticos** lo estaban. Pru p 3 tiene mayor similitud con Tri tu 14 que con Tri a 14 por ello los pacientes con BA reaccionan menos a Pru p 3 (BA 69% vs FA/WDEIA 92%).

Los valores específicos para Tri tu 14 y Tri a 14 revelaron una buena correlación general ( $R = 0,886$ ). Dicha correlación fue más pronunciada en el subgrupo de pacientes alérgicos a **alergia a alimentos** ( $R = 0,930$ ).

Hay una **fuerte correlación** ( $R=0.90$ ) de Tri tu 14 y Pru p 3 en los pacientes con **alergia a alimentos**, mas débil en asmáticos ( $R=0.79$ ) lo que traduce la **gran similitud** de estas dos proteínas. La estrecha asociación entre la sensibilización a Tri tu 14 y Pru p 3 y la reactividad cruzada frente ambas nsLTPs puede explicarse por los **síntos específicos de unión conservados** en ambas moléculas.



### CONCLUSIONES

- Se ha **confirmado** la existencia de LTP Tri tu 14 de *T.durum* (trigo para hacer pasta).
- Tri tu 14 (LTP de trigo de **pasta**) más que Tri a 14 (LTP de trigo para pan), está asociado con **alergia alimentaria**.
- La sobreexpresión de Tri tu 14 en los cereales del trigo por agresiones externas incrementará su alergenidad.
- Con las LTP la fiabilidad **diagnóstica** aumenta. La purificación y aislamiento óptimos de los alérgenos para su utilización en test in vivo e in vitro es muy importante en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas, especialmente en individuos con antecedentes de reacciones de gravedad como anafilaxia, en el que la única forma de diagnóstico es mediante test in vitro.
- Terapéutica:** futuro desarrollo de inmunoterapia específica con LTPs de trigo. El descubrimiento de nuevas LTP como alérgenos del trigo permite tener un objetivo claro en el tratamiento mediante inmunoterapia, como ya se está realizando con Pru p 3, así evitar anafilaxias por las LTPs y su gravedad.

### BIBLIOGRAFÍA destacada:

A Orovitg Cardona1, J Cuesta Herranz2. Manejo de la alergia a vegetales por profilinas y LTP - Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. Investig Allergol Clin Immunol 2011. 10 de noviembre de 2011;21(Supplement 4):56-69.  
Armentia A, Garrido-Arandia M, Cubells-Baeza N, Gómez-Casado C, Díaz-Perales A. Bronchial Challenge With Tri a 14 as an Alternative Diagnostic Test for Baker's Asthma. J Invest Allergol Clin Immunol. 2015;25(5):352-7.  
Lucas JSA, Atkinson RG. What is a food allergen? Clin Exp Allergy. 2008;38(7):1095-9.

**AGRADECIMIENTOS:** A la Dra. Armentia Medina por su paciencia infinita y dedicación. Al personal del hospital por su colaboración y a lo pacientes por su participación.