

Ana Pilar Tobajas De La Fuente

Aplicación de tratamientos
tecnológicos para disminuir la
alergenicidad de las
proteínas de transferencia de
lípidos (LTP) de frutas rosáceas

Director/es

Pérez Cabrejas, María Dolores
Sánchez Paniagua, María Lourdes

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS
TECNOLÓGICOS PARA DISMINUIR LA
ALERGENICIDAD DE LAS
PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS
(LTP) DE FRUTAS ROSÁCEAS

Autor

Ana Pilar Tobajas De La Fuente

Director/es

Pérez Cabrejas, María Dolores
Sánchez Paniagua, María Lourdes

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los
Alimentos

2023

Tesis Doctoral

Aplicación de tratamientos tecnológicos para disminuir la alergenicidad de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de frutas rosáceas

Autor

Ana Pilar Tobajas de la Fuente

Director/es

M^a Dolores Pérez Cabrejas

M^a Lourdes Sánchez Paniagua

Facultad de Veterinaria

2022

A mi madre

"Si no conozco una cosa, la investigaré"

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Siempre he sido de las personas que piensa que es de bien nacido ser agradecido. Y en esta etapa de mi vida, lo que más puedo hacer es agradecer a todas esas personas que se han cruzado en mi camino y que, con una humilde sonrisa, han sido capaces de mejorar cualquier situación por muy mala que fuera.

La investigación me parece un área fascinante, pero a la vez muy agotadora. Todos sabemos que para llegar a obtener buenos resultados primero hemos tenido que fracasar muchas veces, hasta que todo empieza a fluir y de repente, ves cómo se encauza todo.

Todo esto, no sería posible sin la ayuda de mis directoras de tesis, Dolores Pérez y Lourdes Sánchez. Gracias por enseñarme tantas cosas, por guiarme, ayudarme, apoyarme en los malos momentos, creer en mi propuesta de investigación y, sobre todo, por vuestra infinita paciencia. Siempre estáis ahí, sea la hora y el día que sea, para ayudarnos en todo lo que podáis y eso, vale oro.

Llegué en tercero de carrera con una propuesta que parecía una locura para un TFG y al final se ha convertido en muchos años junto a vosotras cumpliendo mi sueño, intentando aportar mi granito de arena a la sociedad, que para eso sirve la ciencia y la investigación y ojalá algún día, llegue a cumplirse el sueño de ver en un supermercado una bebida hipoalergénica a base de frutas.

Y seré la primera en comprar ese producto porque, por si alguno de los que está leyendo estas líneas todavía no se ha enterado, todo esto empezó a los dos años de desarrollar la alergia a la LTP, esa proteína fascinante que tantos quebraderos de cabeza me ha generado. Es por ello que en vez de verlo como algo negativo, le di la vuelta a la tortilla y me aproveché de mi cuerpo.

Y digo de mi cuerpo porque este trabajo, nunca mejor dicho, se ha hecho con sangre, sudor y lágrimas. Una maravillosa sangre rica en IgEs frente a frutas, frutos secos y muchas cosas más.

Por todo esto y mucho más, infinitas gracias al Grupo de leche, como todos conocerán, pero realmente denominado “El efecto del Procesado Tecnológico de los Alimentos en las Patologías Digestivas y Alérgicas (ALIPAT)” y a Miguel Calvo como IP del grupo. A Santiago Condón por enseñarme tanto sobre nuevas tecnologías, permitirme usar los ultrasonidos a mis anchas y confiar en esta investigación.

Durante estos años ha pasado mucha gente por este laboratorio, desde mis comienzos con Mercedes y Saidou, pasando por mis queridísimos lecheros, José Antonio, Ripo, “Magalian” e Isa, he perdido la cuenta de las ciudades y los países que hemos visitado juntos, sin duda, ha sido una de las mejores etapas de mi vida y ojalá en un futuro volvamos a trabajar juntos. Gracias por vuestro apoyo, vuestros innumerables consejos, enseñanzas y, sobre todo, por formar parte de mi vida.

Imposible olvidarme de compañeros que han estado menos tiempo pero que aun así también han formado parte de esta andadura: María, Marta, Sara, Tania, Laura, Clara, Cori, Fanny, Andrea, Edu, Juan Pedro, Felipe, Juan Carlos, Irving, Sherry, Marcela, Lizano, Cristina, Rocío... Y por supuesto a mis chicas, Miriam, Inés, Dimitra y Alba, con las que he compartido mi última etapa del doctorado. Os estoy eternamente agradecida y os deseo toda la suerte del mundo con vuestra tesis.

No puedo olvidarme de mis chicos de Carne, Juan, Pedro y José Antonio Beltrán, a los que siempre les iba a “robar” el ultraturrax pero como lo hacía con una sonrisa y de vez en cuando con alguna tarta de queso nunca ponían pega. Me habéis ayudado mucho y sobre todo escuchado cuando entraba para contaros mis penas (o mis locuras).

Y de mis compañeros de Tecno, Berdejo, con el que tantos años he compartido desde que empezamos CTA, Santi, como agradecerte lo que me has ayudado con el equipo de ultrasonidos, Virginia, Make, María, Salomé, Laura, Bea, Elisa, Natalia, Marta, Víctor, Leire, Carlota, Jorge...

A mis Veggies, mi gran Ana P, la persona que deja todo lo que esté haciendo, por muy importante que sea, para ayudarte, consolarte, alegrarte... Gente Luminosa como dice el Arrebato, de las que hace falta en la vida. Nunca se me olvidará el grito que pegaste en la Facultad cuando te enteraste de que me habían dado el contrato predoctoral de la DGA. A Gimi y a Silvia, que siempre están ahí para echar la charrada, el café o lo que haga falta. Y a Esther, Uge y Ocha por su apoyo y su continua ayuda con mis frutitas.

A Sergio, por transmitirme todos tus conocimientos y permitirme investigar contigo, a pesar de no ser Veterinaria, porque no se nos pone nada por delante, igual nos dan los ELISAs de melocotón, que de *Leishmania* o de COVID. Ojalá por muchos años más.

A todos los profesores del departamento, gracias por hacernos sentir como en casa, por enseñarnos todo lo que está en vuestra mano, ayudarnos en cualquier momento, por disfrutar juntos de tantas fiestas, champanadas y patrones que hacen que el departamento sea tu segunda familia.

A Silvana, la eterna agradecida, siempre sonriente y dispuesta a ayudarte.

Y como no, a mi Carmencica, siempre seré tu gitana María y tú siempre serás la mami de todos, la que nos quiere como nadie y se desvive por nosotros. Nunca pierdas esa alegría y hazle caso al Horóscopo que a veces se cumple. ¡Qué haría yo sin vosotras dos! Cuando nos contábamos nuestras penas (y alegrías) por las mañanas durante el desayuno...

Al personal de la planta piloto, Ana, Lourdes y Antonio por su ayuda siempre que la he necesitado con cualquiera de los equipos, a Jesús Artajona por su paciencia y su ayuda con la centrífuga y mis litros de extractos de melocotón, a Inma y Pilar, siempre dispuestas a ayudarte con cualquier trámite. A Pilar Mañas, por su tremendísima labor como coordinadora del Programa de Doctorado.

A los alergólogos, José Luis, Ana y sobre todo Carlos Colás, nunca te dejaré de agradecer todo lo que has hecho por mí y por esta investigación, la fe que tienes puesta en todo lo que hago y la seguridad de que todo va a salir bien. Y a las enfermeras del servicio de Alergología, Esther y Sofía, con las que compartimos muchas tardes realizando el prick test, sin vosotras parte de esta tesis no hubiera sido posible.

A Irene Orera, del servicio de proteómica, siempre dispuesta para explicarme lo que haga falta. A mis chicos de mantenimiento, que se reían con mis inventos en el laboratorio y siempre están ahí para arreglar cualquier cosa y al resto del personal de la Facultad que, de una manera u otra, me han aportado algo.

A mis amigos de toda la vida, los que me han visto crecer, avanzar, superarme, los que siempre han estado ahí para apoyarme y también, reírse de mis alergias.

A mis compañeros de la rondalla, que siempre preguntan: ¿Cómo va ese melocotón, ya le has quitado la alergia? Siempre convencidos de que me van a dar un Premio Nobel Melocotonero... En los hobbies encuentras los desahogos y si ya los haces con gente tan especial como ellos, tienes entre manos una gran fortuna.

Y muy especialmente me gustaría agradecer,

A mis padres, que me han permitido seguir con mis estudios, que me han hecho creer en mí y me han permitido desarrollar gran parte de mis tesis sin un contrato. Siempre han estado ahí cuando he necesitado ese empujón muchas veces necesario para seguir adelante. Gracias por la educación que me habéis dado que como podréis haber visto en estos agradecimientos, ha sido muy buena, puesto que todo hay que agradecerlo en esta vida, hasta los malos momentos, que son los que te hacen más fuerte.

Mamá, que a estas alturas de la tesis, sabes hasta hacer un ELISA, que con la de veces que has ido al alergólogo con tus hijos te van a convalidar el título, soy muy afortunada de tener una madre como tú, porque madre no hay más que una y como la mía, ninguna. A mi hermano, que siempre está pendiente de mí, aunque no lo demuestre y sé que quiere siempre lo mejor para mí, eres mi gran referente y mi razón de querer superarme siempre, de lograr todo lo que me proponga. A mi cuñada Patri y a mi sobrino Mateito, que decir de vosotros, siempre estáis ahí para sacarme una sonrisa (y aguantar a mi hermano cuando se pone muy cabezota).

A toda mi familia, pero en especial a mis tías, Lupita, Daría y Maribel, que siempre habéis estado pendientes de mí y me habéis alegrado los días desde que tengo uso de razón.

Maribel, Como me gustaría que estuvieras en este momento para ver hasta donde he llegado. Cómo te preocupabas por mí, por mis estudios y por absolutamente TODO. Esta tesis va en gran parte dedicada a ti.

A Miguel, el gran sufridor, el que ha soportado mi tesis, mis locuras, mi pesadez, el que me ha dado alegría en mis días tristes y ha sido capaz de recuperar mi esperanza. Gracias por hacerme mucho más fácil esta etapa con el simple hecho de estar a mi lado.

Y de nuevo, a Dolores, porque nunca me cansaré de darte las gracias, no puedo nombrar todo lo que has hecho por mí porque estos agradecimientos se harían eternos.

A todos, de corazón, GRACIAS.

Agradezco el apoyo institucional prestado por el Gobierno de Aragón a través del contrato de personal investigador predoctoral en formación para el período 2018-2022 cofinanciadas con el Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020.

