

Trabajo de Fin de Máster

RESPUESTA CELULAR FRENTE A ALÉRGENOS FRUTALES

Cellular response against fruit allergens

Autora

Deisy Arce Recalde

Directores

Alberto Anel Bernal

Carlos Colás Sanz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de ciencias. Universidad de Zaragoza

Curso 2020-2021

Índice

0. RESUMEN	1
0. Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Alergia alimentaria	3
1.1.1. Epidemiología	3
1.1.2. Definición y clasificación	4
1.2. Respuesta inmunitaria en reacciones alérgicas mediadas por IgE	5
1.2.1. Fase de sensibilización	6
1.2.2. Fase efectora	7
1.3. Alérgenos vegetales	9
1.3.1. Proteínas transportadoras de lípidos (LTP)	10
1.3.2. Reactividad cruzada y Síndrome LTP	11
1.3.3. Mal d 3, la LTP de manzana	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Estudio de la alergenicidad de la proteína vegetal LTP	14
2.1.1. Efecto de la desnaturalización sobre la alergenicidad de la proteína Pru p 3 de melocotón	14
2.1.2. Efecto de la madurez y del almacenamiento en la proteína Mal d 3 de manzana	15
2.2. Respuesta celular contra alérgenos vegetales	16
2.2.1. Efectos de la proteína Pru p 3 sobre PBMCs de pacientes alérgicos a la LTP del melocotón.....	16
2.2.2. Efectos de la gliadina sobre PBMCs de pacientes alérgicos al trigo.....	17
3. OBJETIVOS	18

4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Sujetos de estudio	19
4.2. Extracción de proteínas de la piel de manzana	19
4.3. Aislamiento y purificación de la LTP de manzana (Mal d 3)	20
4.3.1. Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose	20
4.3.2. Ultrafiltración	21
4.3.3. SDS-Electroforesis.....	21
4.4. Cultivos celulares	22
4.4.1. Condiciones de esterilidad	22
4.4.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	22
4.4.3. Mantenimiento del cultivo celular	23
4.4.4. Contaje y determinación de la densidad y viabilidad celular	24
4.5. Citometría de flujo	25
4.5.1. Inmunofenotipado para el estudio de la evolución de la población de linfocitos T.....	25
4.5.2. Inmunofenotipado para el estudio de la evolución de la población de linfocitos B	26
4.6. Enzimoinmunoensayo ELISA para la cuantificación de interleucinas 4 y 5	28
4.6.1. Reactivos, tampones y soluciones estándar	28
4.6.2. Elaboración de la recta patrón	29
4.6.3. Protocolo del set comercial ELISA MAX™	29
4.7. Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1. Purificación de la proteína LTP de manzana (Mal d 3)	31
5.2. Efectos de Mal d 3 sobre PBMCs de sujetos alérgicos	32
5.2.1. Evolución del porcentaje y el número total de linfocitos T CD4 ⁺	32
5.2.2. Evolución del porcentaje y el número total de linfocitos B	35

5.3. Cuantificación de la secreción de IL-4 e IL-5.....	37
5.3.1. Secreción de IL-4.....	38
5.3.2. Secreción de IL-5.....	38
6. CONCLUSIONES.....	41
6. Conclusions	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
8. ANEXOS: Datos clínicos de los pacientes alérgicos	49

0. Resumen

La **alergia alimentaria** es una patología crónica que afecta entre el 3% y el 6% de la población mundial, llegando a aumentar hasta un 8% en los niños. Es ocasionada por una **respuesta exagerada y errónea** del sistema inmunitario del paciente al verse expuesto a determinados alérgenos de origen alimentario. Es capaz de afectar a un gran número de sistemas del organismo, dando lugar a una amplia variedad de síntomas que van desde una leve urticaria hasta la anafilaxia, que puede llegar a ser mortal sin atención médica urgente. Entre los alérgenos alimenticios más comunes se encuentran los alérgenos vegetales, causantes de más del 70% de las alergias inducidas por alimentos. Y, entre los vegetales, las responsables de casi el **60% de las reacciones** inducidas por frutas son las frutas de la familia de las **rosáceas** como el melocotón o la manzana. En España, la **manzana** tiene uno de los mayores ratios de reacciones sistémicas graves (>35%), por lo que supone un importante problema de salud pública. En este estudio nos centraremos en la proteína más alergénica de la manzana, una proteína transportadora de lípidos (LTP) denominada **Mal d 3**.

El objetivo principal será comprobar si es posible **imitar la respuesta propia de la alergia en cultivos *in vitro***. Para ello, se establecieron cultivos de células mononucleares de sangre periférica procedentes de pacientes alérgicos o de donantes sanos como control, y se determinaron a días 0, 4 y 6 de cultivo el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y de linfocitos B y la viabilidad celular en presencia o ausencia del alérgeno en cuestión. Además, a días 4 y 6 se midió la producción de IL-4 y de IL-5 (interleucinas características de la alergia). Como segundo objetivo del trabajo se analizó la posible **disminución de la capacidad alergénica** de la proteína tras un **procesamiento enzimático** que da lugar a la pérdida de su estructura. En los resultados se observó una gran capacidad intrínseca de **supervivencia** tanto en las células B como en las células T CD4⁺ procedentes de los pacientes alérgicos. Asimismo, se observó una gran **producción de IL-5** en pacientes alérgicos a nivel basal y al exponer los cultivos al alérgeno en estado nativo que no se vio en presencia del alérgeno proteolizado o de la enzima responsable de la proteólisis.

0. Abstract

Food allergies are a chronic pathology that affects between 3% and 6% of the world's population, with an increase of up to 8% in children. They are caused by an exaggerated and erroneous response of the patient's immune system when exposed to certain food allergens. They are capable of affecting a large number of body systems, inducing a wide variety of symptoms ranging from mild urticaria to anaphylaxis, which can be fatal without urgent medical attention. Among the most common food allergens are plant allergens, which cause more than 70% of food-induced allergies. And, among vegetables, fruits of the rosaceae family, such as peaches and apples, are responsible for almost 60% of fruit-induced reactions. In Spain, apples have one of the highest ratios of severe systemic reactions (>35%), which is an important public health problem. In this study we will focus on the most allergenic protein in apple, a lipid transport protein (LTP) called Mal d 3.

The aim will be to test whether it is possible to mimic the allergy response in *in vitro* cultures. For this purpose, cultures of peripheral blood's mononuclear cells from allergic patients or healthy donors as controls were established and the percentage of CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes and cell viability in the presence or absence of the allergen in question were determined at days 0, 4 and 6 of culture. In addition, at days 4 and 6, the production of IL-4 and IL-5 (interleukins characteristic of the allergic reaction) was measured. The second objective of the study was to analyze the possible decrease in the allergenic capability of the protein after enzymatic processing resulting in the loss of its structure. The results showed a high intrinsic survival capability in both B cells and CD4⁺ T cells from allergic patients. Additionally, a high production of IL-5 was observed in allergic patients at basal level and upon exposure of the cultures to the allergen in the native state which was not seen in the presence of the proteolyzed allergen or the enzyme responsible for proteolysis.

1. Introducción

1.1. Alergia alimentaria

1.1.1. Epidemiología

La alergia alimentaria es una patología crónica que afecta entre 220 y 520 millones de personas en todo el mundo según datos de la Organización Mundial de Alergia (WAO, por sus siglas en inglés), es decir, entre el 3% y el 6% de la población mundial, llegando a aumentar hasta un 8% en los niños. Aunque bien es cierto que no es fácil determinar su prevalencia debido a que varía mucho dependiendo del área geográfica, la dieta, el tipo de población y la metodología de estudio, se sabe que ésta ha ido aumentando a lo largo de las últimas décadas. Sobre todo, en los países industrializados. De hecho, se estima que su incidencia se ha duplicado en los últimos 10 años [1], considerándose en la actualidad un importante problema de salud pública.

El informe Alergológica 2015 [2] de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC) reveló que, en el estado español, la alergia alimentaria tiene una incidencia de hasta el 11,4% en los pacientes que acuden por primera vez a un alergólogo. En la Figura 1 se recogen los alimentos más frecuentemente implicados en la reacción alérgica según datos obtenidos a lo largo de los últimos 20 años [2]. Los alimentos de origen vegetal son la principal causa de las reacciones (73,1%) y, entre los vegetales, las frutas frescas son la causa más frecuente (44,7%), siendo las frutas de la familia de las rosáceas (melocotón, manzana, albaricoque, ciruela, fresa...) las que más reacciones alérgicas indujeron (59,4%).

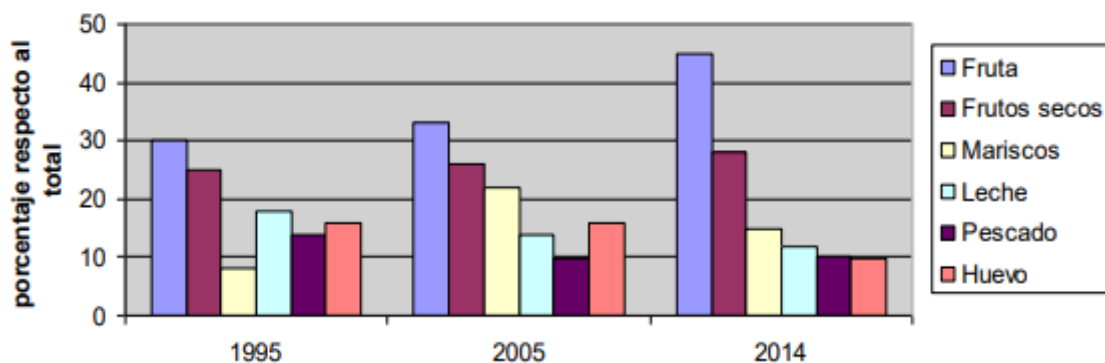


Figura 1: Evolución de los alimentos más frecuentemente implicados en las reacciones alérgicas de la población española [2].

1.1.2. Definición y clasificación

La alergia alimentaria es ocasionada por una reacción exagerada y errónea del sistema inmunitario del paciente al verse expuesto a determinados alérgenos de origen alimentario, ya sea por ingesta, contacto o inhalación. Generalmente, estos alérgenos son proteínas que no producen reacciones adversas en la mayoría de la población debido a que su sistema inmunitario no las identifica como extrañas. En la alergia, la reacción anómala no depende de la dosis del alérgeno, sino de la susceptibilidad de cada individuo y es capaz de afectar a un gran número de sistemas del organismo como la piel, el tracto respiratorio, el aparato digestivo y/o el aparato cardiovascular [3], dando lugar a síntomas que, como se observa en la Tabla 1, varían desde una leve urticaria hasta la anafilaxia, una reacción multisistémica grave que puede llegar a ser mortal sin atención médica urgente.

Tabla 1: Manifestaciones clínicas atribuidas a la alergia alimentaria [4].

Digestivas	Respiratorias	Cutáneo-mucosas	Otras
Dolor abdominal	Rinitis	Urticaria	Anafilaxia
Náuseas y vómitos	Asma	Angioderma	Conjuntivitis
Diarrea	Tos crónica	Prurito	Artritis
Constipación	Otopatía serosa	Dermatitis atópica	Cistitis
Malabsorción	Edema de glotis	Dermatit. perianal	Muerte súbita
Enteropatía	Neumonía recurrente	Dermatit. herpetiforme	
Cólicos	Hemosiderosis pulmonar	Síndrome oral	
		Rash de contacto	

La intervención del sistema inmunitario es lo que diferencia la alergia alimentaria del resto de afecciones alimentarias como las intolerancias o las intoxicaciones (Figura 2). Las intolerancias son patologías alimentarias no inmunomediadas que se dan principalmente por defectos en enzimas involucradas en el metabolismo de los alimentos, por la acción farmacológica de compuestos químicos presentes de forma natural o añadida en los alimentos o por otros mecanismos no definidos. Por su parte, las intoxicaciones comprenden aquellas afecciones producidas por agentes químicos o biológicos contenidos en los alimentos. Incluyen reacciones inducidas por plaguicidas o metales pesados, por microorganismos y sus toxinas o por componentes naturales de los propios alimentos como latirógenos [5].



Figura 2: Tipos de reacciones adversas ocasionadas por alimentos [6].

En la alergia, la respuesta inmunitaria incluye tanto reacciones mediadas por anticuerpos IgE como las producidas por cualquier otro mecanismo inmunitario, no mediadas por IgE. Las reacciones mediadas por IgE son las más frecuentes y provocan una respuesta inmediata (respuesta humoral); es decir, que la sintomatología aparece a los minutos u horas tras la exposición al alérgeno y se caracterizan por la producción de altos niveles de la inmunoglobulina de isotipo E. Por otro lado, las reacciones no mediadas por IgE, también denominadas tardías, dan lugar a una respuesta celular o a una respuesta en la que intervienen otras clases de inmunoglobulinas. En este último caso, los síntomas se desarrollan entre las 24 y 48 horas tras el contacto, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico al ser más difícil establecer una relación directa entre los síntomas y la exposición al alérgeno [7]. Además, las reacciones alérgicas pueden verse agravadas o precipitadas por factores como el ejercicio físico, la ingesta de alcohol o de antiinflamatorios no esteroideos.

1.2. Respuesta inmunitaria en reacciones alérgicas mediadas por IgE

La reacción alérgica se desarrolla tras varios pasos y requiere una exposición repetida al alérgeno. El primer contacto con el alérgeno induce la producción de IgE (Fase de sensibilización) en individuos genéticamente predispuestos. Tras una nueva exposición, se desencadena la respuesta alérgica mediada por IgE (Fase efectora).

1.2.1. Fase de sensibilización

La primera exposición del sujeto al alérgeno pone en marcha un proceso silencioso de sensibilización (Figura 3) sin manifestaciones clínicas. Sea cual sea la vía de sensibilización (digestiva, respiratoria, intradérmica o por contacto con la piel) las células presentadoras de antígenos o APCs (macrófagos, células M y células dendríticas) son las primeras células del sistema inmune en entrar en contacto con el antígeno. A nivel gastrointestinal, las células dendríticas (CD) se encuentran localizadas en la lámina propia, las placas de Peyer, los ganglios mesentéricos e intercaladas entre las células del epitelio intestinal [8]. Estas células capturan el alérgeno, lo procesan y lo transportan a los ganglios linfáticos para presentar sus fragmentos a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Th0) a través del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II), las cuales se diferenciarán a células efectoras dando lugar a tres posibles respuestas: tolerancia, mediada por IgE o no mediada por IgE. Lo que ocurre en condiciones normales es la tolerancia, en la cual se desencadena una respuesta mediada por células T reguladoras (Treg) que suprimen la respuesta inmune efectora generando tolerancia al alérgeno [9]. Por su parte, en la respuesta inmune no mediada por IgE la secreción de interleucinas tales como la IL-12 o IL-27 producen la diferenciación de los linfocitos Th0 a linfocitos T colaboradores de tipo 1 (Th1) [9].

En la respuesta inmune mediada por IgE, los linfocitos Th0, en presencia de mediadores como la IL-4, se diferencian a linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) que, a su vez, empiezan a secretar interleucinas típicas de la respuesta Th2 como la IL-13, IL-5 o IL-4 [10]. De estas interleucinas, es principalmente la IL-4 la que favorece un cambio de clase a cadena pesada ϵ en las inmunoglobulinas de las células B, dando lugar a su maduración y diferenciación a células plasmáticas que participarán de manera activa en las reacciones contra el alérgeno, produciendo y secretando, esencialmente, anticuerpos de clase IgE [11, 12]. Las IgE secretadas al medio por las células plasmáticas pasan a la circulación y se unen a receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) en la superficie de la membrana celular de mastocitos y basófilos, cuya proliferación y supervivencia se ve favorecida por la IL-5 y la IL-13, generando células sensibilizadas con anticuerpos expuestos y listos para unirse al alérgeno en futuras exposiciones, finalizando así esta primera fase asintomática [13].

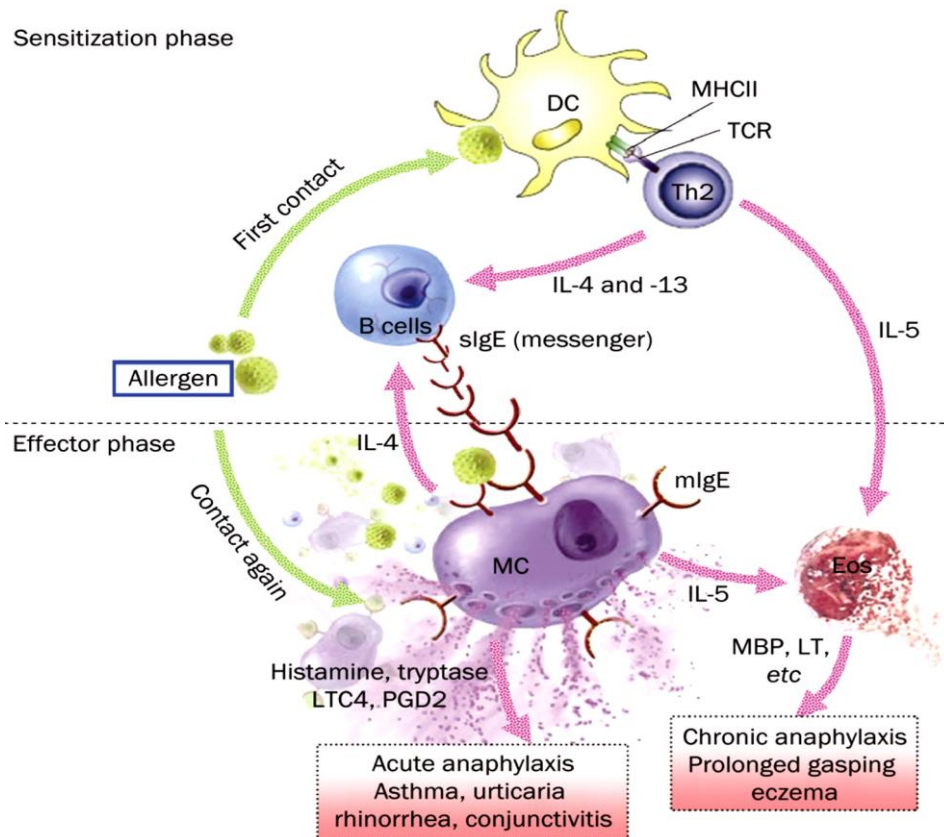


Figura 3: Mecanismo de la respuesta alérgica inflamatoria mediada por IgE. MC: mastocito; DC: célula dendrítica; Eos: eosinófilo; sIgE: IgE específica; mIgE: IgE unida a la membrana; TCR: receptor de las células T; MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; PGD: prostaglandina; LT: leucotrieno; MBP: proteína básica principal [14].

1.2.2. Fase efectora

Tras la fase de sensibilización, cuando el paciente vuelve a verse expuesto al alérgeno, se desencadenan diferentes respuestas en las que se verá envuelto más de un tipo celular.

Por un lado, la gran afinidad de las IgE por los receptores de superficie FcεRI de mastocitos y basófilos, hace que éstos estén en su mayoría saturados por este tipo de inmunoglobulina y, como consecuencia, la unión del alérgeno a algunas de estas moléculas produce su entrecruzamiento

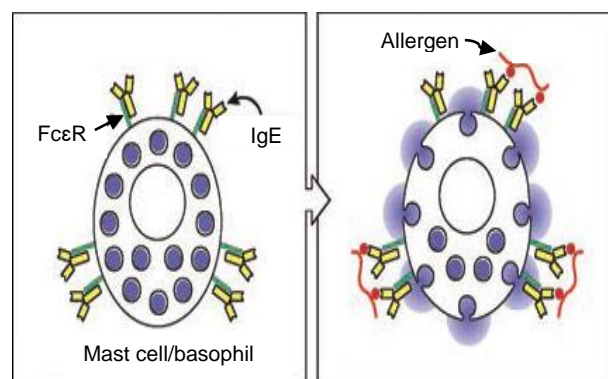


Figura 4: Entrecruzamiento entre inmunoglobulinas IgE unidas a los receptores FcεRI de mastocitos y/o basófilos originado por la presencia del alérgeno y que da lugar a la degranulación [15].

y la agregación de los receptores al que se encuentran unidas (Figura 4). La

agregación de los receptores conduce a la activación de mastocitos y basófilos produciendo cambios en su membrana celular y desencadenando una serie de reacciones en cascada que finaliza con la degranulación y secreción de diferentes moléculas proinflamatorias (Tabla 2) al medio extracelular [15]. Los mediadores primarios preformados y almacenados en los gránulos de mastocitos y basófilos se liberan de forma inmediata originando una respuesta rápida al ser liberados. Mientras, los mediadores secundarios se sintetizan *de novo* tras la activación celular y se secretan al medio más tarde, ejerciendo su acción de forma más lenta [16]. Es decir, este tipo de células pueden ser responsables de una respuesta tanto inmediata como tardía. Todos los mediadores liberados son responsables de las manifestaciones clínicas características a nivel de piel y mucosas (nasal, bronquial, ocular y del tracto gastrointestinal) [17]. Su función será sostener en el tiempo el proceso inflamatorio a través de la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad capilar, la contracción del músculo liso y la infiltración de otras células que contribuyen a la inflamación que son atraídas específicamente al foco inflamatorio, como son los eosinófilos.

Tabla 2: Mediadores celulares implicados en la respuesta alérgica [15].

	Mediadores	Efectos biológicos*
Preformados, almacenados en los gránulos y secretados tras la activación (en minutos)	Histamina	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la permeabilidad vascular y la vasodilatación • Contracción del músculo liso bronquial • Causa picor y dolor • Influye en la respuesta inmunitaria y en la función de algunos nervios
	Heparina	<ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulante • Necesaria para almacenar otros mediadores en los gránulos
	Proteasas (p.ej. tiptasa, quimasa, carboxipeptidasa A3)	<ul style="list-style-type: none"> • Degrada ciertas proteínas y péptidos, como componentes de los venenos animales • Regula la remodelación tisular • Convierte la angiotensina I en angiotensina II (quimasa)
Sintetizados y secretados tras la activación (en minutos para mediadores lipídicos y horas para los peptídicos†)	Mediadores lipídicos (p.ej. leucotrienos, prostaglandinas)	<ul style="list-style-type: none"> • Regulan la migración y la función de los leucocitos • Aumentan la permeabilidad vascular • Inducen vasoconstricción o vasodilatación (según el mediador) • Contraen o relajan el músculo liso (vías respiratorias, tracto gastrointestinal) • Estimulan la secreción de moco
	Citocinas, quimiocinas	Muchos efectos sobre otras células (leucocitos y células dendríticas) que pueden estimular o suprimir la inflamación y/o remodelación tisular

* Solo se mencionan algunos de los numerosos efectos biológicos de los mediadores

† Algunos de estos pueden estar presentes en los gránulos y por lo tanto también pueden liberarse rápidamente tras la activación del mastocito.

Por otro lado, se estimula el desarrollo y la diferenciación de eosinófilos en la médula ósea debido a la acción de la IL-5 secretada por los linfocitos Th2 y los mastocitos activados. Además, esta misma citocina provoca la activación de los eosinófilos ya maduros en circulación. Estos efectos de la IL-5 sobre los eosinófilos finalizan con su reclutamiento en el tejido inflamado, es decir, participarán en la fase tardía amplificando la respuesta inmune también mediante la liberación del contenido de sus gránulos celulares (Figura 3). Este tipo celular se encuentra implicado principalmente en la defensa contra parásitos helmintos, por lo que las moléculas que secretan son potencialmente tóxicas para las células vecinas y pueden ocasionar graves daños tisulares, como ocurre en el caso del asma, en el que las moléculas citotóxicas producen lesiones en las células epiteliales bronquiales.

1.3. Alérgenos vegetales

Como ya se ha mencionado, según el informe Alergológica 2015 [2] los alérgenos de origen vegetal son los causantes de más del 70% de las reacciones alérgicas de origen alimentario. En la actualidad, esto supone un problema sanitario de una magnitud considerable en los países occidentales, ya que, con frecuencia las reacciones alérgicas inducidas por estos alérgenos se asocian con reacciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida de los pacientes [18]. Los alérgenos vegetales pueden clasificarse en tres grupos funcionales (Figura 5):

- Proteínas de reserva: se acumulan sobre todo en semillas maduras y su función principal es el suministro de nutrientes durante la germinación. Se divide en dos grandes superfamilias: las prolaminas y las cupinas [19].
- Proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras: tienen funciones heterogéneas y se sintetizan en la planta de forma constitutiva o en respuesta a factores ambientales. Es un grupo amplio en el que se incluyen las profilinas y las oleosinas, entre otras.
- Proteínas de defensa: se encuentran implicadas en mecanismos de protección frente a patógenos y diferentes situaciones de estrés (frío, calor, salinidad, plagas...). La mayoría poseen una alta resistencia a tratamientos térmicos y enzimáticos debido a su estructura [20]. Incluye familias proteicas como la familia PR-1, homólogos de Bet v 1 o proteínas transportadoras de lípidos (LTP).

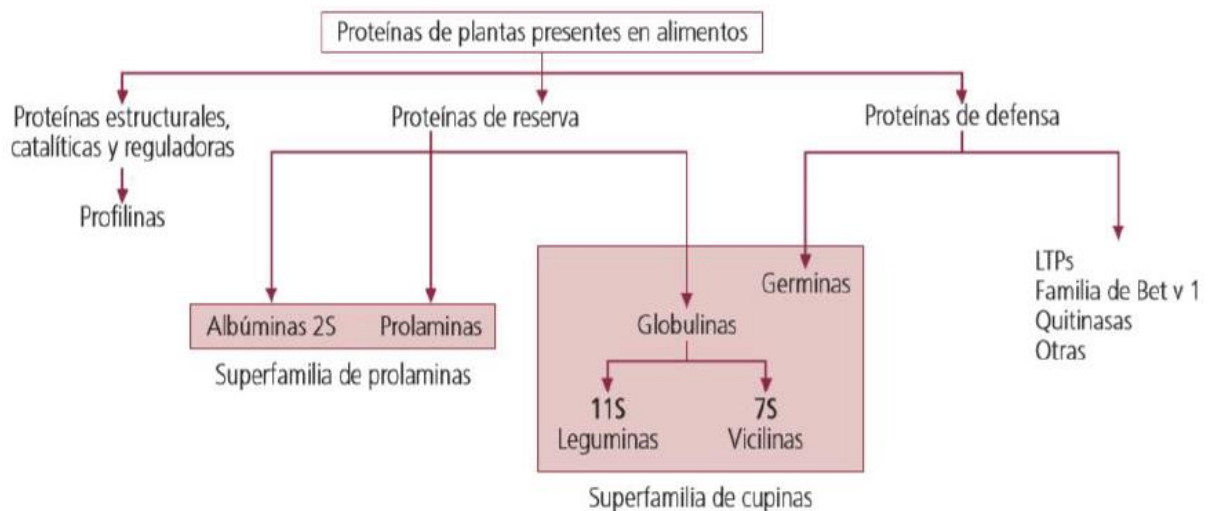


Figura 5: Grupos de proteínas alergénicas de plantas presentes en alimentos [21].

1.3.1. Proteínas transportadoras de lípidos (LTP)

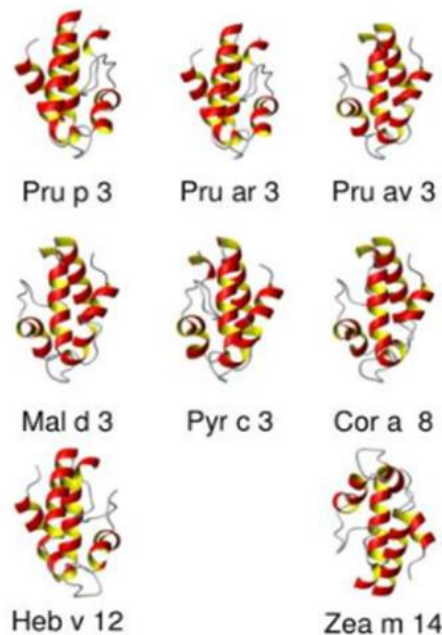
Esta familia de proteínas se caracteriza por poseer un bajo peso molecular, entre 7-9 kDa, y una estructura tridimensional altamente conservada. Todas ellas tienen estructuras ricas en α -hélices y poseen un grupo de 8 residuos cisteína, formando 4 enlaces disulfuro intracatenarios [22], que les confiere una elevada estabilidad responsable de su gran resistencia a altas temperaturas y a la degradación por proteasas digestivas. Esta característica les permite llegar prácticamente intactas a la zona baja del tubo digestivo tras su ingesta desencadenando la respuesta inmunitaria. Además, esto también se hace visible cuando, tras haber recibido diferentes tratamientos tecnológicos, podemos encontrar las proteínas en productos vegetales procesados como la cerveza, el vino, los zumos o las mermeladas, sin haber sufrido una pérdida significativa de su capacidad alergénica [23, 24]. En consecuencia, existen numerosas investigaciones para lograr disminuir la alergenicidad de estas moléculas modificando su estructura por diversos métodos fisicoquímicos tales como tratamientos con altas temperaturas [25, 26], con altas presiones [27] o con agentes reductores [28].

Cierto es que estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, pero se encuentran más frecuentemente asociadas a las frutas de la familia de las rosáceas (responsables del 59,4% de las reacciones alérgicas inducidas por frutas) entre las que se encuentran el melocotón, la manzana, el albaricoque o la fresa.

Son proteínas generalmente extracelulares que se ubican en las capas externas de la pared celular asociadas principalmente al tejido epidérmico (dada su función defensiva), lo que explica la mayor capacidad alergénica de la piel en comparación con la pulpa en este tipo de frutas [29].

1.3.2. Reactividad cruzada y Síndrome LTP

La reactividad cruzada es un fenómeno inmunológico en el cual un mismo anticuerpo IgE reconoce dos antígenos de diferentes fuentes alergénicas no relacionadas taxonómicamente a causa de un alto grado de homología estructural o de identidad en la secuencia de aminoácidos [30], tal y como ocurre en la familia de proteínas LTP (Figura 6).