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
1.1. Justificación.....	5
1.2. Objetivos	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Reacciones adversas a alimentos.....	10
2.2. Alergia alimentaria	11
2.2.1. Sintomatología	13
2.2.2. Diagnóstico.....	14
2.2.3. Prevención y tratamiento.....	17
2.3. Alérgenos alimentarios	18
2.3.1. Legislación y etiquetado.....	19
2.4. Alergia a las frutas	20
2.4.1. Proteínas alergénicas de las frutas.....	20
2.4.2. Proteínas alergénicas del melocotón y de la manzana	22
2.4.3. Familia LTP.....	23
2.4.4. Factores que influyen en la alergenicidad de las frutas.....	26
2.5. Elaboración de zumo de frutas	31
2.6. Aplicación de nuevas tecnologías en el procesado de las frutas	33
2.6.1. Altas presiones hidrostáticas	33
2.6.2. Pulsos eléctricos de alto voltaje	36
2.6.3. Ultrasonidos	37
2.6.4. Tratamientos enzimáticos	38
2.7. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la desnaturalización y alergenicidad de las frutas	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1. Muestras de frutas	43
3.2. Pacientes alérgicos a LTP y sueros sanguíneos	43
3.3. Materiales	44
3.4. Métodos	45
3.4.1. Preparación de extractos de frutas.....	45
3.4.2. Purificación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3	45
3.4.3. Determinación de la concentración de proteína	46
3.4.4. Técnica de SDS-PAGE.....	46
3.4.4.1. Preparación de geles	46

3.4.4.2.	SDS-PAGE.....	47
3.4.4.3.	Tinción de los geles	47
3.4.5.	Técnicas de espectrometría de masas	48
3.4.5.1.	Análisis de identificación de proteínas mediante huella peptídica por la técnica de MALDI-TOF	48
3.4.5.2.	Determinación de masa de proteínas y péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF	49
3.4.6.	Métodos inmunoquímicos	49
3.4.6.1.	Obtención de antisueros	49
3.4.6.2.	Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto.....	50
3.4.6.3.	Técnica de Western-blotting.....	51
3.4.6.4.	Purificación y conjugación de anticuerpos.....	52
3.4.6.5.	Técnica de ELISA tipo sandwich	52
3.4.6.5.1.	Preparación de estándares para las técnicas de ELISA sandwich	54
3.4.6.5.2.	Validación de los test ELISA sandwich.....	54
3.4.6.6.	Técnica de inmunofluorescencia de tipo no competitivo o competitivo indirecto	56
3.4.7.	Técnica de punción intraepidérmica (skin prick test)	57
3.4.8.	Tratamientos tecnológicos.....	58
3.4.8.1.	Tratamientos térmicos	58
3.4.8.2.	Pulsos eléctricos de alto voltaje	58
3.4.8.3.	Altas presiones hidrostáticas	58
3.4.8.4.	Ultrasonidos	59
3.4.8.5.	Tratamientos de proteólisis	59
3.4.8.5.1.	Preparación de extractos enzimáticos	59
3.4.8.5.2.	Ensayos de proteólisis	60
3.4.9.	Determinación de parámetros fisicoquímicos en manzana.....	60
3.4.9.1.	Firmeza	60
3.4.9.2.	Sólidos solubles totales	61
3.4.9.3.	Acidez	61
3.4.10.	Análisis estadístico de los resultados	61
4.	RESULTADOS	63
4.1.	Purificación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3	63
4.2.	Identificación de Pru p 3 por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF.....	65
4.3.	Titulación de antisueros	65
4.4.	Purificación de anticuerpos anti-Pru p 3 y anti-Mal d 3.....	66
4.5.	Desarrollo de una técnica de ELISA sandwich para la determinación de Pru p 3	67

4.6.	Desarrollo de una técnica ELISA sandwich para la determinación de Mal d 3	68
4.6.1.	Conjugado de anticuerpos con peroxidasa	68
4.6.2.	Conjugado de anticuerpos con fosfatasa alcalina	70
4.7.	Validación de la técnica de ELISA sandwich para determinar Pru p 3 y Mal d 3	71
4.8.	Determinación de la IgE específica frente a Pru p 3 y Mal d 3 en los sueros humanos..	75
4.9.	Efecto de los tratamientos tecnológicos en las proteínas Pru p 3 y Mal d 3	76
4.9.1.	Tratamientos térmicos	77
4.9.2.	Tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje	81
4.9.3.	Tratamientos de altas presiones hidrostáticas (AP).....	84
4.9.4.	Tratamientos de ultrasonidos	89
4.9.5.	Tratamientos de proteólisis	93
4.9.5.1.	Ensayos de proteólisis en la proteína Pru p 3	94
4.9.5.2.	Ensayos de proteólisis en la proteína Mal d 3.....	104
4.2.	Efecto de la madurez y el almacenamiento postcosecha en la composición y contenido en Mal d 3 de diferentes variedades de manzana	110
4.2.1.	Valores de firmeza, contenido en sólidos solubles totales y acidez	111
4.2.2.	Contenido en proteína total y Mal d 3 en la piel de manzana	116
4.2.3.	Determinación del perfil proteico	119
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	124
6.	CONCLUSIONES	132
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	136
8.	ANEXOS.....	149

Resumen

RESUMEN

Las frutas son un alimento esencial en nuestra dieta dado su elevado contenido en vitaminas, fibra y antioxidantes. Sin embargo, son también la causa más frecuente de alergias alimentarias en la población española (44,7 % del total), siendo las rosáceas las causantes del 59% de las alergias a frutas, entre ellas el melocotón (*Prunus persica*) y la manzana (*Malus domestica*). Las proteínas Pru p 3 y la Mal d 3 son las más alergénicas del melocotón y de la manzana, respectivamente. Estas proteínas se caracterizan por presentar una alta estabilidad frente a los tratamientos tecnológicos y a la degradación por las proteasas digestivas, siendo las principales causantes de reacciones sistémicas graves que cursan a menudo con shock anafiláctico.

El objetivo principal de este proyecto ha sido investigar la potencial modificación de la estructura de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 utilizando tecnologías de procesado que puedan ser utilizadas a nivel industrial para reducir la alergenicidad de los productos derivados de las mismas. Así mismo, se ha estudiado cómo afecta la variedad de manzana, el grado de madurez y las condiciones de almacenamiento en el contenido en Mal d 3.

Para realizar este estudio, se han desarrollado técnicas de ELISA sandwich para determinar las proteínas Pru p 3 y Mal d 3, para lo que fue necesario previamente purificar las proteínas, obtener anticuerpos específicos frente a ellas, y conjugarlos con un enzima marcador. El grado de desnaturalización de Pru p 3 y Mal d 3 por efecto de los tratamientos tecnológicos (térmicos, pulsos eléctricos de alto voltaje, altas presiones hidrostáticas, ultrasonidos y proteólisis) se determinó midiendo la pérdida de inmunoreactividad (antigenicidad) utilizando las técnicas desarrolladas. El efecto de los tratamientos tecnológicos en la alergenicidad de la Pru p 3 y Mal d 3 se determinó “in vitro”, mediante una técnica de inmunofluorescencia de tipo competitivo utilizando pools de sueros o sueros individuales de pacientes alérgicos a melocotón o manzana, y mediante la prueba “in vivo” de prick test.

Para la caracterización del grado de madurez de las manzanas, se determinó la firmeza, contenido en sólidos solubles totales y acidez titulable. Además, en la piel de las manzanas se determinó el contenido en proteína total, el perfil proteico y el contenido en Mal d 3.

Los resultados obtenidos con los tratamientos térmicos mostraron que la Pru p 3 tratada en extracto de melocotón es estable a 75 °C y 85 °C durante 40 min. Sin embargo, a 95

°C, el grado de desnaturalización aumentó con el tiempo de tratamiento, obteniéndose valores de inmunorreactividad de un 30% y 60% inferiores respecto al control a los 20 y 40 min, respectivamente. Cuando la proteína se trató en tampón, la desnaturalización fue mayor, lo que sugiere un efecto protector de los componentes del extracto.

El tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje a 25,5 kV/cm y 25°C no tuvo efecto en la Pru p 3, mientras que al combinarlo con calor, la desnaturalización a 50°C fue de un 54%.

El tratamiento de altas presiones del extracto de piel de melocotón a 20 °C indujo cambios en la proteína Pru p 3 a presiones superiores a 500 MPa. El tratamiento combinado con calor a 50 °C resultó en un mayor grado de desnaturalización, disminuyendo la proteína inmunorreactiva más del 40% a 400 MPa, y manteniéndose prácticamente en ese nivel al aplicar presiones mayores.

Los tratamientos de ultrasonidos indujeron cambios en la desnaturalización de la Pru p 3, cuya magnitud dependió de la amplitud aplicada. El tratamiento de ultrasonidos combinado con presión (manosonicación) produjo una mayor pérdida de inmunorreactividad, que fue de un 43% tras el tratamiento más severo de 100 µm y 100 kPa.

Los resultados del efecto de los tratamientos tecnológicos aplicados en este estudio en la alergenicidad de la Pru p 3 mostraron que independientemente de la tecnología aplicada y las condiciones utilizadas, no son capaces de disminuir más allá de un 10% la reactividad de la proteína con las IgE de sueros de pacientes alérgicos.

Cuando las muestras de Pru p 3 tratadas con pulsos eléctricos y altas presiones en las condiciones más severas se ensayaron en pacientes alérgicos, se observó una respuesta muy variable, con un aumento o una disminución del tamaño del habón en aproximadamente el 40-45% de los pacientes, lo que sugiere una respuesta individual que depende de la afectación por los tratamientos de los epítomos frente a los que está sensibilizado cada paciente.

Por otra parte, la Pru p 3 ha mostrado tener una alta resistencia frente a los tratamientos de proteólisis en los que se han ensayado 20 proteasas, ya que sólo es degradada eficientemente por la proteasa de páncreas bovino y las proteasas ácidas 1 y 2, siendo éstas últimas las que al poseer un p H óptimo ácido, se podrían aplicar en el procesado de las frutas. Los hidrolizados obtenidos con estas proteasas ácidas no contienen proteína nativa y los péptidos obtenidos son menores de 3,2 y 1,8 kDa para los tratamientos realizados a 50°C/2h y 25°C/24h, respectivamente. Estos hidrolizados mostraron un

marcado efecto en reducir la reactividad de la Pru p 3 con las IgE del suero de alérgicos, entre un 65 y un 85% de los individuos. Así mismo, esos hidrolizados mostraron una disminución del tamaño del habón en la prueba de prick test en más del 90% de los pacientes alérgicos, con un tamaño medio del diámetro del habón entre un 70 y un 85% menor al de la proteína sin tratar. Los resultados obtenidos con Mal 3 en el estudio de proteólisis han sido similares a los obtenidos con Pru p 3 y sugieren que la utilización de las proteasas ácidas 1 o 2 en el procesado permitiría obtener productos de frutas rosáceas menos alergénicos y, por tanto, más tolerables para la población sensible.