Pru_p_3	T	C	G	Q	V	S	S	A	L	A	P	C	I	P	T	V	R	G	G	G	A	V	P	P	A	-	C	C	N	G	I	R	N	V	N	L	A	R	T	T	P	D	R	Q	A	A	C	N	C	L	R	Q	L	S	A	S	V	P	G	V	N	P	N	N	A	A	L	P	G	K	C	G	V	H	I	P	Y	K	I	S	A	S	T	N	C	A	T	V	K	
Mal_d_3	T	C	G	Q	V	T	S	S	L	A	P	C	I	G	V	R	S	G	G	A	V	P	P	A	-	C	C	N	G	I	R	T	I	N	G	L	A	R	T	T	A	D	R	Q	T	A	C	N	C	L	R	N	L	A	G	S	I	S	G	V	N	P	N	N	A	A	L	P	G	K	C	G	V	N	P	Y	K	I	S	T	S	T	N	C	A	T	V	K		
Pru_av_3	T	C	G	Q	V	S	S	N	L	A	P	C	I	A	T	V	R	G	G	A	V	P	P	A	-	C	C	N	G	I	R	N	I	N	L	A	K	T	T	A	D	R	Q	T	A	C	N	C	L	R	Q	L	S	A	S	V	P	G	V	N	P	N	N	A	A	L	P	G	K	C	G	V	N	P	Y	K	I	S	P	S	T	N	C	A	T	V	K			
Pru_ar_3	T	C	G	Q	V	S	S	L	A	P	C	I	G	V	R	S	G	G	A	V	P	P	A	-	C	C	N	G	I	R	N	V	N	L	A	R	T	T	P	D	R	R	T	A	C	N	C	L	R	Q	L	S	G	S	I	S	G	V	N	P	N	N	A	A	L	P	G	K	C	G	V	N	I	P	Y	K	I	S	A	S	T	N	C	A	T	V	K			
Cor_a_8	T	C	P	Q	I	K	G	N	L	T	P	C	V	L	Y	L	K	N	G	G	V	L	P	P	S	-	C	C	K	G	V	R	A	V	N	D	A	S	R	T	T	S	D	R	Q	S	A	C	N	C	L	R	D	T	A	K	G	I	A	G	L	N	E	N	L	A	A	L	P	G	K	C	G	V	N	I	P	Y	K	I	S	P	S	T	N	C	M	N	V	K
Hev_b_12	T	C	G	Q	V	S	A	L	V	P	C	L	S	Y	L	K	T	T	G	P	T	P	P	A	-	C	C	N	G	V	R	I	N	N	A	A	K	T	T	A	D	R	R	T	A	C	C	C	L	R	S	A	A	G	S	V	K	G	L	N	P	T	T	V	A	G	L	P	G	K	C	G	V	N	I	P	Y	K	I	S	L	S	T	N	C	A	T	V	K	
Pyr_c_3	T	C	S	Q	V	S	A	N	L	A	P	C	I	N	Y	R	S	G	G	A	V	P	P	A	-	C	C	N	G	I	K	T	I	N	G	L	A	K	T	T	P	D	R	Q	A	A	C	N	C	L	R	N	L	A	G	S	V	S	G	V	N	E	G	N	A	E	S	L	P	G	K	C	G	V	N	P	Y	K	I	S	T	S	T	N	C	A	T	V	K	
Zea_m_14	S	C	G	Q	V	A	S	A	I	A	P	C	I	S	Y	A	R	G	Q	G	S	G	P	S	A	G	-	C	C	S	G	V	R	S	L	N	N	A	R	T	T	A	D	R	R	A	A	C	N	C	L	R	N	N	A	A	G	V	S	G	L	N	A	G	N	A	S	I	P	S	K	C	G	V	S	I	P	Y	T	I	S	T	S	T	D	C	S	R	V	N

Figura 6: Estructura molecular de diferentes proteínas LTP (melocotón, albaricoque, cereza, manzana, pera, avellana, látex y maíz) con sus secuencias peptídicas alineadas. Las secuencias idénticas se resaltan en gris, mientras que los 8 residuos de cisteína altamente conservados se destacan en amarillo.

Se ha demostrado mediante ensayos de inhibición que la proteína LTP de tipo 1 del melocotón, conocida como Pru p 3, es en la mayoría de los casos el sensibilizador primario que posteriormente dirige la respuesta alérgica hacia el reconocimiento de otras LTPs [31, 32]. Debido a esto, Pru p 3 es considerada como el prototipo de esta familia de alérgenos ya que es inusual encontrar pacientes alérgicos a estas moléculas sin que la proteína del melocotón se encuentre implicada. Esto se debe a que todas las proteínas LTPs alergénicas muestran entre un 45 y un 95 por ciento de similitud con la secuencia peptídica de Pru p 3 y esta similitud es la base de la amplia reactividad cruzada que presenta este grupo de alérgenos en alimentos vegetales y pólenes [33] y que da lugar al Síndrome LTP.

Este síndrome que presentan los pacientes alérgicos a la LTP hace que un gran número de ellos se encuentre sensibilizado no solo a múltiples alimentos que, además va aumentando con el tiempo [34], sino también a diferentes neumoaérgenos, haciéndoles padecer enfermedades respiratorias como rinoconjuntivitis o asma bronquial. Se estima que entre el 30% y el 60% de los pacientes con polinosis en Europa presentan alergia a alimentos vegetales, mientras que en España la prevalencia de polinosis con alergia a alimentos vegetales es del 39,9% [35]. En estos pacientes el riesgo de reacciones sistémicas o anafilácticas es mayor, pero incluso en los pacientes que padecen reacciones entre leves y moderadas el impacto en su calidad de vida es bastante significativo dado el número tan elevado de alimentos que tienen que evitar, así como el coste socio-económico que produce.

1.3.3. Mal d 3, la LTP de manzana

En España, la manzana tiene uno de los mayores ratios de reacciones sistémicas graves (>35%) y alta relación con la alergia al melocotón. Los resultados de un estudio anterior [36] sugieren que la alergia a la manzana es consecuencia de una sensibilización primaria al melocotón. La alergia a la manzana comenzaría debido a una reacción cruzada entre Pru p 3 y Mal d 3, la principal proteína alergénica de esta fruta.

Hasta la fecha, en la manzana se han identificado y caracterizado cuatro proteínas alergénicas que pertenecen a las diferentes familias que ya se han mencionado (Tabla 3). Sin embargo, la proteína más alergénica pertenece a la familia de las LTP y se denomina Mal d 3.

Tabla 3: Proteínas alergénicas de la manzana [37].

Proteína	Peso molecular	Tipo
Mal d 1	17,5 kDa	PR10
Mal d 2	31 kDa	Taumatina
Mal d 3	9 kDa	LTP
Mal d 4	14 kDa	Profilina

Mal d 3 posee un peso molecular de 9 kDa y un punto isoeléctrico básico. Como el resto de LTPs, su función principal es la de participar en mecanismos de defensa y se localiza fundamentalmente en las capas externas de la piel de la manzana [38]. Su estructura es muy similar a la estructura de Pru p 3 (Figura 7) y consta de 4 hélices alfa y los 4 puentes disulfuro característicos de las LTP que estabilizan su estructura.

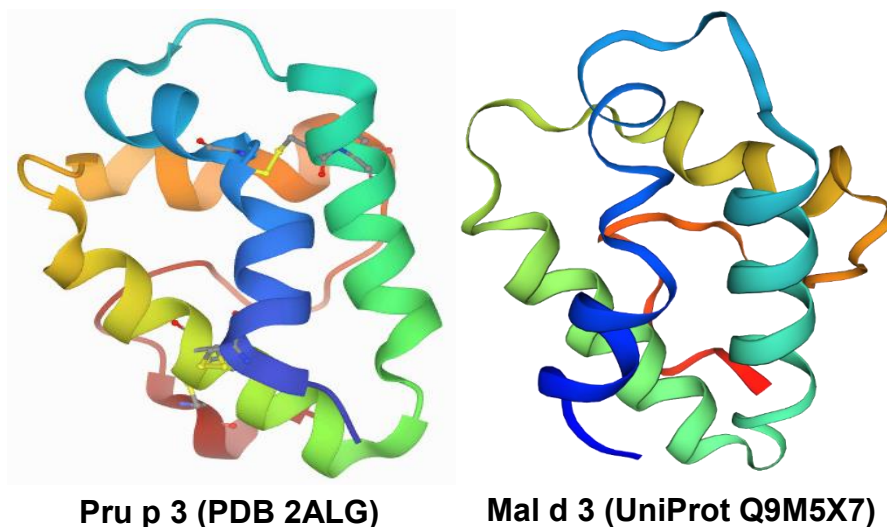


Figura 7: Estructuras moleculares de Pru p 3 (izquierda) y Mal d 3 (derecha) obtenidas del Protein Data Bank (PDB).

2. Antecedentes

2.1. Estudio de la alergenicidad de la proteína vegetal LTP

2.1.1. Efecto de la desnaturalización sobre la alergenicidad de la proteína Pru p 3 de melocotón

En un estudio anterior, realizado por el grupo de investigación ALIPAT (Efecto del Procesado Tecnológico de los Alimentos en las Patologías Digestivas y Alérgicas), se analizó el efecto de la desnaturalización sobre la alergenicidad de la proteína más alergénica del melocotón, Pru p 3. Para ello, la proteína se sometió a tratamientos con altas presiones y con campo eléctrico pulsado, combinados o no con tratamientos térmicos [39].

En primer lugar, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de Pru p 3 a partir de un extracto de piel de melocotón mediante un procedimiento perfeccionado en estudios previos [40].

La proteína pura se sometió a diferentes tratamientos y, tras ello, el grado de desnaturalización de la proteína se determinó como la pérdida de reacción de Pru p 3 con IgG de conejo mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que, tanto el procesamiento a altas presiones, como el tratamiento con campo eléctrico pulsado, ambos combinados con un tratamiento térmico, producían una considerable desnaturalización en la estructura de Pru p 3.

Por otro lado, la alergenicidad se estimó *in vitro* mediante un inmunoensayo de fluorescencia de tipo competitivo haciendo uso de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al melocotón. Este tipo de ensayo mide los cambios producidos sobre la capacidad de unión de Pru p 3 con IgEs específicas. Se observó en los resultados que ninguno de los dos tratamientos, combinados o no con un tratamiento térmico, eran capaces de generar un cambio en la reactividad entre Pru p 3 y las IgE de pacientes alérgicos al melocotón.

En vista de estos resultados, se pudo concluir que la pérdida o el cambio de la estructura tridimensional de la proteína no conlleva la pérdida de la inmunoreactividad del alérgeno y, por tanto, no reduce el riesgo para la salud del paciente. Por todo ello, se decidió seguir el estudio enfocándolo en otro tipo de tratamiento, como un procesamiento enzimático, para analizar el efecto de la proteólisis sobre la alergenicidad de la proteína.

2.1.2. Efecto de la madurez y del almacenamiento en la proteína Mal d 3 de manzana

Más recientemente, se quiso estudiar el efecto del grado de madurez en el momento de recolección y del tiempo de almacenamiento postcosecha en el contenido de la proteína Mal d 3 en diferentes variedades de manzana [41].

Como ya se ha explicado, las proteínas de la familia LTP poseen una gran similitud de secuencia y estructural, por lo que, se siguió un procedimiento perfeccionado similar al utilizado para el aislamiento y la purificación de Pru p 3 [39].

En ambos procedimientos se aísla la proteína a partir de un extracto de la piel de la fruta correspondiente y, a continuación, se purifica mediante una cromatografía de intercambio iónico en un gel de SP-Sepharose. La diferencia se basa en el proceso de ultrafiltración que sigue a la cromatografía en la purificación de Mal d 3. Este proceso evita llevar a cabo una segunda cromatografía de filtración en gel como ocurre en la purificación de Pru p 3, además de un par de pasos intermedios de dialización.

Se sacaron varias conclusiones sobre el efecto de la madurez y el almacenamiento en el contenido de Mal d 3 de diferentes variedades de manzana, pero también se concluyó que la combinación de las técnicas de cromatografía y ultrafiltración permite obtener Mal d 3 a partir de extractos de manzana con un grado de pureza superior al 95 %. Este será el procedimiento a seguir para la purificación de la proteína alérgica de estudio en el presente trabajo.

2.2. Respuesta celular contra alérgenos vegetales

2.2.1. Efectos de la proteína Pru p 3 sobre PBMCs de pacientes alérgicos a la LTP del melocotón

El grupo de investigación ALIPAT de la Dra. Dolores Pérez consiguió llevar a cabo la proteólisis de la proteína Pru p 3 del melocotón mediante un procesamiento enzimático con una proteasa de carácter ácido. Seguidamente, se decidió estudiar el efecto de dicha proteólisis sobre la alergenicidad en cultivos *in vitro* de células de pacientes alérgicos al melocotón [42].

Se establecieron cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de pacientes alérgicos para intentar imitar la respuesta T CD4⁺ propia de la alergia en cultivos *in vitro* y, también, de PBMCs de donantes sanos como control.

Las condiciones de cultivo establecidas fueron: en ausencia de proteínas, en presencia del alérgeno nativo, en presencia del alérgeno proteolizado y, por último, en presencia de la proteasa utilizada para llevar a cabo la proteólisis de Pru p 3. A días 0, 4 y 6 de cultivo se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ mediante citometría de flujo y la viabilidad celular por contaje con azul Trypan. Además, a días 4 y 6 se midió la secreción de las interleucinas 4 y 5 (interleucinas características de la alergia) mediante un ensayo ELISA.

Los resultados obtenidos no mostraron ninguna dependencia significativa de la presencia del alérgeno en la proliferación y viabilidad celular de los linfocitos T CD4⁺ procedentes de pacientes alérgicos, pero sí dejaron ver una gran capacidad intrínseca de supervivencia por parte de esta población celular en el caso de los pacientes comparados con controles sanos. Por otro lado, aunque no se detectó secreción de IL-4, el resultado más llamativo se observó en la producción de IL-5, ya que se vio un incremento significativo en su secreción en cultivos de pacientes alérgicos en presencia de Pru p 3 en estado nativo que no se dio en presencia de la proteína proteolizada o de la enzima responsable de la proteólisis. Este resultado podría ser muy interesante para su aplicación en la industria alimentaria.

2.2.2. Efectos de la gliadina sobre PBMCs de pacientes alérgicos al trigo

En el mismo estudio, se realizaron los mismos análisis estableciendo cultivos de PBMCs de pacientes alérgicos a la gliadina de trigo y de donantes sanos como control. En este caso las condiciones del cultivo fueron: en ausencia de tratamiento, en presencia de gliadina nativa y en presencia de gliadina proteolizada mediante una digestión enzimática con pepsina y tripsina.

En estos pacientes no se observó la producción de ninguna de las interleucinas. Sin embargo, el estudio de la proliferación y la viabilidad celular de los linfocitos T CD4⁺ avaló la idea, que ya se vio en los pacientes alérgicos a la LTP del melocotón, de una mayor capacidad intrínseca de supervivencia por parte de estas células en los pacientes alérgicos. Además, en el análisis celular de estos pacientes también se pudo ver que el porcentaje y el número a nivel basal de linfocitos T CD4⁺ en pacientes alérgicos era considerablemente menor que en los donantes sanos, por lo que se hipotetizó que este hecho podría estar compensado por un aumento en la fracción de PBMCs que no son linfocitos T (monocitos, células NK o linfocitos B). Esta hipótesis se ha estudiado también en el presente trabajo en pacientes alérgicos a la manzana.

3. Objetivos

Este trabajo es un estudio experimental de carácter prospectivo cuyo objetivo principal ha sido el análisis del comportamiento de las diferentes poblaciones de linfocitos (tanto B como T CD4⁺) de sangre periférica de pacientes alérgicos durante la respuesta alérgica tras ser expuestos al alérgeno LTP de manzana, en un estado de gran pureza, comparándolo con el comportamiento de estos mismos grupos celulares en sangre de sujetos control sano.

Para llevar a cabo dicho análisis se establecieron cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de pacientes alérgicos o de donantes sanos y se mantuvieron hasta 6 días en cultivo. A día 0 se determinó el porcentaje y la viabilidad celular de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺. A días 4 y 6 se determinó la evolución de estos parámetros y, además, la producción de IL-4 y de IL-5 (interleucinas características de la respuesta Th2) en presencia o ausencia del alérgeno en cuestión.

Como segundo objetivo del trabajo se analizó la posible disminución de la capacidad alérgica de la proteína tras un procesamiento enzimático que da lugar a la pérdida de su estructura.

Por todo ello, los objetivos propuestos para este trabajo fueron los siguientes:

- En primer lugar, el aislamiento y la purificación del alérgeno LTP a partir de extractos crudos de piel de manzana, mediante técnicas cromatográficas y de ultrafiltración, así como su proteólisis por medio de un procesamiento enzimático con una proteasa de carácter ácido.
- En segundo lugar, la caracterización de la respuesta linfocitaria propia de la alergia en cultivos *in vitro*.
- Por último, el establecimiento de cultivos de PBMCs en presencia o ausencia del alérgeno objeto de estudio, así como en presencia del alérgeno desnaturalizado usando, además, cultivos con la proteasa ácida como control.