Por otra parte, el estudio llevado a cabo para determinar la cantidad de Mal d 3 en diferentes variedades de manzana mostró un rango de concentraciones de entre 13.6 ± 3.0 $\mu\text{g/g}$ (Golden) y 25.2 ± 3.9 $\mu\text{g/g}$ (Verde Doncella) en el grado óptimo de madurez. El grado de madurez no parece tener una influencia significativa en el contenido en Mal d 3, mientras que durante el almacenamiento en atmósfera controlada se produce una disminución de la proteína entre 1.3 y 2.5 veces.

Justificación y objetivos

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Justificación

Las alergias a los alimentos afectan a un 7-10% de la población por lo que están consideradas un serio problema de salud pública (Sicherer y Sampson, 2018). Además, su prevalencia ha aumentado considerablemente en los países industrializados en las tres últimas décadas (Nwaru et al., 2014; Sicherer y Sampson, 2018).

La forma más efectiva de prevenir la alergia a un alimento es evitar la ingesta del mismo, mediante una dieta de eliminación estricta (Wood, 2017). Esta situación ha conducido a que las instituciones sanitarias de numerosos países exijan un mayor control en el etiquetado de los alimentos. En la Unión Europea, Reglamento (UE) nº 1169/2011, actualmente vigente, obliga a incluir en la etiqueta, cuando se añaden como ingredientes, una serie de alimentos que pueden causar alergias o intolerancias. Estos alimentos son los cereales con gluten, los crustáceos, los huevos, el pescado, la soja, la leche, el cacahuete, los frutos de cáscara, el apio, la mostaza, el sésamo, los altramuces, los moluscos, el anhídrido sulfuroso y los sulfitos.

Las frutas son una parte integral de la dieta ya que constituyen una buena fuente de vitaminas, minerales, fibra y compuestos antioxidantes. Sin embargo, su consumo posee un riesgo considerable para las personas sensibilizadas ya que algunas proteínas presentes en ellas pueden dar lugar a reacciones alérgicas (Vanga et al., 2018).

En España, según los resultados del estudio Alergológica 2015, publicado por la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), las frutas frescas son la causa más frecuente de alergias alimentarias en la población (44,7% del total) y su prevalencia ha aumentado vertiginosamente en la última década (33,3% en el informe previo de Alergológica 2005). En ambos estudios, se ha indicado que las frutas de la familia de las rosáceas son las principales causantes de las alergias alimentarias (59,4% de las inducidas por frutas y 25,7% de las inducidas por alimentos), siendo el melocotón y la manzana las que producen con mayor frecuencia reacciones alérgicas. Sin embargo, a pesar de su alta prevalencia, las frutas rosáceas no están incluidas en este momento en la lista de etiquetado obligatorio de la directiva europea.

Las manifestaciones clínicas de la alergia a las rosáceas muestran marcadas diferencias, que están relacionadas con el diferente patrón de alérgenos implicados. En el

norte de Europa, esta alergia suele estar asociada a una alergia previa al polen. La sintomatología es leve y afecta casi exclusivamente a la zona orofaríngea (síndrome de alergia oral). La sensibilización a alérgenos lábiles, como los homólogos a la proteína alergénica Bet v 1 del abedul o las profilinas explican este patrón clínico de respuesta, puesto que son rápidamente degradados por los enzimas digestivos (Hassan y Venkatesh, 2015).

En el área mediterránea, la alergia a las rosáceas es más severa, con menos manifestaciones orales y frecuente afectación sistémica de tipo urticaria generalizada y anafilaxia, que pone en peligro la vida del individuo. En estos casos, las proteínas de la familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTP, de sus siglas en inglés, Lipid Transfer Proteins), son los alérgenos más frecuentemente implicados (Sinha et al., 2014). La gran estabilidad de estos alérgenos a la temperatura, al pH ácido y a la degradación por las proteasas digestivas favorece la aparición de reacciones generalizadas (Cavatorta et al., 2010). En nuestro país, la tasa de sensibilización a la LTP del melocotón es la mayor de todas las proteínas alergénicas, de un 62%, frente a un 7% y 34% para las proteínas PR-10 y profilinas, respectivamente (Salcedo et al., 2008).

La familia LTP incluye un grupo de proteínas básicas de 9 kDa, que se localizan preferentemente en la piel de las frutas. Contienen 8 cisteínas que forman 4 puentes disulfuro, que le confieren una alta estabilidad a la digestión y al procesado. Entre ellas, se encuentran la proteína Pru p 3 del melocotón y la Mal d 3 de la manzana (Vanga et al., 2018).

La principal función de las LTP en las frutas es la de participar en mecanismos de defensa, por lo que se acumulan en respuesta a infecciones por patógenos, heridas, tras la aplicación de productos químicos o en situaciones de estrés. Por tanto, es importante considerar que, en esas circunstancias, aumenta la expresión de estos alérgenos y, por lo tanto, los procesos de cultivo, recogida, almacenamiento o manipulación de frutas pueden aumentar su contenido y, en definitiva, su alergenicidad (Sancho et al., 2006b).

La producción de frutas rosáceas está destinada principalmente al consumo en fresco, pero una parte considerable se destina a la elaboración de productos derivados como zumos y concentrados. El procesado de estos productos conlleva la utilización de tratamientos térmicos para inactivar los enzimas presentes en la fruta y de tratamientos de pasterización para inactivar los microorganismos y alargar su vida útil. Además, se

realizan tratamientos con enzimas fundamentalmente pectinasas y celulasas, para llevar a cabo un proceso de clarificación (Barrett et al., 2004). Sin embargo, estos tratamientos no han mostrado ser eficientes para disminuir la alergenicidad de los productos obtenidos.

En los últimos años, se han llevado a cabo algunos estudios puntuales para conocer el efecto que tienen los tratamientos térmicos y las nuevas tecnologías de procesado en la alergenicidad de las frutas, con el objetivo de diseñar métodos que reduzcan o eliminen su actividad alergénica, como requisito previo para la producción de alimentos hipoalergénicos (Vanga et al., 2018). En concreto, en el grupo de las rosáceas, se ha observado que tratamientos de la Pru p 3 a 121 °C durante 30 min o de la Mal d 3 a 90 °C durante 20 min no disminuyen su capacidad alergénica (Brenna et al., 2000; Sancho et al., 2005). Así mismo, los tratamientos de ultrasonidos (Garino et al., 2012) y altas presiones hidrostáticas de la Pru p 3 (Lavilla et al., 2016) no son capaces de disminuir su alergenicidad. Respecto a los tratamientos de proteólisis, hasta la fecha solo se han publicado ensayos con dos proteasas fúngicas industriales en la degradación de la Pru p 3 que no han mostrado ser capaces de degradarla ni de disminuir su alergenicidad (Brenna et al., 2000).

1.2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es investigar la potencial modificación de la estructura de las proteínas más alergénicas de las frutas rosáceas utilizando tecnologías de procesado que puedan ser utilizadas a nivel industrial para reducir la alergenicidad de los productos derivados de las mismas.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar técnicas ELISA de tipo sándwich que permitan determinar específicamente la concentración de las proteínas alergénicas Pru p 3 de melocotón y Mal d 3 de manzana, así como estimar su grado de desnaturalización inducido por los tratamientos tecnológicos de procesado.
- Adaptar una técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta que permita determinar los cambios en la reactividad de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 con las IgE del suero de pacientes alérgicos a melocotón y manzana en muestras que han sido sometidas a diferentes tratamientos tecnológicos.

- Estudiar el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos (térmicos, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos de alto voltaje y ultrasonidos, combinados o no con calor) en la desnaturalización y alergenicidad “in vitro” e “in vivo” de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3.
- Estudiar el efecto que tienen los tratamientos de proteólisis utilizando una amplia gama de proteasas de diversos orígenes y ensayando diferentes condiciones de incubación, en la desnaturalización y alergenicidad “in vitro” e “in vivo” de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3.
- Estudiar el efecto de la variedad de manzana, así como del grado de madurez en el momento de la recolección y el tiempo de almacenamiento postcosecha en atmósfera controlada en su composición y contenido en Mal d 3.

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Reacciones adversas a alimentos

Se define reacción adversa a los alimentos a cualquier respuesta clínicamente anormal debida a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, de sus derivados o de algún aditivo contenido en el mismo (Ruiz Sánchez, 2018).

La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (“European Academy of Allergy and Clinical Immunology | EAACI.org,”) clasifica estas reacciones en tóxicas y no tóxicas, y a su vez, las no tóxicas en alergias e intolerancias (**Figura 1**).



Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos (adaptado de EAACI, 2001).

Las reacciones tóxicas son aquellas producidas por agentes químicos o biológicos presentes en los alimentos como pesticidas, metales pesados, bacterias y mohos o sus toxinas. Las reacciones no tóxicas incluyen las intolerancias y las alergias alimentarias. Las intolerancias no poseen un mecanismo de base inmunológica, pero existe un factor genético que contribuye a su susceptibilidad. Las más comunes se deben al déficit de enzimas necesarias para digerir algún componente de los alimentos, siendo la más conocida la intolerancia a la lactosa (Ortolani et al., 1999).

La alergia alimentaria se caracteriza por poseer una patogenia inmunitaria comprobada. Se desencadenan frente a proteínas denominadas alérgenos alimentarios,

que pueden formar parte del propio alimento o ser vehiculadas por este. Únicamente se producen en individuos sensibilizados y no están relacionados con efectos fisiológicos o fisiopatológicos de los alimentos (Sicherer y Sampson, 2018).

Las intolerancias y las reacciones tóxicas son dosis-dependientes, es decir, los efectos son más intensos cuanto mayor sea la cantidad de alimento ingerido. Esta relación puede no ocurrir en las reacciones alérgicas, de tal forma que dosis pequeñas pueden producir una respuesta clínica exagerada. Además, las reacciones tóxicas pueden ocurrir en cualquier individuo que ingiera el alimento en cantidad suficiente. Sin embargo, en las alergias y en las intolerancias, las manifestaciones clínicas se relacionan con las características del individuo, siendo la misma dosis de producto perfectamente tolerada por la mayoría de la población (Ortolani et al., 1999). Las principales diferencias entre los diferentes tipos de reacciones adversas a los alimentos se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Diferencias y similitudes entre reacciones alérgicas, de intolerancia y tóxicas a los alimentos. Adaptado de (“AESAN,” 2007).