4. Material y métodos

4.1. Sujetos de estudio

Gracias a la colaboración del grupo de alergología del Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza dirigido por el Dr. Carlos Colás, en el estudio se utilizaron un total de 15 muestras de sangre procedentes de pacientes alérgicos del servicio de alergología. Todos ellos mayores de 18 años, de ambos sexos y con una historia clínica compatible con las reacciones alérgicas a examen que se corroboraron mediante la realización de pruebas cutáneas de alergia, también conocidas como Prick test, previas a la extracción de sangre. En el anexo se describen las características clínicas de los pacientes alérgicos detallando: sexo, edad, alimento que causa la reacción alérgica, tiempo desde la última reacción previa al estudio, la existencia de síntomas respiratorios (rinoconjuntivitis o asma), así como su intensidad, uso de adrenalina inyectable, entre otros.

En cuanto a las muestras usadas como donantes sanos, se solicitaron un total de 10 al Banco de Sangre y Tejidos de Aragón cuyos donantes deben cumplir una serie de requisitos como: tener entre 18 y 65 años, disponer de buena salud, evitar prácticas de riesgo para la salud (drogadicción, alcoholismo...) o no haber sufrido perforaciones en la piel (tatuajes, intervenciones quirúrgicas...) en los 4 meses anteriores a la donación, entre otros.

4.2. Extracción de proteínas de la piel de manzana

La piel de diferentes variedades de manzana fue homogeneizada con ayuda de un ultraturrax T 25 (IKA®-Labortechnik). Para ello, se mezclaron 10 g de piel con 20 mL de tampón fosfato sódico 10 mM a pH 5,6 con una concentración 2 mM de sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10 mM de dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), 2% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 0,02% de azida de sodio. La mezcla se agitó durante 2 h a 4°C en un agitador orbital (LLG® Labware) y, a continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 12000 g y 4°C en una centrifuga 1736R (GYROZEN®).

Finalmente, la mezcla se filtró por gravedad haciendo uso de lana de vidrio para separar y recoger el sobrenadante.

Este proceso de extracción y los siguientes de aislamiento y purificación se llevaron a cabo en el laboratorio del área de Tecnología de los alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza en colaboración con el grupo de investigación ALIPAT.

4.3. Aislamiento y purificación de la LTP de manzana (Mal d 3)

4.3.1. Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose

El extracto obtenido tal y como se describe en el apartado anterior se incubó a temperatura ambiente con gel SP-Sepharose™ (GE Healthcare) con agitación suave durante 2 h. Transcurrido este tiempo, la proteína de interés queda pegada al gel por lo que, tras dejar reposar la mezcla para que se deposite el gel, se eliminó el sobrenadante y se lavó el gel con el mismo tampón fosfato mediante una filtración a vacío con un embudo de vidrio sinterizado midiendo la absorbancia del filtrado en un espectrofotómetro LLG-uniSPEC2 (LLG® Labware) a 280 nm hasta que fue inferior a 0,02. Seguidamente, el gel se colocó en una columna de 25x3 cm y las proteínas retenidas fueron eluidas con el mismo tampón fosfato, pero con una concentración de NaCl 1M. Con la ayuda de una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech) la elución se realizó con un flujo de 0,3 mL/min y las fracciones fueron recogidas en un colector (Pharmacia Biotech) con un volumen de 2 mL (Figura 8). Por último, se

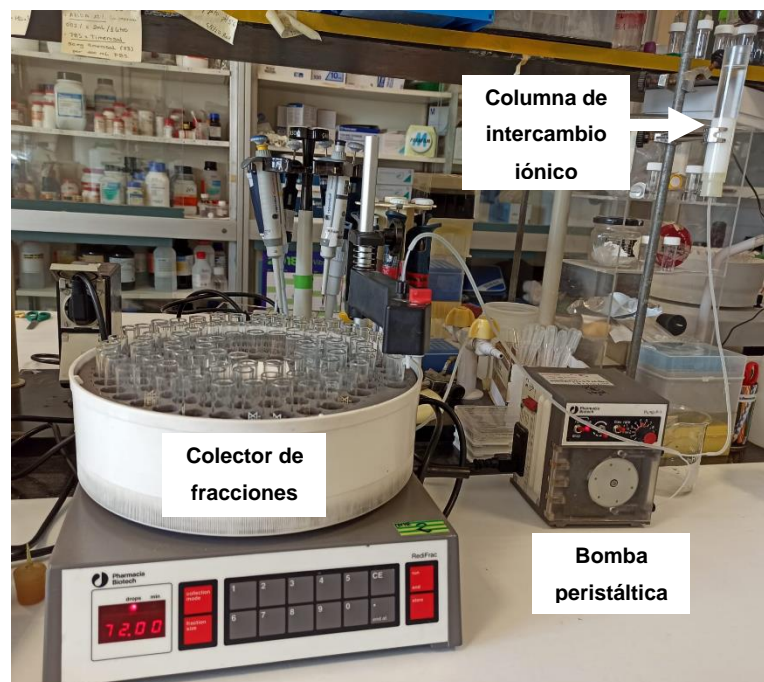


Figura 8: Distribución de los elementos necesarios para la cromatografía de intercambio iónico. La base de la columna se encuentra conectada a la bomba peristáltica y, ésta, al colector de fracciones.

midió la absorbancia de las fracciones eluidas para seleccionar aquellas con una mayor concentración de proteína ($Abs \geq 0,1$).

4.3.2. Ultrafiltración

Las fracciones seleccionadas se mezclaron para obtener un volumen final más grande que se enriqueció en la proteína LTP tras 2 procesos consecutivos de ultrafiltración. La primera etapa de ultrafiltración se llevó a cabo en una cubeta con agitación para bioseparaciones (Amicon™), con una membrana con un punto de corte de 30 kDa, conectada a una bombona de nitrógeno seco para crear la presión suficiente para hacer pasar la solución y, con ella, nuestra proteína de 9 kDa. Finalmente, el excluido de la etapa anterior se hizo pasar por el mismo dispositivo, pero esta vez, haciendo uso de una membrana con un punto de corte de 3 kDa, por lo que, en este caso, la proteína se concentra al quedarse retenida en la membrana.

4.3.3. SDS-Electroforesis

Se realizó una electroforesis con dodecil sulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras, siguiendo procedimientos descritos previamente [43], para comprobar la pureza de la proteína. Se diluyeron las muestras de 1-2 mg/mL con tampón Laemmli (tampón Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, que contenía 2 % SDS, 25 % glicerol y 0,01 % azul de bromofenol) en proporción 1/1 (v/v) y, para obtener una concentración final de 5%, se añadió β -mercaptoetanol. La mezcla se mantuvo en un baño a 100°C durante 5 min. Siguiendo las instrucciones del fabricante la electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida (8-25%) utilizando un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories).

Las cubetas del equipo de electroforesis se llenaron con tampón Tris 0,025 M, glicina 1,92 M, pH 8,3 que contenía 1 % SDS y, en el gel, cada pocillo se cargó con 10 μ L de la muestra correspondiente, aplicando en el primer carril un patrón de pesos moleculares entre 10 y 180 kDa. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 180 V y se mantuvo hasta que el frente llegó al final del gel. Al finalizar la electroforesis, las bandas se tiñeron con Azul de Coomassie R (0,65 g de Azul de Coomassie R, 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua destilada) durante 1h con agitación. Los geles se dejaron incubar en la solución de colorante hasta que las zonas del gel que no contenían proteínas se viesen incoloras.

4.4. Cultivos celulares

4.4.1. Condiciones de esterilidad

Durante el establecimiento de los cultivos celulares y los ensayos existe la posibilidad de contaminación de las células humanas por parte de bacterias, levaduras o micoplasmas, por lo que se usan técnicas de trabajo que garantizan la máxima asepsia. Algunos ejemplos de estas técnicas son: el uso de material completamente estéril (puntas de micropipeta, pipetas de vidrio graduadas...), la manipulación de los cultivos celulares en una cabina de flujo laminar vertical en la que el aire es filtrado a través de un filtro de 0,2 μm o la limpieza de la superficie de trabajo con alcohol al 70% tanto antes como después de haberla ocupado, así como del material que se introduce en la campana de flujo laminar.

4.4.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica

La población de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) de los sujetos de estudio contiene los linfocitos T CD4⁺ de interés para los ensayos. Por lo que habrá que llevar a cabo su aislamiento mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque® [44], un reactivo formado por una mezcla de polisacáridos y que posee una densidad de 1,078 g/mL, lo que permite separar las distintas poblaciones celulares para estudios *in vitro*.

Trabajando siempre en condiciones de asepsia, se prepara en tubos de fondo cónico de 50 mL el volumen indicado de Ficoll-Paque® para, a continuación, verter cuidadosamente sobre él (con el objetivo de evitar que se mezclen las dos fases) un volumen equivalente (proporción 1:1) de las muestras sanguíneas. Seguidamente, se colocaron los tubos en la centrifuga (Allegra® X-15R, Beckman Coulter) para su centrifugación durante 15 min a 1500 rpm sin freno. Al terminar el proceso de centrifugación se puede observar en los tubos la formación de varias capas (Figura 9): en la capa inferior se observa un sedimento rojizo, formado sobre todo por granulocitos y eritrocitos, con una mayor densidad que el Ficoll que se encuentra en la capa contigua y se observa como un líquido traslucido, a continuación se ve un fino anillo de color blanquecino en el que se encuentra la población de PBMCs y, sobre éste, una fase acuosa que contiene las plaquetas y el plasma.

Con ayuda de una pipeta se extrae la capa formada por el anillo de PBMCs teniendo cuidado de llevarse la menor cantidad posible de las capas vecinas. El material recogido se deposita en otro tubo de fondo cónico de menor volumen para

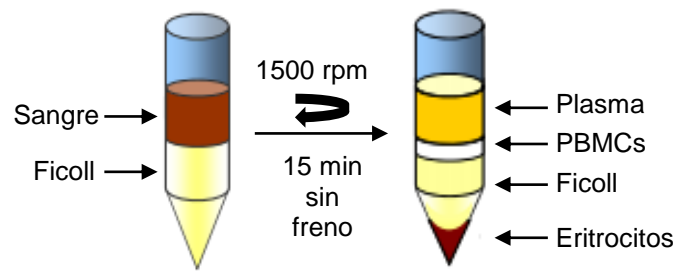


Figura 9: Gradiente de densidad formado por la centrifugación con Ficoll. Tras la centrifugación se observa la formación de varios estratos constituidos por diferentes tipos celulares.

proceder a su lavado añadiendo 10-15 mL de tampón fosfato alcalino (PBS: NaCl 150 mM; $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 8 mM; K_2PO_4 1,6 mM; pH 7,4) y a una nueva centrifugación a 1500 rpm durante 5 min, pero en este caso con el freno puesto. Con este lavado se consigue eliminar los posibles restos de Ficoll y eritrocitos que pueden haberse extraído por error. Tras el lavado se elimina el volumen de PBS y se resuspende la población celular obtenida en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Sigma) al 10% (v/v), GlutaMAX™ (L-alanil-L-glutamina: 2mM, NaCl: $8,3 \times 10^{-3}\%$ (v/v), Gibco) y antibióticos (penicilina: 10000 U/ml y estreptomycin: 10 mg/ml) (Pan Biotech), que se denominará como medio RPMI completo. Finalmente, se determina la densidad y viabilidad celular de la población para ensayos posteriores.

4.4.3. Mantenimiento del cultivo celular

Previamente al establecimiento de los cultivos, hay que llevar a cabo las diluciones necesarias para cultivar la población de PBMCs con una densidad de 10^5 células/mL, además de apartar una alícuota para realizar el inmunofenotipado de linfocitos T y B. Los cultivos se establecieron con medio RPMI completo en placas estériles de 96 pocillos de fondo redondo, suministradas por

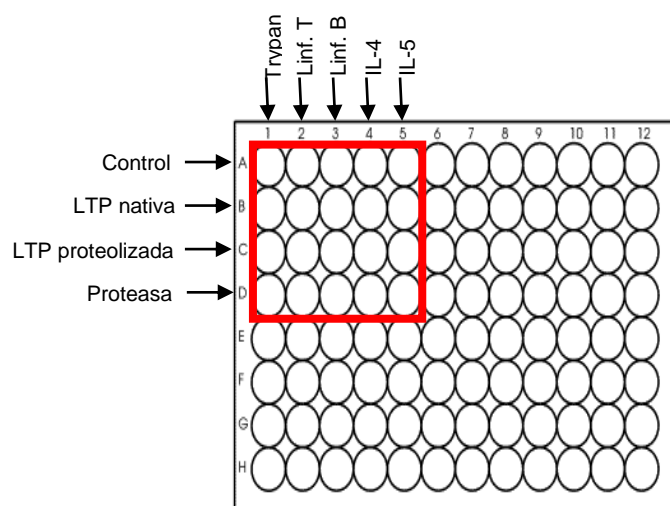


Figura 10: Distribución de los pocillos por paciente para los diferentes estudios (Trypan: conteo con azul Trypan, Linf. T: inmunofenotipado de linfocitos T por citometría de flujo, Linf. B: inmunofenotipado de linfocitos B por citometría de flujo, IL-4: detección de IL-4 mediante ensayo ELISA, IL-5: detección de IL-5 mediante ensayo ELISA) con las correspondientes proteínas.

la casa TPP®, y se dejaron crecer en presencia o ausencia de las diferentes proteínas (Figura 10) durante 4 y 6 días (una placa por día). En los casos necesarios la cantidad de proteína que se añadió fue de 2 µg [45], adecuando el volumen necesario en cada caso: ambas disoluciones de LTP, nativa y proteolizada, y la disolución de proteasa poseen una concentración de 10 µM, por lo que el volumen añadido en los 3 casos fue de 2 µL. Una vez establecidos, los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado a una temperatura constante de 37°C y un aporte fijo de 5% de CO₂ para conservar el pH.

4.4.4. Contaje y determinación de la densidad y viabilidad celular

Para determinar la densidad y viabilidad celular se lleva a cabo una tinción con azul Trypan (Sigma), un colorante derivado de la toluidina que permite diferenciar células vivas de células muertas, ya que, es capaz de atravesar las membranas plasmáticas que han perdido su integridad en las células muertas confiriéndoles un característico color azul que podrá observarse en un hemocitómetro o cámara de Neubauer bajo el microscopio, mientras que las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no incorporan el colorante y, por lo tanto, no se tiñen.

Aunque en principio se realiza una dilución 1/2 de la suspensión celular mezclando 50 µL de ésta con 50 µL de la solución de azul Trypan (al 0,4% de NaCl 0,15 M) en un tubo Eppendorf, también se puede hacer uso de otras diluciones cuando, por ejemplo, la suspensión celular se encuentra muy concentrada, siempre y cuando se considere el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales. Una pequeña alícuota de esta mezcla se coloca por capilaridad entre la cámara de Neubauer y un cubreobjetos para realizar el contaje en un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i). Este procedimiento se realizó a día 0, 4 y 6 de cultivo. La densidad celular se determinó empleando la fórmula siguiente:

$$\text{Densidad celular} \left(\frac{\text{cél}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo 10⁴ el factor de corrección del volumen de la cámara.

Por su parte, la viabilidad celular fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \cdot 100$$

Siendo N° de células totales = N° de células vivas + N° de células muertas.

4.5. Citometría de flujo

Para el estudio diferencial de las subpoblaciones de linfocitos se necesitan técnicas de alta sensibilidad y especificidad como es la citometría de flujo. En este caso las poblaciones que se llevarán a estudio serán, la de linfocitos T por un lado y, linfocitos B por otro. Para ello se requiere el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen ciertos marcadores de superficie denominados “cluster of differentiation” (CD). En última instancia, los datos obtenidos por el citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences) se recogerán con el software CellQuestpro.

4.5.1. Inmunofenotipado para el estudio de la evolución de la población de linfocitos T

Todos los linfocitos T expresan la molécula CD3 en su superficie asociada al receptor antigénico de las células T (TCR). Los linfocitos T pueden diferenciarse en cooperadores o citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores se caracterizan por expresar una proteína de superficie denominada CD4, es decir, son células $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$. Por su parte los linfocitos T citotóxicos expresan otra proteína conocida como CD8, es decir, en este caso hablamos de células $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ o, como se categorizan en este trabajo, $\text{CD3}^+\text{CD4}^-$. En este trabajo, el objeto de estudio principal es el análisis del comportamiento de los linfocitos T CD4^+ y para ello observaremos su evolución en los días 0, 4 y 6 de cultivo.