Reacción adversa a los alimentos	Reacción alérgica	Reacción de intolerancia	Reacción tóxica
Dependencia de factores del individuo	(+)	(+)	(-)
Dependencia de factores del alimento	(-)	(-)	(+)
Patogenia	Inmunológica	Diversa, no inmunológica	

2.2. Alergia alimentaria

Se estima que la alergia alimentaria afecta en torno al 7-10% de la población general. Este porcentaje es mayor en niños que en adultos, ya que en algunas de las alergias que aparecen en la primera infancia, como las debidas a la leche de vaca y al huevo, se genera tolerancia en los primeros 3-4 años de vida (De la Cruz, 2018; Sicherer y Sampson, 2018). Además, cabe destacar que, en los últimos años, la prevalencia de la alergia alimentaria ha aumentado considerablemente, sobre todo en los países industrializados.

Según el último informe “Alergológica 2015” de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), las principales causas de alergia a alimentos en la población española por orden de frecuencia son las frutas, los frutos secos y los mariscos. En niños menores de 5 años, las alergias más frecuentes son a leche y huevos. Las alergias

a las frutas y frutos secos son más frecuentes a partir de la adolescencia, siendo los alimentos que producen más reacciones alérgicas en adultos. Las alergias a las frutas están frecuentemente asociadas a la alergia al polen, que tiene su máxima incidencia en la adolescencia. Dentro de las frutas, las rosáceas como el melocotón y la manzana son las que más reacciones alérgicas provocan (Sinha et al., 2014).

Las alergias alimentarias se dividen en dos grandes grupos según estén mediadas o no por inmunoglobulinas de la clase E (IgE). Las mediadas por IgE son las más comunes y conocidas, y se denominan alergias de tipo inmediato, ya que las reacciones se producen en las dos horas siguientes a la ingesta del alimento, produciéndose grandes cantidades de anticuerpos IgE contra el alérgeno. En cambio, las alergias alimentarias mediadas por otras clases de inmunoglobulinas o por células tardan unas 24-48 h en manifestarse, por lo que se denominan alergias de tipo retardado (Zubeldia et al., 2012)

El mecanismo de la alergia alimentaria mediada por IgE se produce en dos fases, sensibilización y elicitación (**Figura 2**). La fase de sensibilización ocurre después de la primera exposición al alérgeno y es asintomática. Las células presentadoras de antígeno de la superficie de la mucosa del tracto digestivo captan los alérgenos del alimento y los presentan a las células T CD4+, induciendo su diferenciación en linfocitos Th2. Estos producen citocinas e interleucinas que inducen a los linfocitos B a producir IgE específica para los alérgenos alimentarios, que luego se unen a los receptores de la superficie de los mastocitos y los basófilos. Cuando el paciente sensibilizado vuelve a exponerse al alérgeno, se produce la fase de elicitación, en la que el alérgeno se une a las IgE específicas de la superficie de los mastocitos y los basófilos, induciendo su degranulación. En este proceso se libera histamina y otros mediadores de la respuesta inflamatoria, que son los causantes de la reacción alérgica (Anvari et al., 2019; Sampson et al., 2018).

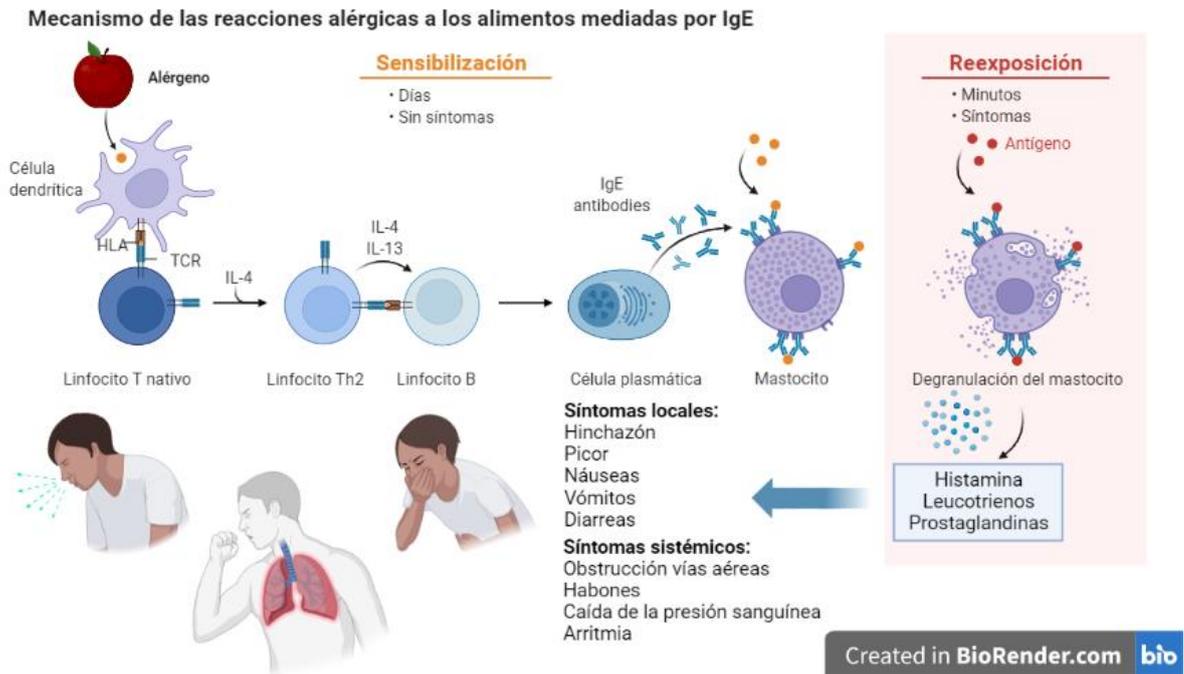


Figura 2. Mecanismo de las reacciones alérgicas a los alimentos mediadas por IgE (“UCFA | Utrecht Center for Food Allergy,”). Created with BioRender.com

2.2.1. Sintomatología

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de las reacciones mediadas por IgE suelen afectar a la piel, produciendo fundamentalmente prurito, eritema y/o urticaria. También destaca el síndrome de alergia oral (SAO), afección restringida a la mucosa orofaríngea, que suele causar edema de labios, lengua, paladar y faringe, picor, dolor punzante y por último sensación de opresión en la garganta. Otra manifestación clínica frecuente es la digestiva, que cursa con náuseas, vómitos y/o diarrea acompañado de dolor abdominal. También puede producirse afectación del sistema respiratorio con rinitis y/o broncoespasmo. Estas manifestaciones pueden darse aisladas, lo que es más frecuente en las reacciones cutáneas, o asociadas a otros órganos y sistemas (Zubeldia et al., 2012). Además, en algunas personas son necesarios determinados cofactores, como por ejemplo el ejercicio físico, el estrés o la ingesta de fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), etc. para que suceda una reacción alérgica a un alimento. El mecanismo responsable se ha atribuido a que dichos factores aceleran la absorción de los péptidos del alérgeno en el intestino y así incrementan la severidad de los síntomas (Babiano Fernández and Mur Gimeno, 2016; Ruano-Zaragoza et al., 2022).

El shock anafiláctico es la reacción más grave que puede presentarse en una alergia a los alimentos. Consiste en una reacción multisistémica en la que puede aparecer prurito generalizado y síntomas como urticaria, edema laríngeo, broncoespasmo, vómitos, diarrea, hipotensión y/o pérdida del conocimiento, que pueden conducir a la muerte si no se administra un tratamiento sintomático con adrenalina de manera urgente. Los alimentos causan alrededor de un tercio de las reacciones anafilácticas, con tasas más altas en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Los alimentos más comúnmente asociados con estas reacciones son el cacahuete, los frutos de cáscara, los mariscos y las frutas frescas (Turner et al., 2017; Zubeldia et al., 2012).

Las reacciones alérgicas no mediadas por IgE suelen manifestarse con síntomas gastrointestinales como enteropatías, con o sin mala absorción, colitis y lesiones de la mucosa intestinal (Molinas et al., 2004).

2.2.2. Diagnóstico

El diagnóstico de la alergia alimentaria puede llevarse a cabo mediante diversas estrategias, que se exponen brevemente a continuación:

➤ Historia Clínica

La información recopilada debe ser lo más completa posible e incluir el tipo y duración de los síntomas, el tiempo entre la ingesta del alimento sospechoso y la aparición de esos síntomas y la cantidad de alimento ingerido, entre otros.

Ante la sospecha de una reacción alérgica, deberá descartarse la posibilidad de que se trate de reacciones anafilácticas o pseudoalérgicas provocadas por la ingesta de alimentos como el cacao, los quesos o los pescados, que pueden contener grandes cantidades de aminas biógenas, como histamina o tiramina, o bien de reacciones inducidas por aditivos alimentarios o por defectos enzimáticos o metabólicos.

➤ Pruebas Cutáneas

La realización de pruebas cutáneas intraepidérmicas con alérgenos alimentarios o extractos de alimentos constituye el segundo paso en el diagnóstico y existen dos variantes. La prueba de prick test, en la que se deposita, generalmente en el antebrazo, una gota del extracto que se desea analizar y posteriormente se pincha con una lanceta y la prueba prick-prick, que consiste en realizar una punción en el alimento fresco y con la misma lanceta realizar después la punción en el paciente. La lectura de los resultados se realiza a los 15 min y se manifiesta por la aparición de una pápula. En este campo, se ha

indicado que la caracterización molecular de los principales alérgenos alimentarios y la producción de alérgenos recombinantes permitiría obtener reactivos de alta calidad y estabilidad para utilizar en este tipo de pruebas.

➤ Determinación de IgE específicas

La determinación de anticuerpos IgE específicos para alérgenos alimentarios en el suero sanguíneo mediante la prueba RAST (Radio Allergo Sorbent Test) suele ser empleada como complementaria de las pruebas cutáneas, o como alternativa a las mismas. El análisis consiste en añadir el suero del paciente en un pocillo que contiene el alérgeno inmovilizado, tras el lavado del pocillo, se incuba con un anticuerpo anti-IgE marcado con un fluorocromo y se realiza una lectura de la fluorescencia, que es indicativa de la sensibilización del paciente. La utilización de una curva de calibración estándar permite estimar los resultados en unas unidades estandarizadas de concentración de IgE (kU/L). Esta prueba, se usa particularmente en lactantes y niños menores de 3 años, cuando existan lesiones cutáneas extensas, hipo o hiperreactividad de la piel o cuando es necesario continuar con una medicación antihistamínica. En niños sanos, es posible documentar respuestas transitorias de IgE para proteínas alimentarias habituales, pero los niveles de anticuerpos son generalmente muy bajos. Por otra parte, hay que considerar que concentraciones altas de IgE, suelen ser comunes en niños atópicos sensibilizados tempranamente, incluso en ocasiones antes de que el alimento haya sido introducido formalmente en la dieta (sensibilización intra útero, por amamantamiento, o por inhalación durante la cocción). En la **Tabla 2** se muestra la clasificación de la prueba RAST con los niveles de IgE correspondientes.