En primer lugar, el contenido de los pocillos correspondientes de la placa de cultivo se trasvasa a una placa de fondo plano para llevar a cabo su centrifugación durante 5 min a 1500 rpm. Al finalizar la centrifugación este volumen se desecha para añadir μL de PBS con 5% de SFB. En este volumen se marcaron las células con anticuerpos conjugados a diferentes fluoróforos: uno de ellos anti-CD3 conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (CD3-FITC, Miltenyi, $\lambda_{abs} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$) y el otro anti-CD4 conjugado con aloficocianina (CD4-APC, Miltenyi, $\lambda_{abs} = 662 \text{ nm}$,

$\lambda_{em} = 660$ nm) y, ocasionalmente en su lugar, anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (CD4-PE, Caltag Laboratories, $\lambda_{abs} = 480-565$ nm, $\lambda_{em} = 578$ nm), que se detectan con el citómetro de flujo en los canales de fluorescencia FL1, FL4 y FL2 respectivamente. El marcaje se dejó durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, se volvió a centrifugar la placa 3 min a 1500 rpm y, de nuevo, se desechó el volumen contenido en los pocillos para resuspender las células en 300 μ L de PBS. La suspensión se trasvasó a tubos de citómetro para evaluar las distintas poblaciones:

- CD3⁻CD4⁻: células NK, linfocitos B, monocitos...
- CD3⁺CD4⁻: linfocitos T citotóxicos.
- CD3⁺CD4⁺: linfocitos T cooperadores.

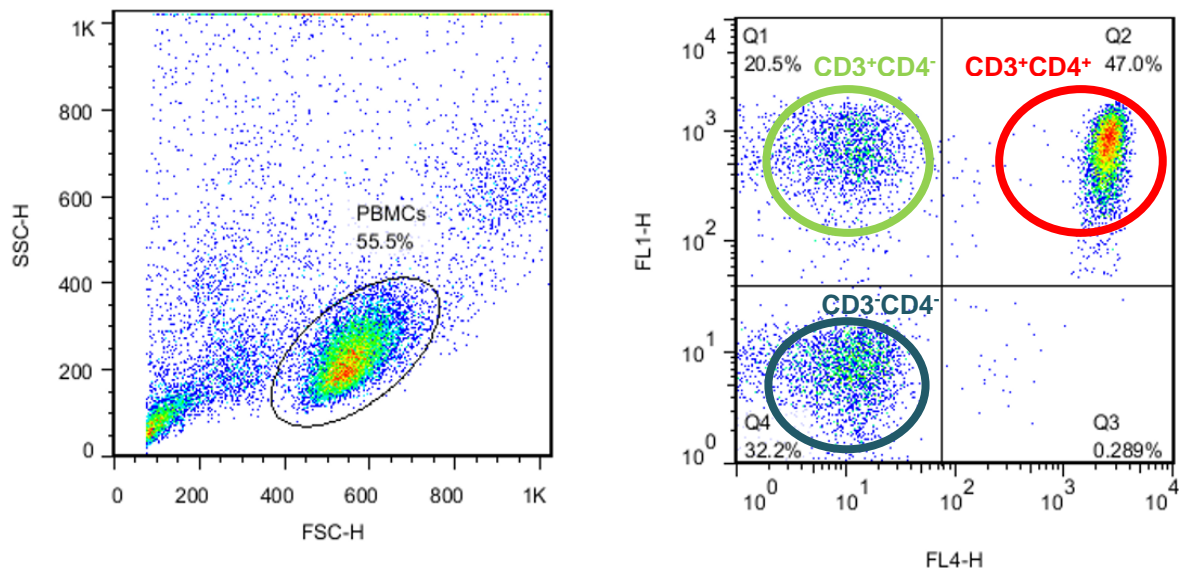


Figura 11: Gráficas explicativas del análisis de las poblaciones de PBMCs obtenidas con el programa FlowJow. A la derecha se observa acotada la población de PBMCs. A la izquierda se muestran las diferentes subpoblaciones de PBMCs que se han marcado según las proteínas de superficie que poseen.

4.5.2. Inmunofenotipado para el estudio de la evolución de la población de linfocitos B

En cuanto a los linfocitos B se identifican mediante la caracterización CD3⁻CD19⁺. Esto se debe a que los linfocitos B no expresan la molécula CD3, pero sí el antígeno CD19, que se trata de una glicoproteína de membrana implicada en la transducción de señales que regula el desarrollo, la activación y la diferenciación de estos linfocitos. La molécula se expresa en la mayoría de líneas de linfocitos B estabilizados y,

también, en los prolifocitos B, pero no se encuentra presente en linfocitos T, células NK, monocitos o granulocitos. Característica que nos permitirá observar la evolución de las poblaciones de linfocitos T y B por separado a días 0, 4 y 6 de cultivo.

El procedimiento para el marcaje es el mismo que en el apartado anterior. El contenido de los pocillos correspondientes a este estudio se trasvasa a otra placa para centrifugarla 3 min a 1500 rpm. A continuación, se desecha el volumen y se añaden 100 μ L de PBS con 5% de SFB. En este punto, para el marcaje se utilizarán anticuerpos conjugados con los fluoróforos: anti-CD3 conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (CD3-FITC, Miltenyi, $\lambda_{abs} = 494$ nm, $\lambda_{em} = 518$ nm) y el otro anti-CD19 conjugado con alofococianina (CD19-APC, Sysmex, $\lambda_{abs} = 662$ nm, $\lambda_{em} = 660$ nm). Estos anticuerpos serán detectados en los canales FL1 y FL4 del citómetro de flujo. Igualmente, el marcaje se dejó 30 min a 4°C y, seguidamente, se centrifugó la placa 3 min a 1500 rpm. Tras la centrifugación, se volvió a desechar el volumen de los pocillos y se resuspendieron las células en 300 μ L de PBS para pasar dicho volumen a tubos de citómetro y proceder al análisis de las poblaciones.

- CD3⁻CD19⁻: células NK, monocitos, granulocitos...
- CD3⁺CD19⁻: linfocitos T.
- CD3⁻CD19⁺: linfocitos B.

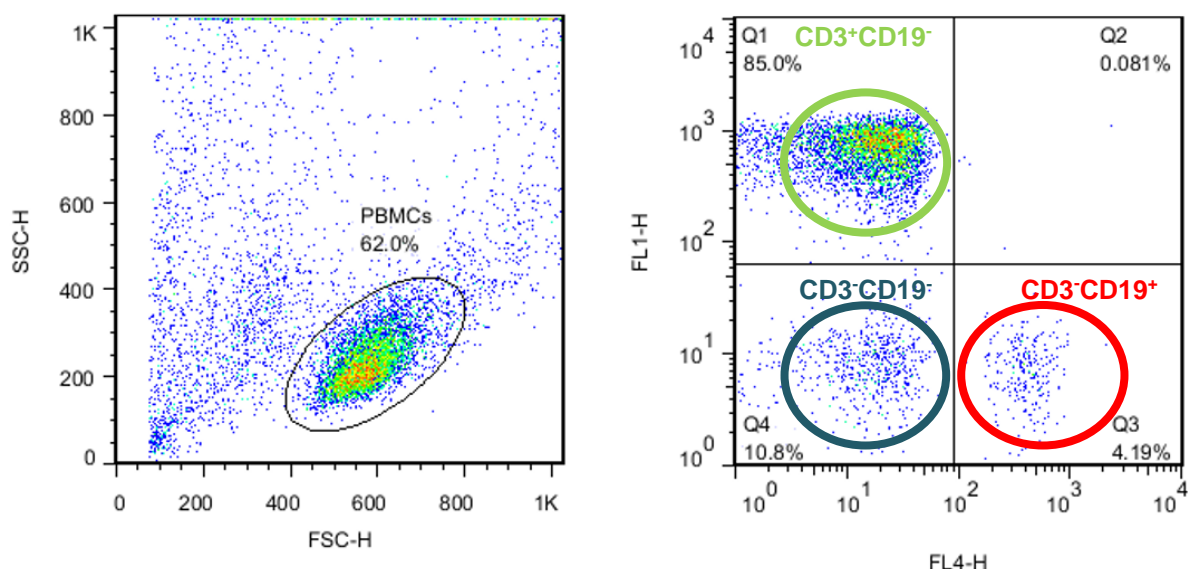


Figura 12: Gráficas obtenidas con el programa de análisis FlowJow para la visualización de las diferentes poblaciones de PBMCs. En la gráfica derecha se observa acotada la población de PBMCs que se estudia en la gráfica izquierda. En esta última se encuentran diferenciadas cada una de las subpoblaciones de PBMCs.

4.6. Ensayo ELISA para la cuantificación de interleucinas 4 y 5

4.6.1. Reactivos, tampones y soluciones estándar

Tampón de recubrimiento o “Coating Buffer”. Se mezclaron 8,4 g de NaHCO₃ y 3,56 g de Na₂CO₃ en 1 L de agua desionizada con agitación hasta su completa disolución. A continuación, adicionando NaOH 1M se llevó el pH hasta un valor de 9,5 con ayuda de un pH-metro. Por último, la disolución se llevó a autoclavar para su esterilización.

Diluyente de ensayo o “Assay diluent”. Se preparó una disolución de PBS con un 10% de SFB. Para ello, se mezclaron 225 mL de PBS con 25 mL de SFB en condiciones de esterilidad.

Tampón de lavado o “Wash Buffer”. Se mezclaron, en condiciones de esterilidad, 250 mL de PBS con 125 µL de Tween-20 (Panreac) para obtener PBS al 0,05% de Tween.

Estas disoluciones se guardaron a 4°C hasta su uso junto con los reactivos necesarios para el ensayo que se prepararon según las indicaciones descritas en el protocolo (Tabla 4) del set comercial ELISA MAXTM (BioLegend®).

Tabla 4: Preparación de anticuerpos y Avidina-HRP descrito en el protocolo del set comercial ELISA MAXTM

Reactivo	Diluir con	Dilución
Anticuerpo de captura (200X)	“Coating Buffer”	60 µL en 12 mL de buffer
Anticuerpo de detección (200X)	“Assay Diluent”	60 µL en 12 mL de buffer
Avidina-HRP (1000X)	“Assay Diluent”	12 µL en 12 mL de buffer

Solución estándar de IL-4/IL-5 humana. Para la solución estándar de IL-4 se añadieron 0,2 mL de “Assay diluent” al estándar liofilizado (19 ng) incluido en el set obteniendo una disolución stock de 95 ng/mL. En cuanto al estándar de IL-5 el volumen añadido fue el mismo, pero se obtuvo una disolución final de 80 ng/mL. Ambas soluciones stock se almacenaron en tubos Eppendorf a -80°C hasta su uso.

Solución de sustrato TMB (BioLegend). El volumen final depende del número total de pocillos teniendo en cuenta que se añadirán 100 µL de la mezcla final por pocillo, pero se deben mezclar TMB Substrate A y TMB Substrate B en proporción 1:1 en el instante previo a su uso.

4.6.2. Elaboración de la recta patrón

Para poder conocer la concentración de las interleucinas secretadas al medio por las células en cultivo se elaboró una recta patrón (siempre por duplicado) a partir de las soluciones estándar de interleucina detalladas en el apartado anterior.

Se preparó 1 mL de solución estándar de IL-4 a una concentración de 250 pg/mL añadiendo 2,6 μ L del estándar reconstituido a 997,4 μ L de "Assay diluent". Para la solución estándar de IL-5 se añadieron 3,1 μ L del estándar reconstituido a 996,9 μ L de "Assay diluent", obteniendo igualmente 1 mL de una solución a 250 pg/mL. Los pocillos reservados para la elaboración de la recta patrón siguieron el mismo tratamiento que los pocillos que contendrán las muestras (explicado más adelante). Sin embargo, en lugar de adicionar las muestras, en el primer pocillo se añadieron 200 μ L de las disoluciones estándar a 250 pg/mL y en los 7 siguientes 100 μ L de "Assay diluent", el siguiente paso fue realizar 6 diluciones seriadas de $\frac{1}{2}$ tomando 100 μ L del pocillo anterior. Al llegar al séptimo pocillo se desecharon los 100 μ L dejando el octavo pocillo con 100 μ L de "Assay diluent" que servirán como blanco (0 pg/mL).

4.6.3. Protocolo del set comercial ELISA MAX™

El procedimiento completo se llevó a cabo tanto a día 4 como a día 6.

Se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución de anticuerpo de captura a una Microplaca ELISA de 96 pocillos de fondo plano de la marca Greiner Bio-One que se cubrió con parafilm para dejarlo incubando toda la noche a 4°C.

Posteriormente, la placa se lavó 4 veces con 300 μ L de "Wash buffer" y se procedió al bloqueo de la placa añadiendo 200 μ L de "Assay diluent" por pocillo. Este paso es importante y necesario ya que la proteína contenida en el tampón ocupará los espacios que no han sido cubiertos por el anticuerpo de captura y evitará uniones inespecíficas a la placa del analito en estudio o de los anticuerpos que se añaden posteriormente. De nuevo se cubrió la placa con parafilm y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 h en un agitador de placas a 500 rpm aproximadamente. Todas las incubaciones que siguieron con necesidad de agitación se hicieron en estas mismas condiciones. Antes de que finalizara el tiempo de incubación, se tomó el sobrenadante de las placas de cultivo y se llevó a otra placa para su centrifugación durante 2 min a 3500 rpm. Una vez transcurrido el período de

incubación se lavó la placa con 300 μL de “Wash buffer” y se añadieron 100 μL de las muestras en los pocillos correspondientes, así como diluciones seriadas de la recta patrón. Se tapó la placa con parafilm y se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente con agitación.

Se volvió a lavar la placa como en los casos anteriores, luego se añadieron 100 μL por pocillo de la solución del anticuerpo de detección, se cubrió la placa con parafilm y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Se lavó la placa de nuevo siempre en las mismas condiciones y se añadieron en este caso 100 μL de Avidina-HRP por pocillo. Tras cubrir la placa, se dejó incubando 30 min a temperatura ambiente con agitación.

Esta vez, la placa se lavó 5 veces dejando el “Wash buffer” entre 30 segundos y 1 min de tiempo por lavado. Seguidamente, se añadieron 100 μL por pocillo de solución de sustrato TMB. Sin necesidad de cubrir la placa, ésta se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente en oscuridad y sin agitación. Para terminar, sobre el volumen contenido en la placa se adicionaron 100 μL por pocillo de Solución de parada o “Stop solution” (BioLegend) y se procedió a la lectura de la placa antes de que transcurrieran 15 min. Se midió la absorbancia del contenido de los pocillos a 450 y 550 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan[®] Ex, Thermo Scientific). A la hora de interpretar los resultados la absorbancia a 550 nm se restará a la absorbancia a 450 nm.

4.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los diferentes ensayos se llevó a cabo haciendo uso del programa GraphPad Prism 6. Las determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los conjuntos de datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Aquellas diferencias con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas. Aunque, también, se consideraron los valores de $p < 0,01$ y $p < 0,001$ siendo que, cuanto menor sea el valor de significación mayor será la evidencia de que el hecho no ocurre por azar.

5. Resultados y discusión

5.1. Purificación de la proteína LTP de manzana (Mal d 3)

La extracción de las proteínas de la piel de una mezcla de 4 variedades diferentes de manzana (Granny Smith, Golden Delicious, Red Story y Verde Doncella) se llevó a cabo haciendo uso de diferentes reactivos. Los reactivos DIECA y EDTA se usaron por su capacidad para quelar metales necesarios para la actividad de algunas enzimas como las oxidasas. El PVPP inhibe reacciones de pardeamiento por la polifeniloxidasas interaccionando con sus compuestos fenólicos. Mientras que la azida de sodio se usó como conservante en los tampones debido a que actúa como inhibidor del crecimiento microbiano.