Tabla 2. Clasificación de las pruebas RAST

IgE específica (kU/L)	Nivel	Clase (RAST)	Opciones
< 0,10	Ausencia / indetectable	0	Considerar otras causas además de la enfermedad alérgica
0,10 – 0,34	Muy bajo	0 / 1	Considerar diferentes tratamientos: -Eliminación de la ingesta -Farmacoterapia
0,35-0,70	Bajo	1	
0,71 – 3,50	Moderado	2	
3,51 – 17,5	Alto	3	
17,6 – 50	Muy alto	4	
51 – 100	Muy alto	5	
> 100	Muy alto	6	

En los últimos años se ha desarrollado y comercializado una prueba diagnóstica multiplex que permite determinar de forma simultánea anticuerpos IgE específicos frente a más de un centenar de proteínas alérgicas presentes en más de 50 alimentos diferentes. La ventaja más importante de esta prueba es que presenta una mayor probabilidad de determinar los diferentes alérgenos responsables de la clínica del paciente, lo que permite establecer un tratamiento más específico y adaptado a cada paciente

➤ Pruebas de Provocación

El método más fiable para confirmar una reacción alérgica a un alimento consiste en la ingesta controlada y enmascarada del alimento bajo supervisión médica tras un periodo de evitación. El método más universalmente aceptado es el de la provocación oral a doble ciego controlada con placebo (PCDBFC), que consiste en una dieta de eliminación de 15 días, seguida por una provocación abierta en la que, si reaparecen los síntomas con el alérgeno en cuestión y no aparecen tras la ingesta del placebo, se confirma la existencia de la alergia a ese alimento. (Molinas et al., 2004)

2.2.3. Prevención y tratamiento

La forma más eficaz de prevenir una alergia alimentaria, es evitar la ingestión del alimento sensibilizante, mediante una dieta de eliminación estricta. Se ha comprobado que las dietas de eliminación conducen a la pérdida de reactividad a muchos alimentos (desarrollo de tolerancia clínica), después de uno o dos años, en alrededor de un tercio de los niños y adultos con alergia alimentaria mediada por IgE.

Un aspecto primordial a considerar en estos casos es que hay que evitar los problemas nutricionales que puede conllevar el déficit de ciertos nutrientes. Para ello, es recomendable la administración de suplementos o la incorporación de alimentos sustitutivos.

En los últimos años, se han desarrollado diversas alternativas para el manejo de las alergias alimentarias, una terapia que ha mostrado ser efectiva es la desensibilización oral mediante inmunoterapia oral o sublingual, que consiste en la administración del alimento causante de la alergia en pautas más o menos rápidas, con dosis progresivamente crecientes. Estas terapias han permitido desarrollar tolerancia, y disminuir la tasa de IgE específica (Meglio et al., 2004). Las tasas de éxito de estas terapias varían entre el 70-80% de los casos en las alergias a leche y huevo. Por otro lado, también se está investigando el potencial terapéutico del uso de proteínas tratadas térmicamente para la inmunoterapia oral, pues en algunos casos mejora la inducción de la tolerancia. Sin embargo, los efectos del calor sobre la alergenicidad dependen mucho del alimento y por tanto, esta forma no sería aplicable a todos los alérgenos alimentarios (Vazquez-Ortiz y Turner, 2016).

La utilización de la inmunoterapia convencional frente a pólenes ha resultado eficaz en el tratamiento de algunas alergias alimentarias que están asociadas a ellos por reactividad cruzada, como es el caso de la inmunoterapia con extracto de polen de abedul para la alergia a manzana (Asero, 1998).

La administración de vacunas de péptidos superpuestos (de 10 a 20 aminoácidos de longitud) que conforman la secuencia completa de una proteína específica, también ha mostrado ser capaz de inducir la inhibición de la unión de IgE en algunas alergias alimentarias. Los anticuerpos monoclonales humanizados anti-IgE, administrados por inyección subcutánea, son capaces de unirse a la IgE circulante, bloqueando su fijación a los receptores específicos de alta afinidad de las células efectoras (mastocitos y basófilos), por lo que reducen las respuestas alérgicas causadas por alimentos (Cálix, 2007; Casale,

2001). Este tratamiento está indicado en pacientes con alergias alimentarias graves y/o múltiples que deben seguir dietas muy restrictivas ya que aumenta el umbral de tolerancia y mejora la seguridad reduciendo los efectos adversos (Nwaru et al., 2014).

Respecto al tratamiento sintomático, una vez desarrollada la reacción alérgica, se debe administrar uno o varios fármacos (adrenalina, antihistamínicos, corticoides y/o broncodilatadores) según la sintomatología y la gravedad del cuadro clínico (Wüthrich, 2000)

2.3. Alérgenos alimentarios

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles con un tamaño comprendido entre 10 y 70 kDa. La mayoría son estables al calor, a los ácidos y a las proteasas digestivas.

Un alimento puede contener varias proteínas alergénicas. Estas proteínas pueden ser alérgenos mayores o menores, considerados así según sean, respectivamente, alérgenos a los cuales responde inmunitariamente más del 50% de los pacientes sensibilizados al alimento en cuestión o alérgenos a los que sólo responden menos del 50% de los pacientes. Algunos alérgenos son característicos de un alimento particular, otros pueden ser compartidos con especies de la misma o próxima familia y otros también pueden estar presentes incluso en familias alejadas filogénicamente. Estos últimos suelen corresponder a proteínas con una función similar (profilinas, seroalbúminas, etc.) (Koppelman y Hefle, 2006).

Se han identificado más de doscientos alimentos alergénicos, pero ocho de ellos, conocidos como “Big 8”, representan más del 90% de las reacciones alérgicas a los alimentos. Éstos incluyen la leche, los huevos, el pescado, los mariscos, los frutos de cáscara, el cacahuete, el trigo y la soja (Messina y Venter, 2020).

En algunas ocasiones se producen fenómenos de reactividad cruzada entre proteínas que no tienen una relación taxonómica directa, pero que son reconocidas por un mismo tipo de IgE (Aalberse, 2000), como es el caso de los denominados síndromes polen-frutas, látex-frutas o ácaros-marisco (Blanco, 2003; Vieths et al., 2002).

La nomenclatura sistemática de los alérgenos alimentarios adoptada por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (World Health Organization and International Union of Immunological Societies, WHO/IUIS) y publicada en el Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en

1986 indica que los alérgenos se nombran utilizando las tres primeras letras del género al que pertenecen, seguidas, tras un espacio, de una o dos letras indicativas de la especie y, finalmente, de un número que señala el orden cronológico de identificación y caracterización del alérgeno (Chapman et al., 2007). Como ejemplo, las proteínas alergénicas del melocotón (*Prunus persica*) se designan como Pru p o las de la manzana (*Malus domestica*) se nombran como Mal d.

2.3.1. Legislación y etiquetado

Para garantizar la seguridad de los consumidores alérgicos resulta imprescindible indicar en el etiquetado de los alimentos todos los ingredientes potencialmente alergénicos. En la normativa europea vigente de etiquetado de alimentos, el Reglamento (UE) nº 1169/2011, se exige indicar en la lista de ingredientes de forma resaltada aquellos alimentos que pueden producir alergias o intolerancias alimentarias. Los alimentos incluidos en esa lista quedan recogidos en el Anexo II de dicha normativa y se muestran en el **Anexo I** y en la **Figura 3**.

La lista es examinada periódicamente por las comisiones pertinentes teniendo en cuenta las aportaciones científicas que se van incorporando y, en caso de que se considere necesario, se actualiza incluyendo otros alimentos alergénicos.

Por otra parte, existe la posibilidad de que algún alimento contenga una pequeña cantidad de un ingrediente alergénico del anexo II y no esté incluido en la etiqueta, debido a la presencia de los denominados “alérgenos ocultos”, que resultan de una contaminación cruzada durante el proceso de elaboración. Para estas situaciones, se puede utilizar lo que se conoce como etiquetado preventivo o precautorio del tipo “puede contener”, y así informar al consumidor de la posible presencia de ingredientes alergénicos no añadidos intencionadamente en un alimento. Este etiquetado no está todavía regulado formalmente en la UE, por lo que se está usando en muchas ocasiones de forma indiscriminada. Esto tiene sus consecuencias, ya que disminuye la opción de alimentos para los alérgicos y, además, está perdiendo su credibilidad, lo que puede inducir a conductas de riesgo por parte de estos consumidores. Por ello, este tipo de etiquetado sólo debería utilizarse si, debido a las características del proceso de fabricación, y tras haber realizado una correcta evaluación cuantitativa del riesgo, no se puede garantizar la ausencia de los componentes alergénicos (Taylor et al., 2018).



Figura 3. Símbolos utilizados para los alimentos de declaración obligatoria de alérgenos del Reglamento (UE) nº 1169/2011.

2.4. Alergia a las frutas

Las frutas constituyen la causa más frecuente de alergia a los alimentos en España, suponiendo un 44,7% del total de las mismas, según datos del informe “Alergológica 2015” de la SEAIC. Este porcentaje supone un incremento del 11,4% con respecto al año 2005. Entre las frutas causantes de alergias, las de la familia de las rosáceas, en la que se incluyen manzana, melocotón, albaricoque, cereza, ciruela, pera, nectarina, fresa, frambuesa y mora, entre otras, representan el 59,4% de las alergias inducidas por frutas y el 25,7% de todas las reacciones a alimentos según dicho estudio. Sin embargo, a pesar de estos datos, las frutas no están incluidas actualmente en la lista de etiquetado obligatorio del Reglamento (UE) nº 1169/2011.

La alergia a las frutas se desencadena por una reacción de hipersensibilidad inmediata de tipo I mediada por IgE (Fernández-Rivas, 2003). Las principales formas clínicas de presentación de las reacciones alérgicas a las frutas son, de mayor a menor frecuencia, el SAO, las reacciones cutáneas y digestivas y el shock anafiláctico (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), 2015).

2.4.1. Proteínas alergénicas de las frutas

Los alérgenos de las frutas se encuentran en la mayoría de los tejidos vegetales desempeñando funciones biológicas esenciales. Además, suelen ser panalérgenos, pues se extienden en todo el reino vegetal y se han conservado a lo largo de la evolución. La sensibilización a estos panalérgenos explica la importante reactividad cruzada entre vegetales, así como las asociaciones con alergia a pólenes y látex (Fernández-Rivas, 2003).

En la base de datos Allergen Nomenclature (www.allergen.org) de la WHO/IUIS se recoge una amplia variedad de frutas que pueden causar reacciones alérgicas, así como las proteínas alergénicas presentes en cada una de ellas-

Las proteínas alergénicas de las frutas se clasifican principalmente en cuatro familias: profilinas, proteínas relacionadas con la patogénesis PR-10 (Pathogenesis-Related proteins, PR), proteínas similares a la taumatina (Thaumatococcus-like Proteins, TLP, PR-5) y proteínas de transferencia de lípidos inespecíficas (non-specific Lipid Transfer Proteins, ns-LTP, PR-14) (Wang et al., 2019). Las proteínas PR son proteínas de defensa con actividad antimicrobiana que protegen a la planta alterando la pared celular de bacterias y hongos (Liu y Ekramoddoullah, 2006).

Las profilinas son proteínas de unión a actina que generalmente se encuentran en todos los organismos eucariotas. Son importantes en el control del crecimiento de los microfilamentos de actina del citoesqueleto, ayudando a mantener la estructura y facilitando el movimiento de las plantas (Hussey et al., 2006). Estas proteínas son responsables de muchas reacciones cruzadas entre el polen y las frutas. Se inactivan fácilmente con los tratamientos térmicos y la digestión, de forma que sólo causan síntomas leves a nivel de la orofaringe (SAO) (Wang et al., 2019).

Las proteínas PR-10 son proteínas intracelulares relacionadas con la patogénesis con homología con proteínas presentes en el polen de algunos árboles (Wen et al., 1997). Generalmente, son termolábiles y se desnaturalizan con los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización. Presentan una alta homología con la proteína Bet v 1 del abedul y producen síntomas localizados (SAO) (Wang et al., 2019).

Las proteínas similares a la taumatina (TLP) son proteínas PR relacionadas con la defensa, resistentes a las proteasas, el pH y la desnaturalización inducida por procesado térmico. Su potencial alergénico se debe en gran parte a sus propiedades fisicoquímicas, semejantes a las de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), aunque, a diferencia de ellas, se encuentran en mayor concentración en la pulpa de las frutas respecto a la piel (Bartra, 2015).

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) son proteínas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Son capaces de unir y transferir lípidos entre membranas y participan en el sistema de defensa de las plantas y en el mantenimiento de la pared hidrofóbica celular (Vanga et al., 2018).

En la **Tabla 3** se incluyen los patrones de sensibilización de alérgenos alimentarios vegetales pertenecientes a estas familias en pacientes con alergia a las frutas de la familia Rosaceae de diferentes áreas geográficas europeas.

Tabla 3. Patrones de sensibilización de alérgenos alimentarios vegetales (Salcedo et al., 2007).

Sensibilización (%) a:					
Fruta	Nº de pacientes	País	LTPs	PR-10	Profilinas
Melocotón	76	España	62	7	34
Cereza	121	Suiza y Alemania	11	96	18
	22	España	91	5	9
Manzana	99	Países Bajos	1	70	13
	94	Austria	2	84	11
	99	España	47	16	41

2.4.2. Proteínas alergénicas del melocotón y de la manzana

En el melocotón y la manzana se han identificado cinco y cuatro proteínas alergénicas respectivamente, pertenecientes a las familias anteriormente descritas, homólogas entre las frutas. En la **Tabla 4** se muestra la relación de proteínas alergénicas del melocotón y la manzana reconocidas por la IUIS.

Tabla 4. Proteínas alergénicas del melocotón y de la manzana “WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page,”).

Proteína	Peso molecular	Tipo
Pru p 1 / Mal d 1	17 KDa	PR-10
Pru p 2 / Mal d 2	25-28 KDa	Taumatina
Pru p 3 / Mal d 3	9 KDa	LTP
Pru p 4 / Mal d 4	14-17 kDa	Profilina
Pru p 7	7 kDa	Giberelina

Las proteínas Pru p 1 y Mal d 1 de la familia de las proteínas PR-10, de peso molecular 17 kDa, son unos de los alérgenos mayores de estas frutas y los principales en la alergia asociada al polen, por su alta homología con la Bet v 1 del polen del abedul. Dos proteínas más están involucradas en el síndrome abedul: las proteínas Pru p 2 y Mal d 2 de la familia de las taumatinas, de 28 kDa, con actividad antifúngica, y las proteínas de la familia de las profilinas Pru p 4 y Mal d 4, de 14 kDa, que presentan homología de secuencia con la proteína Bet v 2 del polen de abedul. Otras proteínas alergénicas del melocotón y la manzana son las ya mencionadas Pru p 3 y Mal d 3, respectivamente, de la familia de proteínas de transferencia de lípidos inespecíficas, en las que se ha centrado el trabajo de esta memoria y serán abordadas en un apartado específico (Vanga et al., 2018).

En el norte y centro de Europa, las alergias a las manzanas y los melocotones se asocian con frecuencia a la polinosis del abedul debido a la reactividad cruzada entre las proteínas Bet v 1 y Mal d 1 o Pru p 1, sin embargo, en el sur de Europa la alergia está causada principalmente por las proteínas Prup 3 y Mal d 3 (Hassan y Venkatesh, 2015). Hasta un 70% de los pacientes con alergia a ese polen manifiesta una alergia a alimentos vegetales asociada a frutas como la manzana (Zubeldia et al., 2012). En esta población, la manzana es la rosácea que más reacciones induce: el 47% en Suecia y el 53% en el norte de Italia (Fernández-Rivas, 2003). La sintomatología es leve y afecta casi exclusivamente a la zona orofaríngea debido a que estos alérgenos se degradan rápidamente por acción de enzimas digestivas, por lo que no dan lugar a manifestaciones sistémicas (Babiano Fernández y Mur Gimeno, 2016; Ortolani et al., 1999; Rodríguez-Perez et al., 2003; Vanga et al., 2018).

2.4.3. Familia LTP

La denominación de esta familia de proteínas deriva de su potencial en estudios realizados “in vitro” para unir y transferir lípidos entre membranas. Sin embargo, su principal función no está relacionada con esta propiedad, sino con la de participar en mecanismos de defensa en las plantas frente a la acción de bacterias y hongos patógenos.

Las proteínas de la familia LTP son muy ubicuas ya que están presentes en numerosas plantas. En la mayoría de los casos son proteínas extracelulares que forman parte del tejido epidérmico asociado a las paredes celulares, lo que explica la mayor potencia alergénica que tiene la piel en comparación con la pulpa de las frutas de la familia de las rosáceas (Borges et al., 2006).

Las proteínas alergénicas de esta familia se encuentran en numerosos vegetales incluyendo frutas, verduras, frutos secos, cereales y también el látex y algunos pólenes. Estas proteínas presentan con la proteína Pru p 3 del melocotón una homología de secuencia entre el 45 y el 92%. Esta alta homología explica la alta reacción cruzada que existe entre las proteínas de diversos vegetales pertenecientes a esta familia, así como con el polen de árboles de los géneros *Artemisia* y *Platanus*. En la **Figura 4** se muestra la reacción cruzada entre diversas proteínas de la familia LTP tomando como referencia la Pru p 3 del melocotón (Aalberse, 2000; EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2014; Larocca et al., 2013; Pasquato et al., 2006).

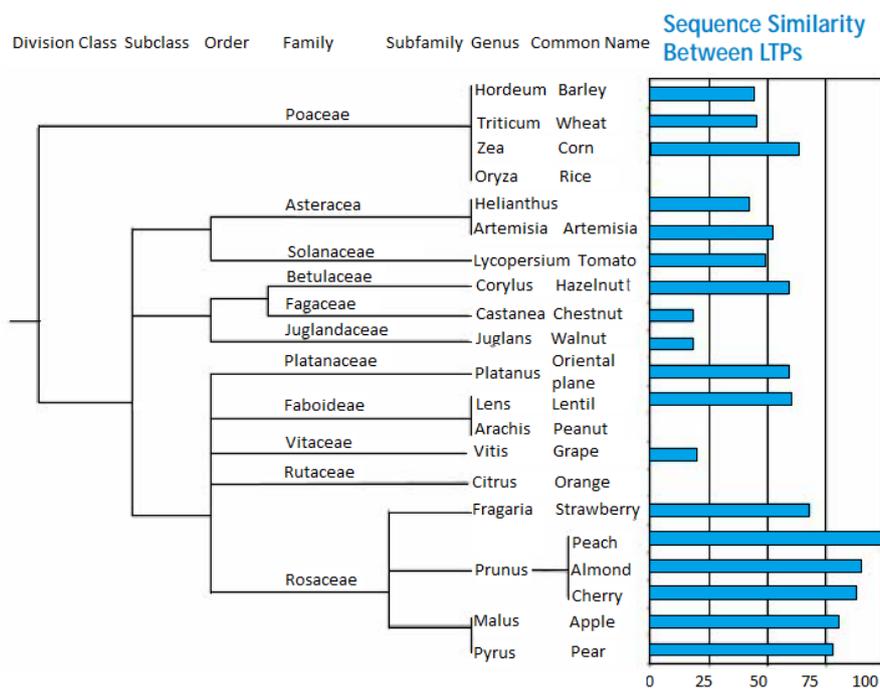


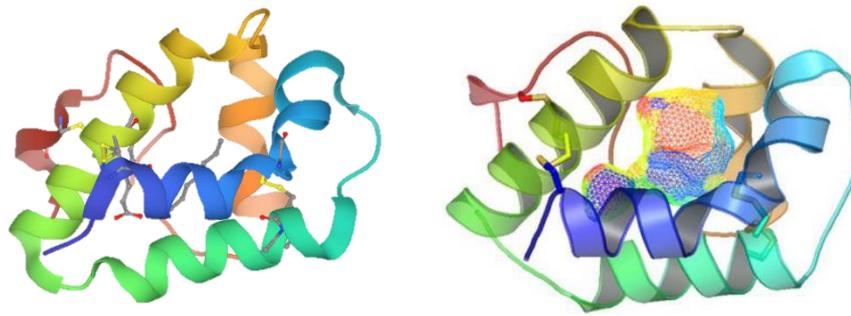
Figura 4. Similitud de secuencia entre proteínas de la familia LTP de varias fuentes con respecto a la Pru p 3 del melocotón (García y Lizaso, 2011).