Para la purificación de la proteína Mal d 3, se realizó una cromatografía de intercambio iónico con un gel de SP-Sepharose. Este gel se encuentra cargado negativamente, por lo que, al hacer pasar el extracto a través de él, nuestra proteína se quedará pegado a él debido a que posee carga positiva. A continuación, se eluyó con un tampón con NaCl 1M para romper las interacciones y poder recuperar la proteína en varias fracciones de 2 mL. Durante este proceso se midió la absorbancia de cada una de las fracciones y se obtuvo la curva que se observa en la Figura 13A, con un pico que indica cuáles son las fracciones que contenían Mal d 3. Se seleccionaron estas fracciones y se mezclaron para ser sometidas a un proceso de ultrafiltración que dio lugar a la concentración de la proteína Mal d 3 con un grado de pureza mayor del 95%. Además, gracias a este proceso de ultrafiltración se consiguió disminuir la concentración de sal de la muestra, que podría interferir en procesos posteriores.

Por último, para verificar la correcta purificación de nuestra proteína se realizó una SDS-Electroforesis en condiciones reductoras utilizando geles con un gradiente de acrilamida de 8-25%, en el cual se cargaron el extracto final y las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación (Figura 13B). En los carriles 2 y 3 se observan el perfil del extracto de piel de manzana y la mezcla de las fracciones eluidas en la cromatografía que formaban el pico de absorbancia, respectivamente. Ambos tienen una intensidad débil, pero permiten ver varias bandas de diversos pesos

moleculares, en el caso del extracto, y la banda de Mal d 3 con algunas bandas a 40 y 70 kDa (debido a que fueron retenidas en el gel), en el caso de las fracciones eluidas. En los carriles 4 y 5 se cargaron el retenido y el permeado de la primera etapa de ultrafiltración y se observaron concentradas aquellas proteínas mayores o menores al punto de corte (30 kDa), respectivamente, siendo Mal d 3 la proteína mayoritaria en el permeado.

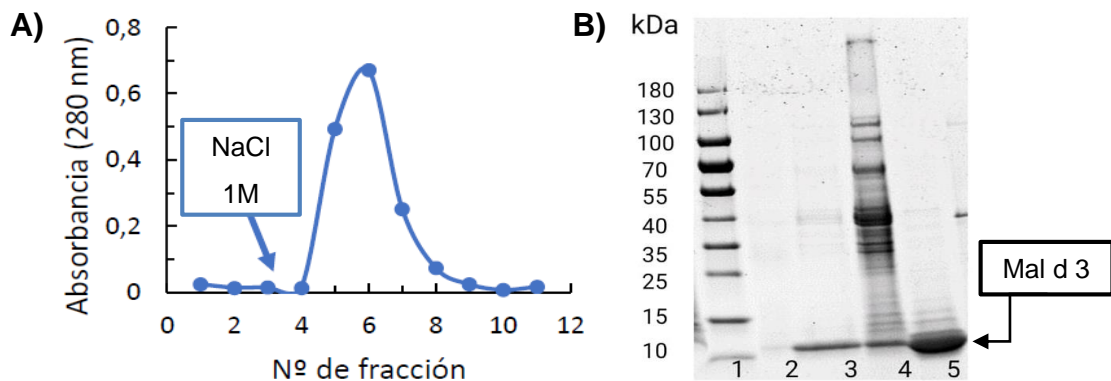


Figura 13: A) Perfil de elución de la cromatografía en SP-Sepharose del extracto de piel de manzana con tampón con NaCl 1M, cuya aplicación se encuentra indicada con una flecha. B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% donde en los carriles se observa: (1) Patrón de pesos moleculares (2) Extracto de manzana (3) Mezcla de las fracciones del pico eluido en la cromatografía (4) Retenido y (5) permeado del proceso de ultrafiltración con la membrana de punto de corte de 30 kDa. Imagen cedida por el grupo ALIPAT.

5.2. Efectos de Mal d 3 sobre PBMCs de sujetos alérgicos

5.2.1. Evolución del porcentaje y el número total de linfocitos T CD4⁺

Tras aislar la población de PBMCs de la sangre de los pacientes alérgicos y los donantes sanos, ésta se puso en cultivo sometida a diferentes condiciones para observar su comportamiento y evolución tras 4 y 6 días de incubación. Las condiciones fueron, por un lado, no exponer a las células a ningún tipo de tratamiento y, por otro, sembrarlas en presencia de las diferentes proteínas: LTP de manzana nativa, LTP de manzana proteolizada o de la proteasa ácida utilizada para proteolizar la LTP de manzana. A días 0, 4 y 6 de cultivo, el crecimiento celular total se calculó tras realizar el conteo con azul Trypan, mientras que la evolución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T se determinó por citometría de flujo. Por lo que, integrando ambos conjuntos de datos podremos conocer en última instancia el número de linfocitos T CD4⁺ en cada uno de los casos. Los datos mostrados en las gráficas corresponden a la media de 15 pacientes alérgicos a la proteína LTP de manzana y de 10 donantes sanos.

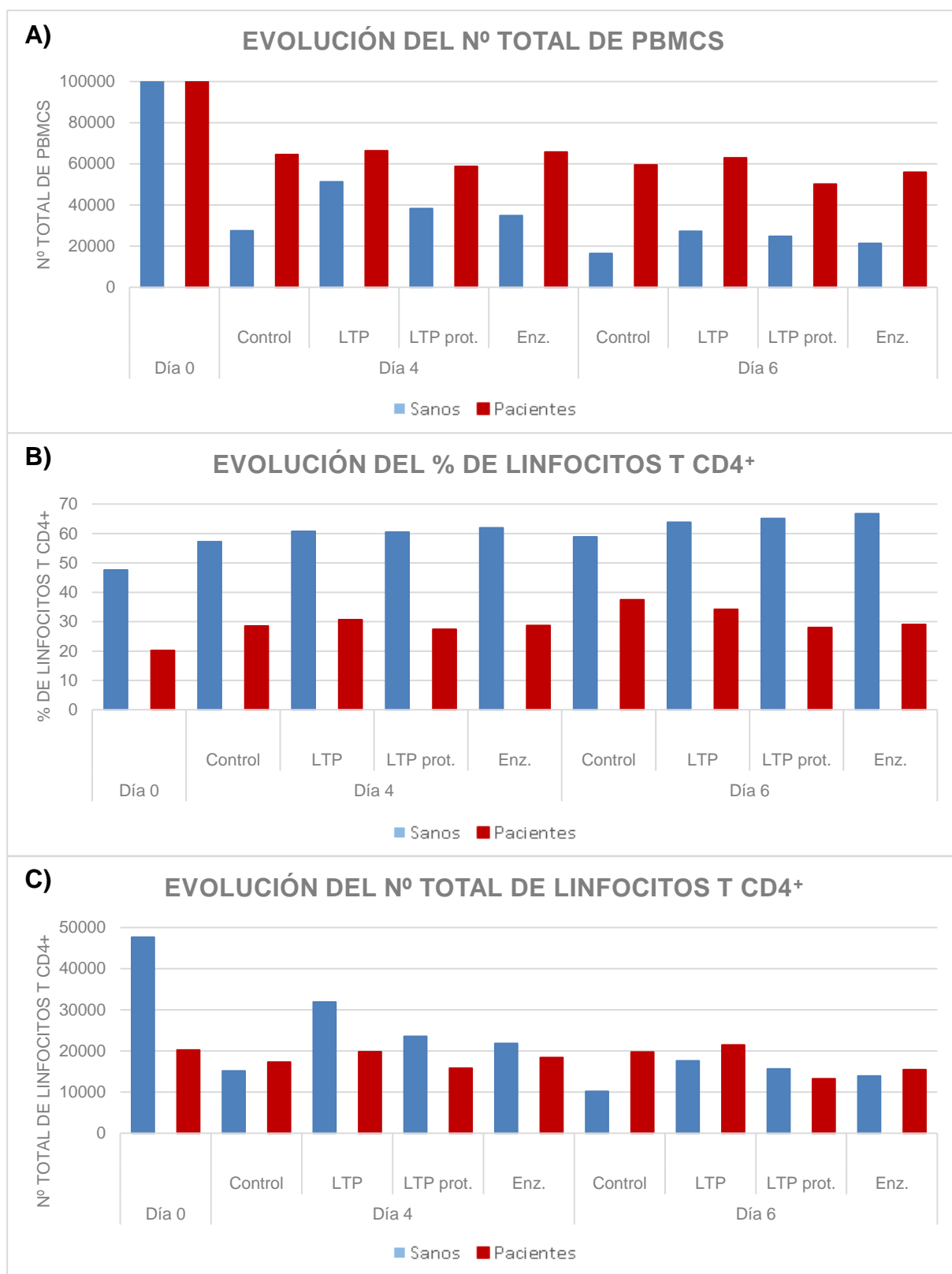


Figura 14: A) Evolución del número total de PBMCs determinado por conteo de células negativas para el marcaje con azul Trypan. B) Porcentaje de la población de linfocitos T CD4⁺ respecto al número total de PBMCs determinado por citometría de flujo en función del tiempo en cultivo. C) Evolución del número de linfocitos T CD4⁺ calculado a partir del número total de células y del porcentaje que representan las células CD4⁺ en la población de PBMCs. Las condiciones de cultivo se indican como: control (sin ningún tratamiento), LTP (en presencia de la LTP nativa), LTP prot. (en presencia de la LTP proteolizada) y Enz. (en presencia de la proteasa). En azul se observan las medias obtenidas de los datos de 10 donantes sanos, mientras que en rojo se ven las medias de los datos recogidos para 15 pacientes alérgicos.

Según pasaban los días de cultivo se pudo observar, tanto en pacientes como en donantes sanos, que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ aumentaba en todas las situaciones (Figura 14B) a pesar de que el número total de células disminuye con el paso del tiempo (Figura 14A). Esto indica que, aunque una parte de las células se está muriendo debido al estrés del cultivo *in vitro*, los linfocitos T CD4⁺ son más resistentes y sobreviven más que el resto de los tipos celulares, por eso, su porcentaje sobre el total aumenta. Además, este hecho es todavía más notorio en el caso de las células de los pacientes, ya que, si analizamos el número total de linfocitos T CD4⁺, apenas hay muerte en esta subpoblación celular y sobreviven en el cultivo *ex vivo* sin apenas variar en número (Figura 14C). Esto podría ser indicativo de una mayor capacidad intrínseca de supervivencia por parte de este tipo celular, lo cual también se observó en nuestro estudio previo [42].

Por otro lado, es muy significativa la diferencia tanto en porcentaje como en número total de células CD4⁺ a nivel basal que existe entre los pacientes y los donantes sanos. Se puede observar un nivel mucho menor en ambos parámetros en el caso de los pacientes (Figura 15). Este fenómeno ya se vio en estudios anteriores con pacientes alérgicos a la gliadina de trigo [42]. Estos datos podrían indicar que este porcentaje menor de linfocitos T CD4⁺, así como su mayor supervivencia, es una característica de los pacientes alérgicos y podría tener valor diagnóstico. El hecho de que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ fuera menor en las PBMCs de los pacientes podría deberse, como ya se ha descrito previamente [46], al aumento en el número y porcentaje de linfocitos B. Por ello, en este trabajo se decidió estudiar la evolución de los linfocitos B en las mismas condiciones que se estudió la población de linfocitos T.

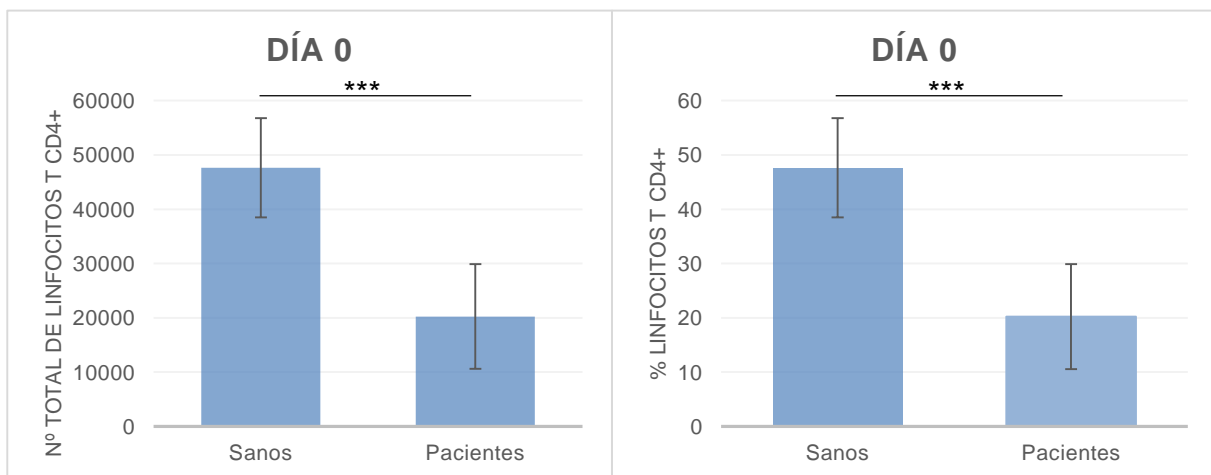


Figura 15: Comparación del porcentaje y el número de linfocitos T CD4⁺ a día 0 entre donantes sanos y pacientes alérgicos. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 15 pacientes y 10 donantes sanos. ***: $p < 0.001$.

Al añadir el alérgeno en estado nativo se observa cierta tendencia a aumentar el número de linfocitos T CD4⁺ tanto en los donantes sanos, como en los pacientes alérgicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el incremento inducido no llega a ser estadísticamente significativo, ya que, la desviación estándar que no se muestra en las gráficas es elevada (superior al 20% de la media).

5.2.2. Evolución del porcentaje y el número total de linfocitos B

Para llevar a cabo el estudio de la evolución de los linfocitos B, las condiciones de cultivo, el procedimiento de los ensayos y el análisis de los datos se realizaron del mismo modo que en el estudio del comportamiento de los linfocitos T CD4⁺. Igualmente, los datos en las gráficas se muestran como la media de 15 pacientes alérgicos y 10 donantes sanos.

A diferencia del comportamiento de los linfocitos T CD4⁺ en las PBMCs de los pacientes, cuyo porcentaje aumentaba sobre el total con el paso del tiempo, los linfocitos B apenas varían su porcentaje en ninguna de las diferentes condiciones (Figura 16A) respecto al día 0 de cultivo. En contraposición, los donantes sanos experimentan una caída mucho mayor del porcentaje de linfocitos B respecto a la medida a día 0. Si además tenemos en cuenta la disminución total del número de PBMCs a lo largo de los días de cultivo (Figura 14A), este hecho se refleja, en ambos casos, en el número total de linfocitos B (Figura 16B). En los donantes sanos se sigue observando una disminución mucho más brusca respecto al día 0, llegando a ser del 93% en el mayor de los casos, mientras que, en los pacientes alérgicos, aunque también se observa un descenso en el número de linfocitos B, éste es mucho menor y, entre los días 4 y 6, apenas existe variación en el número total. Además, en dichos días de cultivo, se puede observar que en los pacientes el número de linfocitos B es mayor que en el caso de los donantes sanos en todas las situaciones, como se ve en el caso de los controles, cuya diferencia es estadísticamente significativa, tanto a día 4 como a día 6 (Figura 17). Este dato vuelve a indicar, como ocurría con los linfocitos T CD4⁺, que los linfocitos B de los pacientes alérgicos tienen una mayor tasa de supervivencia, lo que podría estar relacionado con la presencia de una respuesta humoral activa.