Las proteínas de la familia LTP son consideradas como verdaderos alérgenos dada su alta resistencia a la proteólisis, así como su capacidad para inducir sensibilización por vía oral y producir una sintomatología grave y sistémica. Además de su resistencia frente a las proteasas, las proteínas LTP muestran una elevada resistencia frente a los tratamientos térmicos ya que mantienen su alergenicidad tras tratamientos a temperaturas de hasta 100-120 °C. Estas características hacen que las proteínas LTP mantengan su capacidad alergénica en alimentos vegetales procesados (Brenna et al., 2000) y además del SAO, puedan inducir reacciones sistémicas con síntomas graves y potencialmente mortales al producir reacciones anafilácticas (Vanga et al., 2018). Respecto a la distribución

geográfica, estas proteínas presentan tasas de sensibilización mayores al 50% en individuos alérgicos a muchos vegetales, entre ellos el melocotón, en el sur de Europa, pero menores a un 15% en el centro y norte de Europa (Salcedo et al., 2008; Yeats y Rose, 2008).

Las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 son las proteínas más alergénicas del melocotón y de la manzana en los países del sur de Europa. En España, más del 40% de los individuos alérgicos al melocotón o a la manzana tienen IgE frente a dichas proteínas. Su alta prevalencia ha hecho que hayan sido objeto de numerosos estudios en los ámbitos de la bioquímica y la inmunología y a nivel de estudios clínicos, por lo que son probablemente las proteínas de la familia LTP mejor caracterizadas (Fernández-Rivas et al., 2003; Salcedo et al., 2008, 2007; van Ree et al., 2015). Desde el aislamiento de la proteína Pru p 3 en el año 1999 por Pastorello et al. (1999), se ha demostrado su relevancia clínica, se ha codificado su DNA y se ha expresado en *Pichia pastoris* (Díaz-Perales et al., 2002). Además, se han desarrollado métodos inmunoquímicos para su cuantificación, en los que se han detectado concentraciones de entre 5,5 y 41,1 µg/g del peso fresco de la fruta entera, siendo la concentración en la piel del orden de unas 250 veces mayor que en la pulpa de la fruta (Duffort et al., 2002).

Tienen un peso molecular de 9 kDa y un punto isoelectrico básico y como se puede observar en la **Figura 5**, ambas presentan una estructura muy similar debido a su alto grado de homología de secuencia y a los residuos de cisteína conservados, compartiendo la Mal d 3 una identidad de secuencia del 81,3% con la Pru p 3 (Alessandri et al., 2012). El motivo estructural principal está representado por un dominio compacto en α -hélice con cuatro hélices que incluyen 57 de los 90 aminoácidos de la proteína y también presentan ocho residuos de cisteína formando cuatro puentes disulfuro, que las hacen altamente resistentes al calor, a la acidez y a la proteólisis (Costa et al., 2022; Sinha et al., 2014). Además, estas proteínas contienen un bolsillo hidrofóbico que muestra una alta afinidad para unir ligandos lipídicos (Pasquato et al., 2006; “Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, RCSB PDB,” 2011; Salcedo et al., 2008).



Model of Pru p 3 (RCSB PDB) Model of Mal d 3 (UniProt Q9M5X7)

Figura 5. Modelo estructural de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3.

Utilizando diferentes técnicas analíticas, se han identificado los determinantes antigénicos o epítomos de la Pru p 3 que interactúan con las IgE del suero de los individuos, que son coincidentes en la Mal d 3 debido a su alta homología de secuencia y estructural (Gao et al., 2005). Esta interacción parece estar determinada por reacciones iónicas entre las IgE y residuos básicos localizados en las posiciones 11-25, 31-45, y 71-80 de la proteína (Carvalho y Gomes, 2007).

2.4.4. Factores que influyen en la alergenicidad de las frutas

Los factores que influyen en la alergenicidad de las frutas son numerosos, e incluyen fundamentalmente los genéticos y agronómicos, así como el grado de madurez en el momento de recolección de la fruta y, además, las condiciones postcosecha, como el tiempo, temperatura y atmósfera en el almacenamiento.

El contenido de alérgenos de la fruta varía de una especie a otra, así como entre diferentes variedades de una misma especie. Pagliarani et al., (2009) investigaron mediante PCR en tiempo real, los niveles transcripcionales de los genes de las proteínas alergénicas de la manzana en las variedades ‘Gala’ y ‘Florina’. Mal d 1 y Mal d 2 fueron los genes mayoritariamente expresados en la piel y pulpa de la manzana, respectivamente, y la variedad ‘Florina’ mostró niveles más altos de expresión que la variedad ‘Gala’ para todos los alérgenos. Vlieg-Boerstra et al., (2011) determinaron la alergenicidad de 68 variedades de manzana mediante prick test y pruebas de provocación oral en pacientes alérgicos a manzana, y observaron que la variedad ‘Golden Delicious’ presentaba una mayor alergenicidad. Esta variedad, también fue una de las variedades de manzana estudiada por Borges et al., (2006) con un mayor contenido en LTP en la piel, aunque como se puede mostrar en la **Tabla 5**, las variedades ‘Chanteclerc’ y ‘Granny Smith’ presentaron una mayor concentración y las variedades ‘Bertanne’ y ‘Reinette Canada’

fueron aquellas que presentaron una menor concentración. Además, en este estudio analizaron el contenido de LTP en albaricoque, melocotón, ciruela amarilla y ciruela roja.

Respecto al contenido de Pru p 3 en piel y en pulpa, se ha demostrado que la piel de melocotón tiene un mayor contenido. Carnes et al., (2002) estudiaron dos variedades de melocotón, 'Miraflores' y 'Springcrest', y observaron que la piel contenía aproximadamente siete veces más Pru p 3 que la pulpa. Asimismo, Larocca et al., (2013) estudiaron las variedades de melocotón 'Gladys', 'California', 'Plusplus' y 'Red Fair', y comprobaron como el contenido de Pru p 3 en la piel era mucho mayor, de hasta 10 veces mayor, que en la pulpa. La variedad que mostró una mayor concentración en piel fue 'Red Fair', con $19,3 \pm 1,3$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) frente a la variedad con menor concentración, 'California', con $15,8 \pm 1,1$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$). Este contenido de Pru p 3 en piel mayor que en pulpa también se da en su proteína homóloga, la Mal d 3, donde Borges et al., (2006) mostraron en nueve variedades de manzana que el contenido en Mal d 3 era mayor en la piel, con diferencias marcadas en algunas variedades como 'Granny Smith', que presentó en la piel una concentración de $17,3 \mu\text{g}/\text{g}$ frente a $0,5 \mu\text{g}/\text{g}$ en la pulpa.

Por otro lado, existen variedades con un contenido en LTP mucho menor al normal. El estudio realizado por Botton et al., (2006) demostró que la variedad 'Rita Star' se caracteriza por niveles muy bajos de LTP y presenta unos niveles de proteína Pru p 3 en la piel durante la maduración comercial tan bajos que no se observa la banda de 9 kDa perteneciente a la Pru p 3 ni por electroforesis ni por inmunoblottig, por lo que podría considerarse una variedad de melocotón hipoalergénica.

Tabla 5. Contenido de LTP ($\mu\text{g/g}$) en la piel y la pulpa de las frutas. (Borges et al., 2006).

Fruta	Contenido LTP en piel ($\mu\text{g/g}$)	Contenido LTP en pulpa ($\mu\text{g/g}$)	Ratio piel/pulpa
(M) Royal Gala	3,3	1,2	2,8
(M) Bertanne	2,0	0,6	3,3
(M) Pink Lady	7,9	1,1	7,1
(M) Granny Smith	17,3	0,5	34,6
(M) Chanteclerc	12,4	1,2	10,3
(M) Golden Delicious	12,0	0,9	13,3
(M) Fuji	9,0	1,1	8,2
(M) Red Chief	3,4	1,8	1,9
(M) Reinette Canada	2,0	0,5	4,0
Albaricoque	1,8	1,6	1,1
Melocotón	8,4	3,4	2,5
Ciruela amarilla	1,5	1,7	0,9
Ciruela roja	1,5	1,7	0,9

(M): manzana

Los factores agronómicos también influyen de manera importante sobre la alergenicidad de las frutas. Botton et al., (2009b) evaluaron el efecto de la intensidad de la luz, la elevación del cultivo, el almacenamiento y el estrés hídrico en la expresión de los genes de alérgenos de la manzana. Matthes y Schmitz-Eiberger (2009) estudiaron la influencia de la localización del cultivo en distintas zonas de algunos países y del método de cultivo (producción orgánica o integrada) en las variedades ‘Jonagold’ y ‘Topaz’. Estos autores observaron que la fruta de producción orgánica mostraba un menor contenido de Mal d 1 que la fruta de producción integrada, lo que se atribuye en parte a que en estos cultivos no se usan productos fitosanitarios como los fungicidas. Sin embargo, Sancho et al., (2006b, 2006a) estudiaron en manzana la influencia del uso de fungicidas y observaron que no afecta al contenido de proteínas alergénicas.

El nivel de radiación solar que reciben las frutas en el árbol también influye en el nivel de proteínas alergénicas. En estudios realizados en melocotón, se ha determinado la concentración de los genes correspondientes a las proteínas Pru p 1, Pru p 2, Pru p 3 y

Pru p 4 mediante la técnica de PCR en tiempo real. Las variedades estudiadas fueron ‘Zaochunhon’ (Ma et al., 2018) y ‘Stark Red Gold’ (Botton et al., 2009a). Los resultados de ambos estudios mostraron que el contenido en proteínas alergénicas se incrementaba con la cantidad de irradiación solar recibida por la fruta. En el caso de la manzana, el efecto de la irradiación solar se ha determinado midiendo la cantidad de Mal d 3 mediante las técnicas de ELISA y Western-blotting utilizando anticuerpos monoclonales (Sancho et al., 2006b) o mediante la técnica de la PCR para las proteínas Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 y Mal d 4 (Botton et al., 2009b). En estos trabajos se indica que, en las frutas localizadas en las zonas sombrías del árbol, las proteínas alergénicas se expresan en una menor proporción en la piel (36%) y en una mayor proporción en la pulpa (78%).

Otro factor agronómico que afecta al contenido de alérgenos de la fruta es el riego, cuya importancia es crucial dado el cambio climático que está experimentando nuestro planeta, con menos precipitaciones y por tanto menos reservas de agua. Botton et al., (2009b) estudiaron las proteínas alergénicas en manzanas de la variedad Golden Delicious de árboles mal irrigados y regados regularmente. Los niveles de expresión de genes que codifican alérgenos de manzana se determinaron mediante PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que a pesar del menor tamaño de las manzanas (diámetro de 10 mm más pequeño), el efecto del estrés hídrico sobre la expresión de proteínas alergénicas fue muy limitado, ya que solo la Mal d 4 redujo sus niveles en un 64% en las frutas a las que se le había privado de riego.