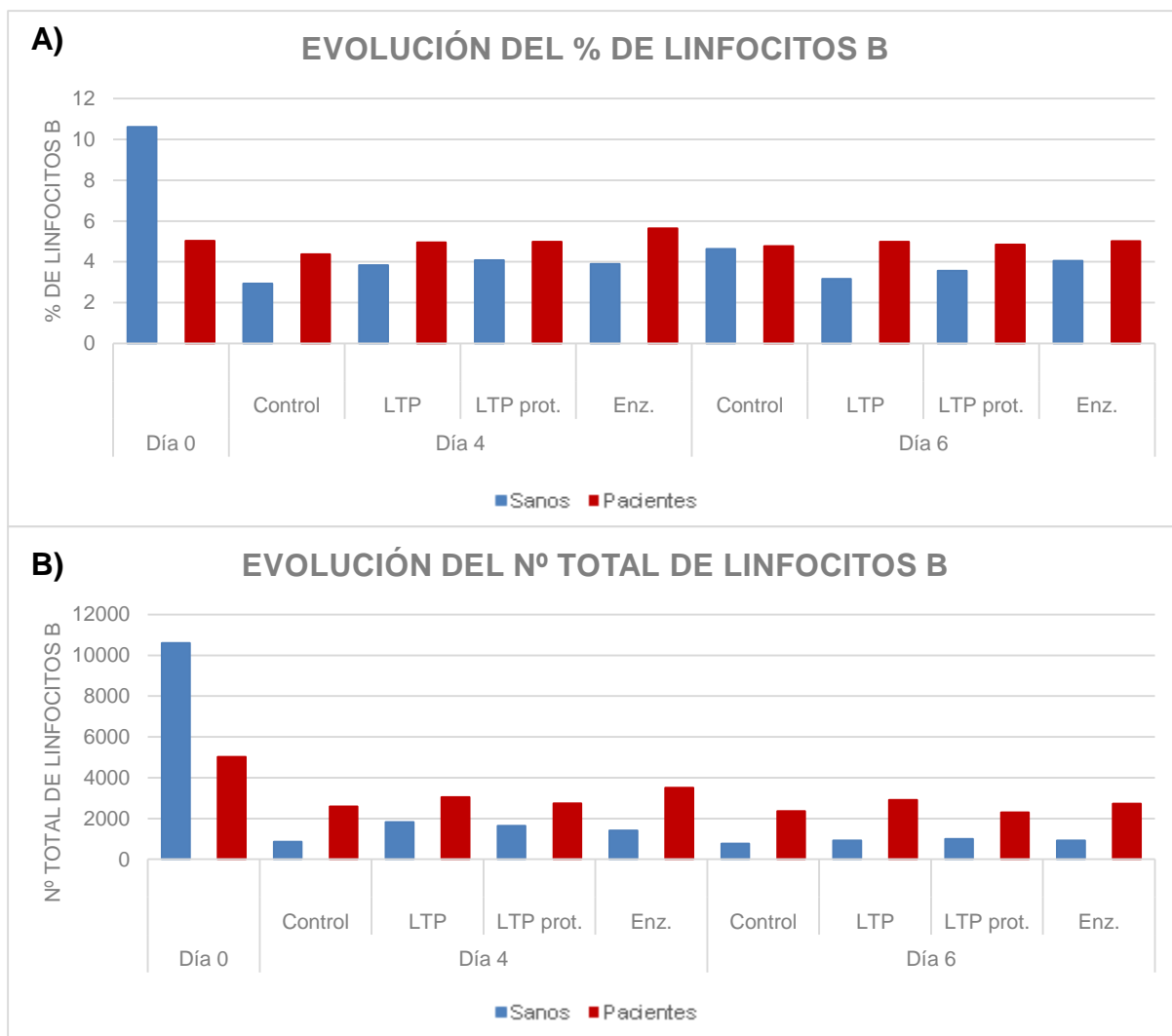


Figura 16: A) Porcentaje de la población de linfocitos B respecto al número total de PBMCs determinado por citometría de flujo en función del tiempo en cultivo. B) Evolución del número total de linfocitos B calculado a partir del número total de células y del porcentaje que representan las células B en la población de PBMCs. Las condiciones de cultivo se indican como: control (sin ningún tratamiento), LTP (en presencia de la LTP nativa), LTP prot. (en presencia de la LTP proteolizada) y Enz. (en presencia de la proteasa). En azul se observan las medias de los datos de 10 donantes sanos y en rojo las medias de los datos recogidos para 15 pacientes alérgicos.

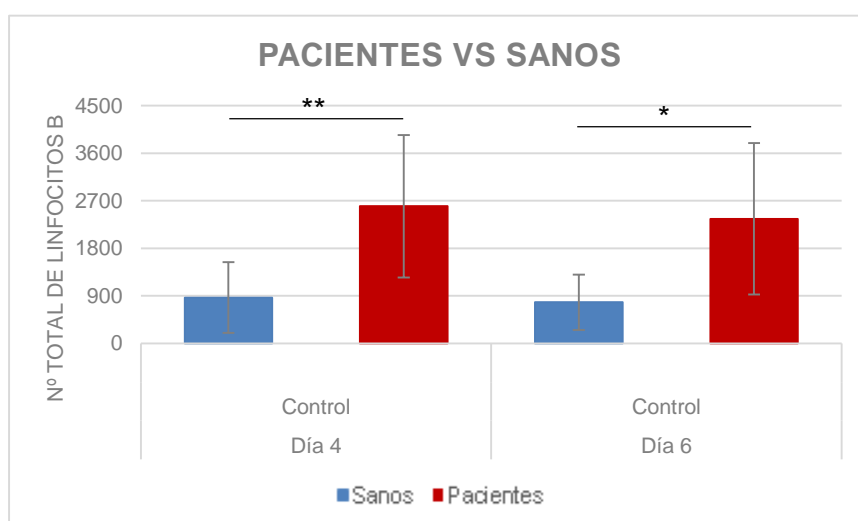


Figura 17: Comparación del número de linfocitos B en controles de pacientes y donantes sanos a días 4 y 6 de cultivo. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 15 pacientes y 10 donantes sanos. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Por otra parte, se vuelve a observar una diferencia bastante significativa a nivel basal entre donantes sanos y pacientes, tanto en porcentaje como en el número total de linfocitos B (Figura 18), siendo ambos parámetros menores en el caso de los pacientes. Esto indica que la disminución observada en el análisis de los linfocitos T CD4⁺ de los pacientes alérgicos, no se encuentra compensada por un aumento en la población de linfocitos B. Por lo tanto, habría que seguir analizando otros grupos celulares dentro de la población de PBMCs.

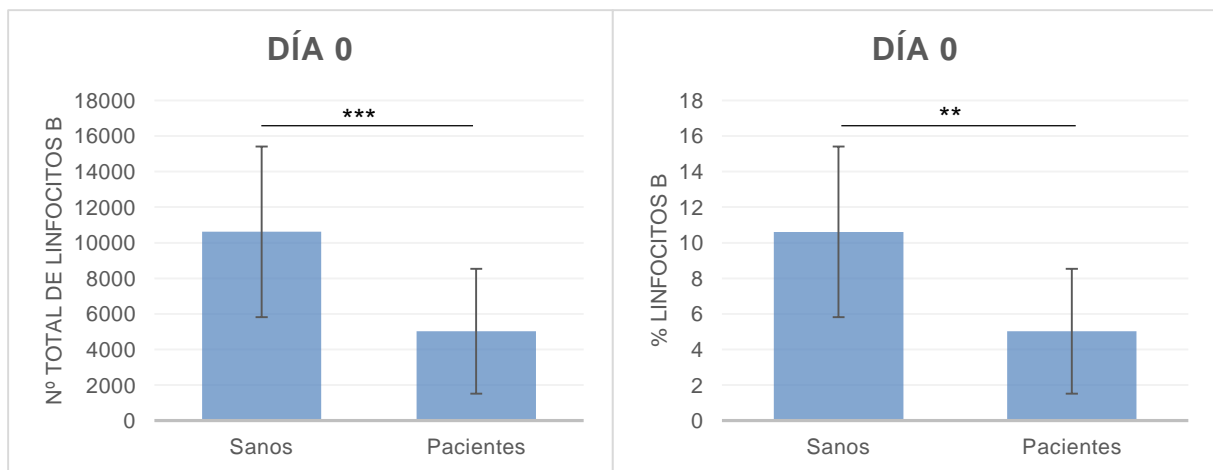


Figura 18: Comparación del porcentaje y el número de linfocitos B a día 0 entre donantes sanos y pacientes alérgicos. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 15 pacientes y 10 donantes sanos. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Por otra parte, no se observa en ningún caso un efecto estimulador del crecimiento de los linfocitos B por parte del alérgeno.

5.3. Cuantificación de la secreción de IL-4 e IL-5

Una vez aislada la población de PBMCs de los sujetos de estudio, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos celulares para determinar la secreción de IL-4 e IL-5. En este caso no se llevó a cabo la medida a día 0, pero sí se cuantificó la secreción de ambas interleucinas a días 4 y 6 mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich. Si existe secreción de alguna de las interleucinas, éstas se encuentran en el sobrenadante y, al realizar el ensayo, quedarán atrapadas entre los anticuerpos primario y secundario pudiendo ser detectadas por una reacción colorimétrica.

5.3.1. Secreción de IL-4

No se detectó producción de IL-4 en los cultivos de PBMCs ni en los pacientes alérgicos ni en los donantes sanos. Esto puede deberse a que la IL-4 es secretada en las primeras etapas de la respuesta alérgica y, a lo hora de realizar las medidas a días 4 y 6, ésta ya se haya agotado y no se encuentre en el sobrenadante de los cultivos.

5.3.2. Secreción de IL-5

Por otra parte, sí que se observaron ciertos efectos importantes sobre la producción de IL-5. Cabe destacar que, mientras los datos de la mayor parte de los pacientes siguieron un patrón más o menos similar, hubo un paciente con un largo historial de alergias alimentarias de cierta gravedad, cuyos resultados fueron diferentes. Es por ello que se han separado sus datos y se han expresado en primer lugar (Figura 19) y, posteriormente, los correspondientes a la media de los otros 8 pacientes (Figura 20).

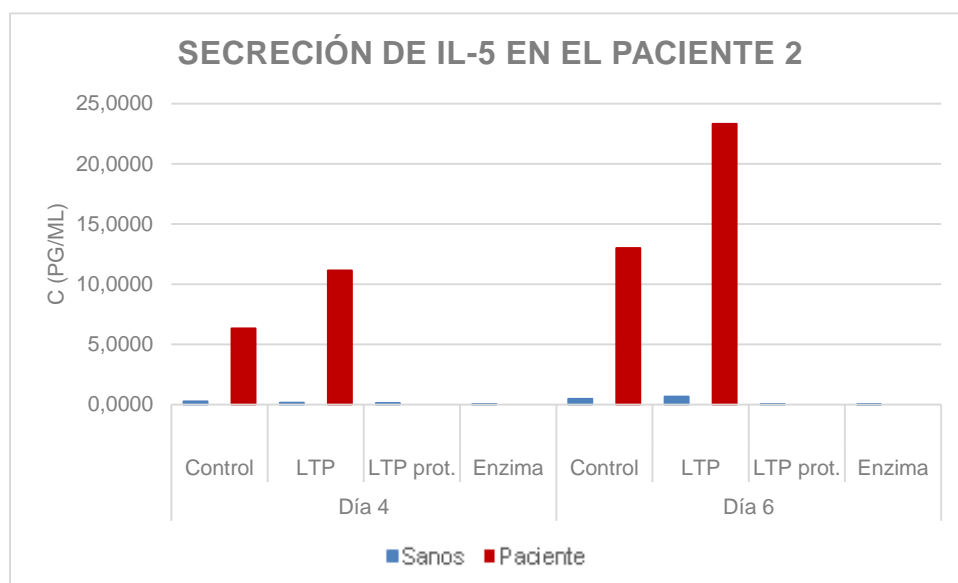


Figura 19: Concentración en pg/mL de IL-5 en el sobrenadante del cultivo celular del paciente 2 a días 4 y 6 en comparación con la media de la producción de 10 donantes sanos.

En los datos del paciente 2 por separado se observa secreción de IL-5 a nivel basal, que aumenta de día 4 a día 6. Además, se observa que la LTP induce un incremento en la producción de IL-5, por encima del nivel basal, tanto a día 4 como a día 6. Esta producción de IL-5 se inhibe por completo en presencia de LTP proteolizada. Estos resultados del paciente 2 concordarían con los obtenidos en nuestro trabajo anterior al analizar la secreción de IL-5 en respuesta a la LTP de melocotón [42].

En la gráfica obtenida con la media del resto de pacientes y de 10 donantes sanos se observa, en primer lugar, que a día 4 se produce una secreción muy elevada de IL-5 a nivel basal (control) por parte de las células de los pacientes, incluso más que al verse expuestas al alérgeno (Figura 20). Esta secreción de IL-5 a nivel basal por parte de las células de los pacientes es estadísticamente significativa si comparamos con la secreción residual observada en las células de los donantes sanos (Figura 21). Esto quizá se podría explicar porque las muestras se tomaron en temporada de alergia y es posible que los pacientes ya se encontraban secretando IL-5 a nivel basal. Esta observación es interesante y podría constituir un dato diagnóstico adicional en este tipo de alergias. La adición de LTP no aumenta este nivel basal, pero se reduce si se añade la LTP proteolizada. Llama la atención que se de esta reducción del nivel basal de IL-5 al añadir la LTP proteolizada, pero lo hace todavía más que el nivel de producción de IL-5 se elimine casi totalmente al añadir la enzima utilizada en la proteólisis.

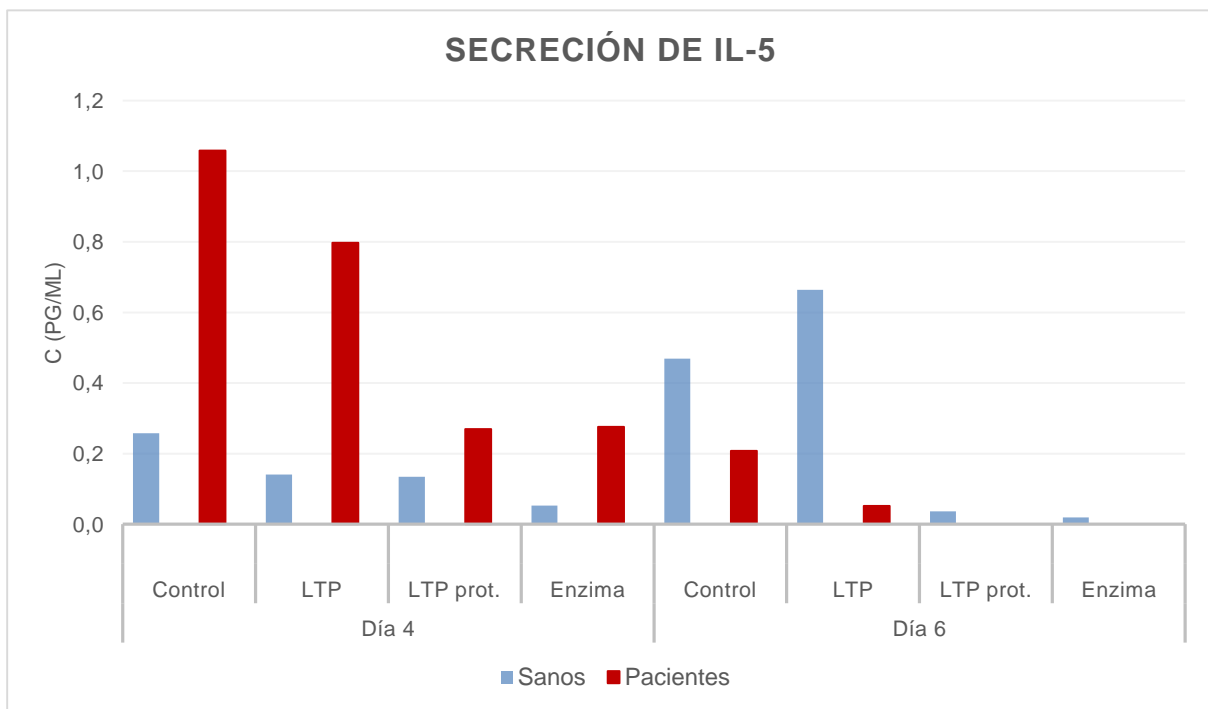


Figura 20: Concentración de la IL-5, a días 4 y 6 de incubación, en el sobrenadante de los cultivos de PBMCs de donantes sanos (barras azules) y de pacientes (barras rojas), expresada en pg/mL. Los resultados se expresan como la media de 10 donantes sanos y 8 pacientes alérgicos.

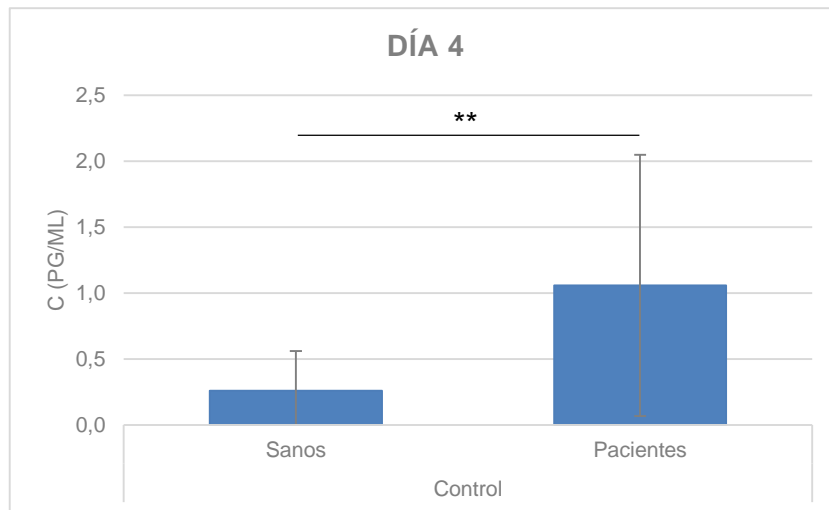


Figura 21: Secreción de IL-5 a día 4 del control de los pacientes alérgicos en comparación con el control de los donantes sanos. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 8 pacientes y 10 donantes sanos. **: $p < 0,01$.

Estas observaciones son llamativas ya que, si ninguna de estas dos proteínas produjera algún tipo de efecto sobre el cultivo, lo que debería observarse es un resultado similar al que se da en el control. Por otra parte, ya se ha mostrado la evolución de las diferentes subpoblaciones de PBMCs y no se observó ningún efecto anómalo de la LTP proteolizada o de la enzima sobre la viabilidad celular, por lo que podemos suponer que éstas no afectan a las células. Se podría formular la hipótesis de que la proteasa pudiera ser capaz de cortar en algún dominio de la IL-5, ya que, tanto la solución de proteasa como la solución de LTP proteolizada contienen la enzima, aunque en ambos casos se considera que la enzima está inactivada mediante calentamiento durante 5 min a 100°C. Sin embargo, pudiera ser que la inactivación no hubiera sido completa. Por ello, con perspectiva de futuro, podrían llevarse a cabo diferentes estudios y ensayos que ayudaran a confirmar o desechar dicha hipótesis.

Por un lado, se podría realizar un estudio computacional de las secuencias de corte de la proteasa en cuestión y la secuencia peptídica de la IL-5 comparando, con la ayuda de herramientas bioinformáticas, para dilucidar si existe algún tipo de coincidencia entre ellas. También se podría caracterizar el cocktail de proteínas del sobrenadante de los cultivos, en presencia de la LTP proteolizada y la proteasa, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Por otro lado, se podrían realizar ensayos control añadiendo la proteasa a una solución de IL-5 comercial y, tras un tiempo de incubación adecuado, llevar a cabo un ELISA siguiendo el procedimiento explicado en este trabajo.

6. Conclusiones

1. La combinación de técnicas de cromatografía y ultrafiltración permite obtener Mal d 3 a partir de extractos de piel de manzana con un grado de pureza mayor al 95%.

2. Durante el cultivo, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en los pacientes alérgicos aumenta a pesar de la disminución en el número total de PBMCs, lo que es debido a que mueren menos que el resto y aumentan su porcentaje sobre el total. Esto pone de manifiesto una mayor capacidad intrínseca de supervivencia por parte de este tipo celular en los pacientes alérgicos.

3. El porcentaje de linfocitos B procedentes de pacientes alérgicos sufre una variación prácticamente nula a lo largo de los días de cultivo a pesar de la disminución del número total de PBMCs.

4. El número de linfocitos B apenas varía tras varios días de cultivo, llegando a superar, con diferencias estadísticamente significativas, al número de linfocitos B procedentes de donantes sanos. Este hecho muestra una mayor tasa de supervivencia de las células B de los pacientes alérgicos, lo que podría estar relacionado con la presencia de una respuesta humoral activa.

5. El porcentaje y el número tanto de linfocitos T CD4⁺ como de linfocitos B a día 0 en los pacientes alérgicos es significativamente menor que en los donantes sanos. Esta diferencia debe estar compensada por alguna otra subpoblación de PBMCs (monocitos o células NK).

6. Se observa una elevada producción de IL-5 en pacientes alérgicos a nivel basal y al exponer los cultivos al alérgeno en estado nativo.

6. Conclusions

1. The combination of chromatography and ultrafiltration techniques makes it possible to obtain Mal d 3 from apple peel extracts with a purity degree greater than 95%.

2. During culture, the percentage of CD4⁺ T lymphocytes in allergic patients increases despite the decrease in the total number of PBMCs, which is due to the fact that they die less than the rest and increase their percentage in the total. This shows a greater intrinsic survival capability on the part of this cell type in allergic patients.

3. The percentage of B lymphocytes from allergic patients undergoes practically no variation throughout the days of culture despite the decrease in the total number of PBMCs.

4. The number of B lymphocytes hardly varies after several days of culture, even exceeding, with statistically significant differences, the number of B lymphocytes from healthy donors. This fact shows a higher survival rate of B cells from allergic patients, which could be related to the presence of an active humoral response.

5. The percentage and number of both CD4⁺ T cells and B cells at day 0 in allergic patients is significantly lower than in healthy donors. This difference must be compensated by some other subpopulation of PBMCs (monocytes or NK cells).

6. Elevated IL-5 production is observed in allergic patients at baseline and upon exposure of cultures to allergen in the native state.

7. Bibliografía

1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):41-58.
2. De la Hoz Caballero B. Alergia a los alimentos. En Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y SEFAC, editores. *Alergológica* 2015. Madrid: Draft Grupo de Comunicación Healthcare. 2017. p. 206-229.
3. Ibáñez Sandín MDP, De la Hoz Caballer MB, Escudero Díez C, Cuesta Herranz J. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. En: Peláez A, Dávila IJ, editores. *Tratado de alergología.* Madrid: Ergón. 2007. p. 939-963.
4. Molinas J, Arduoso L, Crisci C. Alergia alimentaria. *Invenio.* 2004; 7(12): 133-141.
5. Adley CC, Ryan MP. The Nature and Extent of Foodborne Disease. *Antimicrobial Food Packaging.* San Diego: Academic Press; 2016. p. 1-10.
6. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Informe del Comité Científico de la AESAN sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN.* 2007; 5: 19-76.
7. Taylor SL, Hefle SL. Food allergies and other food sensitivities: A publication of the Institute of Food Technologists expert panel on food safety and nutrition. *Food Technol.* 2001; 55(9): 68-83.
8. Rüter B, Shreffler WG. The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129(4): 921-8.
9. Moore LE, Stewart PH, deShazo RD. Food allergy: What we know now. *Am J Med Sci.* 2017; 353 (4): 353-66.
10. Akdis CA. Los mecanismos subyacentes de la alergia. En: Akdis CA, Agache I, editores. *EAACI Global Atlas of Allergy.* Zúrich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014. p. 39-42.

11. Schmidt-Weber CB. Células T. En: Akdis CA, Agache I, editores. EAACI Global Atlas of Allergy. Zúrich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014. p. 60-61.
12. Abdel-Gadir A, Chatila T. Células B. En: Akdis CA, Agache I, editores. EAACI Global Atlas of Allergy. Zúrich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014. p. 62-63.
13. Gould H, Chan Y. Inmunoglobulina E y otros anticuerpos en alergia. En: Akdis CA, Agache I, editores. EAACI Global Atlas of Allergy. Zúrich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014. p. 64-66.
14. He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D, Yang PC. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013; 34(10): 1270–1283.
15. Galli SJ. Mastocitos. En: Akdis CA, Agache I, editores. EAACI Global Atlas of Allergy. Zúrich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2014. p. 53-55.
16. Clínica Subiza [Sede Web]. Madrid; 2018. De Subiza J, Rodríguez R, Subiza JL. Neumoalérgenos e inflamación de las vías aéreas. Disponible en: <https://www.clinicasubiza.com/Portals/0/documentos/neumoalergenodrssubiza.pdf?ver=2018-10-18-181024-693>.
17. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21. e1-70.
18. Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy*. 2014; 69(10):1397-1404.
19. Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30: 906-910.
20. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):14-23; quiz 24.

21. Antón Gironés M, Andreu Balaguer CM, Cerecero Carballo I, García Nuñez I. Clasificación y etiopatogenia de la alergia a los alimentos. Tratado de alergología. Madrid: Ergon.; 2015. p. 941-953.
22. Jose-Estanyol M, Gomis-Ruth FX, Puigdomenech P. The eight cysteine motif a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol Biochem.* 2004; 42(5): 355–365.
23. García-Casado G, Crespo JF, Rodríguez J, Salcedo G. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(4): 647-649.
24. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, García-Casado G, Salcedo G, Barber D. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(26): 7738-7741.
25. Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(2): 493-497.
26. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, del Mar San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(4): 900-907.
27. Lavilla M, Orcajo J, Díaz-Perales A, Gamboa P. Examining the effect of High Pressure Processing on the allergenic potential of the major allergen in peach (Pru p 3). *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2016; 38(B): 334-341.
28. Gómez-Casado C, Tordesillas L, Kinkel J, et al. Impact of glutathione on the allergenicity of the peach lipid transfer protein pru p 3. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2015; 25(1): 47-54.
29. Borges JP, Jauneau A, Brulé C, Culerrier R, Barre A, et al. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem.* 2006; 44(10): 535–542.

30. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106(2): 228-238.

31. Hartz C, Lauer I, del Mar San Miguel Moncin M, et al. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 153(4): 335-346.

32. Schulten V, Nagl B, Scala E, Bernardi ML, Mari A, et al. Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein from peach, dominates the immune response to its homolog in hazelnut. *Allergy.* 2011; 66(8): 1005–1013.

33. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruit, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30(10): 1403-1410.

34. Asero R. In patients with LTP síndrome food-specific IgE show a predictable hierarchical order. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2014; 46: 142-6.

35. Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013; 13 (4): 379-85.

36. Fernández M, Volar S, González-Mancebo E, et al. Alergia a la manzana en Europa: cómo el perfil de sensibilización alérgica determina la expresión clínica de la alergia a alimentos de origen vegetal. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118 (2): 481-488.

37. World Health Organization (WHO). Allergen Nomenclature, WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. 2019. Disponible en: <http://www.allergen.org/index.php>.

38. Hassan AK, Venkatesh YP. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2015; 47(6); 180.

39. Tobajas AP, Agulló-García A, Cubero JL, Colás C, Segura-Gil I, Sánchez L, Calvo M, Pérez MD. Effect of high pressure and pulsed electric field on denaturation and allergenicity of Pru p 3 protein from peach. *Food Chem.* 2020;321: 126745.

40. Tobajas AP. Desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la determinación de proteínas alergénicas de melocotón [Trabajo de Fin de Grado]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 2015.

41. Rodrigo L. Estudio del efecto de la madurez y del almacenamiento en la proteína alergénica Mal d 3 en diferentes variedades de manzana [Trabajo de Fin de Máster]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 2020.

42. Arce D. Respuesta celular contra alérgenos vegetales [Trabajo de Fin de Grado]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 2020.

43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.

44. Bosque A, Pardo J, Martínez-Lorenzo MJ, Iturralde M, Marzo I, Piñeiro A, Álava MA, Naval J, Anel A. Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J Leukoc Biol*. 2005; 77(4): 568-578.

45. Sancho AI, Wallner M, Hauser M, Nagl B, Himly M, Asam C, et al. T Cell epitope-containing domains of Ragweed Amb a 1 and Mugwort Art v 6 modulate immunologic responses in humans and mice. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169784.

46. Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. Decreases in the numbers of peripheral blood regulatory T cells, and increases in the levels of memory and activated B cells, in patients with active eosinophilic granulomatosis and polyangiitis. *J Clin Immunol*. 2013; 33(5): 965–976.

8. ANEXO

8.1. Datos clínicos de los pacientes alérgicos

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Años de evolución/última reacción	Asma	Rinitis	Conjuntivitis	Síntomas con melocotón	Síntomas con piel de manzana	Tratamiento con adrenalina	Cofactores
1	Mujer	27	Múltiples, mostaza. Tolera cerezas.	10 años/20 meses	Leve intermitente	Moderada persistente	No	SAO ¹ , cólico abdominal.	Tolera pelada.	Sí	No
2	Mujer	32	Frutas. Tolera melón.	15 años/12 meses	Leve intermitente	Moderada persistente	Leve intermitente	SAO, cólico abdominal.	No	No	No
3	Hombre	57	Endivias, nueces de macadamia, melocotón.	14 años/10 años	Leve persistente	Moderada persistente	Moderada persistente	SAO, urticaria.	Tolera manzana con piel.	No	AINEs ²
4	Mujer	44	Melocotón, sandía. (Celíaca)	4 años/7 meses	No	Moderada intermitente	Moderada intermitente	SAO, shock anafiláctico.	Tolera pelada y asada.	No	AINEs
5	Hombre	20	Nueces, cacahuete, kiwi.	12 meses/12 meses	No	Moderada intermitente	Moderada intermitente	Shock anafiláctico.	Tolera pelada.	No	Ejercicio físico
6	Hombre	28	Frutas, cerveza.	20 años/7 años	Leve intermitente	Moderada intermitente	Leve intermitente	Urticaria, cólico abdominal.	Tolera pelada.	No	No
7	Hombre	47	Frutas, frutos secos, verduras.	7 años/2 semanas	No	Leve persistente	No	Urticaria, angioderma, asma.	Tolera asada.	Sí	Ejercicio físico
8	Mujer	23	Frutas.	3 años/1 semana	Leve intermitente	Moderada persistente	Grave persistente	SAO	Urticaria	No	Ejercicio físico
9	Mujer	30	Frutas, tropicales, cucurbitáceas.	27 años/18 meses	Moderada	Grave persistente	Moderada persistente	Urticaria, angioderma, asma.	SAO, angioderma, cólico abdominal.	Sí	Ejercicio físico
10	Mujer	29	Melocotón, granada.	18 años/6 años	Leve intermitente	Moderada intermitente	Leve intermitente	Urticaria, angioderma, asma.	Urticaria, angioderma, asma.	No	Alcohol
11	Mujer	32	Melocotón, manzana.	16 años/10 años	No	No	No	Urticaria	Urticaria	No	Ejercicio físico
12	Mujer	34	Frutos secos, frutas. Tolera melón y sandía.	20 años/1 mes	No	No	No	SAO, urticaria, angioderma.	SAO, urticaria, shock anafiláctico.	No	AINEs. Ejercicio físico
13	Mujer	35	Prunáceas, melón.	20 años/15 años	No	No	No	Urticaria, angioderma.	No	No	No
14	Hombre	32	Frutos secos. Frutas. Tomate.	15 años/a diario (es cocinero)	No	Leve intermitente	Leve intermitente	SAO, urticaria, angioderma.	Urticaria, angioderma.	No	Alcohol
15	Mujer	29	Nueces, cereza, ciruela.	25 años/10 años	No	Leve intermitente	Leve intermitente	SAO, urticaria, angioderma.	SAO, angioderma.	No	Ejercicio físico

¹ AINEs: antiinflamatorios no esteroideos.

² SAO: síndrome de alergia oral.