Se han llevado a cabo también diversos estudios para determinar el efecto del grado de madurez de la fruta en la concentración de proteínas alergénicas. En el estudio de Pagliarani et al., (2009) se mostró que todas las proteínas alergénicas incrementaban notablemente su concentración durante el desarrollo de la planta (de junio a septiembre) en las variedades ‘Florina’ y ‘Gala’. Sancho et al., (2006b) llevaron a cabo un estudio en diferentes variedades de manzana en el que observaron que la concentración de proteína Mal d 3 aumentaba en frutas con el grado de madurez. Resultados similares se han observado también para las proteínas Mal d 1 y Mal d 2 (Schmitz-Eiberger y Matthes, 2011; Szamos et al., 2011).

Estudios análogos se han llevado a cabo también en muestras de melocotón de la variedad ‘Fantasía’ en las que se han determinado los alérgenos Pru p 1, Pru p 2, Pru p 3 y Pru p 4, mediante PCR (Botton et al., 2009a). En estos estudios se ha observado que el contenido en proteínas alergénicas se ve incrementado a medida que se retrasa el tiempo

de recolección. Sin embargo, en el estudio realizado por Schmitz-Eiberger y Matthes, (2011) no se encontraron diferencias en los tres tiempos de recolección estudiados.

Otro aspecto importante a considerar es cómo influyen el tiempo, la temperatura y la composición de la atmósfera durante la conservación postcosecha en la alergenicidad de las frutas. Sancho et al., (2006a, 2006b) evaluaron la capacidad alergénica de las manzanas almacenadas a temperatura ambiente, en refrigeración a 2 °C y en atmósfera controlada (AC) a 3,8 °C durante 5 meses, en distintas variedades de manzana en las que determinaron los niveles de Mal d 1 y Mal d 3. Botton et al., (2009b) evaluaron los alérgenos en manzanas ‘Golden Delicious’ almacenadas durante 5 meses en atmósfera controlada a 1,2 °C. Matthes y Schmitz-Eiberger (2009) estudiaron el efecto del tiempo de almacenamiento (4, 8 y 12 semanas) en refrigeración a 2 °C sobre Mal d 1 en las variedades ‘Jonagold’ y ‘Golden Delicious’. Schmitz-Eiberger y Matthes (2011) realizaron un estudio con manzanas conservadas a 2 °C durante 8 y 12 semanas, más un periodo de simulación de la comercialización a temperatura ambiente (20 °C) durante dos semanas, para asemejar las condiciones a las del momento del consumo. En estas investigaciones se observó que la concentración de la proteína Mal d 1 aumentaba con el tiempo de almacenamiento, mientras que la de Mal d 3 disminuía en todas las variedades, y en mayor grado cuando se utilizaba AC durante la conservación. Además, el lavado de la fruta tras la recolección también puede influir en el contenido de LTP, como estudiaron Borges et al. (2006) en el melocotón, donde su contenido se reducía de 8,4 µg/g a 5,2 µg/g tras el lavado.

Por último, el embolsado de la fruta permite una maduración más homogénea y uniforme, que al estar mejor repartida en la rama crece y se desarrolla mejor, protegiendo al fruto de las inclemencias del tiempo y los parásitos e insectos. Ahrazem et al. (2007) realizaron en cuatro cultivares de melocotón, ‘Calante’, ‘Evaisa’, ‘Jesca’ y ‘Rincal’, una comparación del nivel de Pru p 1 y Pru p 3 en frutas sin embolsar y embolsadas recolectadas del mismo árbol, sin obtener diferencias entre ellas.

2.5. Elaboración de zumo de frutas

El proceso de elaboración de zumos consta de cuatro etapas fundamentales que se muestran en la **Figura 6**, y finaliza con un almacenamiento y envío al mercado donde será comercializado.



Figura 6. Etapas del proceso de elaboración de zumos de frutas.

La calidad y preparación de la materia prima es fundamental ya que influye en las propiedades del producto final. Los factores que influyen en esta etapa son la variedad utilizada, las condiciones de cultivo, la madurez del fruto que no siempre coincidirá con la madurez óptima para el consumo de la fruta en fresco, las condiciones del transporte a la fábrica, realizado de manera que no dañe la fruta y la limpieza de la fruta tras su recepción en la fábrica. Si se desea eliminar la piel antes de la extracción, se puede realizar un tratamiento con vapor o por inmersión o pulverización con hipoclorito sódico a una temperatura de 99 °C durante 15 o 20 segundos, seguido de un aclarado con agua (Barrett et al., 2004).

La etapa de extracción es un proceso físico que consiste en romper las paredes celulares del fruto para expulsar el líquido contenido en ellas mediante un prensado. Para reducir el tiempo de prensado y obtener un mayor rendimiento, se recomienda realizar un tratamiento enzimático de la masa triturada, utilizando enzimas pectolíticas para degradar las sustancias pécticas de la masa de la fruta. Esta degradación no se aplica cuando se quiere obtener un zumo opaco o un néctar, en el que se pretende conservar el contenido original de sustancias pécticas.

La etapa de tratamientos del zumo, consiste en aplicar una serie de operaciones para lograr estabilizar el producto y conseguir una vida útil prolongada manteniendo sus características naturales. Estos tratamientos se reducen a dos operaciones fundamentales: estabilización y tratamientos térmicos. La estabilización, denominada también clarificación, incluye las operaciones de tamizado, decantación, filtración y despectinización, que se aplican para eliminar los sólidos que no deben acompañar al

zumo y asegurarle una estabilidad suficiente. Los tratamientos térmicos tienen como finalidad inactivar los enzimas propios del zumo y la destrucción de la flora bacteriana. El zumo bruto contiene productos solubles e insolubles que se mantienen estables por un gel de pectinas y proteínas, pero se encuentran en presencia de dos agentes perjudiciales, el oxígeno y las enzimas, lo que provocará cambios de color, pardeamiento y alteraciones del flavor y es por ello que debe protegerse de estos agentes para evitar dichos cambios.

El tamizado tiene como finalidad eliminar los sólidos producidos en la extracción como son los restos de piel, semillas, huesos, etc. A esta etapa, le sigue la clarificación que puede realizarse mediante dos operaciones, despectinización o encolado. La despectinización consiste en añadir enzimas pectolíticas (mezcla de pectinmetilesterasa y poligalacturonasa) y dejarlas actuar en un tanque durante varias horas a su pH óptimo ácido y temperatura óptima (50-55 °C). Tras la hidrólisis se obtienen ácidos poligalacturónicos y otros productos de degradación que se eliminarán por sedimentación o filtración. En los zumos que vayan a ser destinados a la obtención de concentrados deben eliminarse completamente las pectinas para evitar una excesiva turbidez y en casos extremos, la formación de jaleas. En algunas ocasiones, la clarificación puede realizarse mediante encolado, que consiste en añadir gelatina para eliminar los taninos.

Si se desea obtener zumos límpidos y claros, tras la clarificación, es necesaria la eliminación de partículas de fruta y los flóculos formados realizando para ello una filtración o una centrifugación.

Por último, para conseguir una buena conservación del zumo, hay que aplicar tratamientos térmicos que alarguen la vida útil sin modificar los atributos del producto. Estos tratamientos se agrupan en dos categorías según su finalidad. Por un lado, los tratamientos para inactivar las enzimas que producen los pardeamientos y otras reacciones y para ablandar la fruta triturada para obtener un mayor rendimiento en la extracción. Por otro lado, los tratamientos térmicos tienen como objetivo destruir los microorganismos presentes en el zumo para que este pueda conservarse durante un periodo prolongado, ya sea refrigerado o a temperatura ambiente. Dicho tratamiento debe ser capaz de reducir 5 ciclos logarítmicos el recuento del microorganismo patógeno más termorresistente con relevancia en la salud pública, alcanzando así un nivel que no suponga un riesgo para la salud en unas condiciones normales de almacenamiento. El tratamiento aplicado puede ser realizado utilizando diferentes combinaciones de

temperatura y tiempo. Normalmente, se pasteuriza con un sistema HTST (High Temperature Short Time), del orden de 77-95 °C durante un tiempo corto (15-30 segundos). En algunas ocasiones, se utilizan tratamientos más intensos, entre 92-105°C durante 1 minuto, dependiendo del momento de campaña y del pH que tenga el producto (Braddock, 1999; Graell et al., 2014; Renard y Maingonnat, 2012).

2.6. Aplicación de nuevas tecnologías en el procesado de las frutas

En los últimos 20 años, la demanda por parte del consumidor de productos más frescos y naturales ha conducido a que se hayan llevado a cabo numerosos trabajos para estudiar el efecto que tienen las nuevas tecnologías de conservación no térmicas en la higienización de estos productos y que incluyen las altas presiones hidrostáticas, los pulsos eléctricos de alto voltaje y los ultrasonidos, entre otros. Los resultados que se derivan de estos estudios muestran que estas tecnologías emergentes parecen tener el potencial de proporcionar zumos de frutas seguros desde un punto de vista sanitario con una vida útil prolongada y unas mejores propiedades nutritivas y sensoriales. Algunos de estas técnicas todavía están en la escala de investigación o piloto, mientras que otras ya se han comercializado.

Por otra parte, cabe destacar que algunas de estas nuevas tecnologías han sido también estudiadas en las últimas décadas por su potencial para conseguir una mejora de los procesos de extracción. El objetivo en estos casos es acelerar y/o aumentar su rendimiento, afectando lo menos posible a las propiedades nutritivas y sensoriales. Entre las tecnologías propuestas para conseguir este propósito, cabe destacar el calentamiento mediante microondas, los ultrasonidos, las altas presiones y los pulsos eléctricos de alto voltaje (Raso y Heinz, 2006; Saldaña et al., 2017).

2.6.1. Altas presiones hidrostáticas

Las altas presiones hidrostáticas constituyen una tecnología no térmica de higienización de alimentos en la que se usan elevadas presiones de entre 400 - 600 MPa durante un tiempo menor a 10 min para inactivar los microorganismos presentes (Balasubramaniam, 2021). La aplicación de esta tecnología en la higienización de alimentos se inició a finales del siglo XIX con los estudios de Hite et al., (1914) realizados en leche, frutas y verduras. Sin embargo, no fue hasta 1990 cuando salió al mercado en

Japón el primer alimento, una mermelada, tratado con altas presiones (Thakur y Nelson, 1998). Posteriormente, esta tecnología se ha aplicado en diversos países de América del Norte, Europa, Australia y Asia a otros productos comerciales, tales como zumos de frutas, productos cárnicos y lácteos, platos preparados etc. (Balasubramaniam et al., 2004).

Los principios que rigen el comportamiento de los alimentos sometidos a altas presiones son el principio de Le Chatelier-Braun y el principio isostático. El principio de Le Chatelier-Braun indica que cualquier fenómeno (tales como una transición de fase, un cambio en la configuración molecular, una reacción química, etc.) acompañado por una disminución del volumen es realizada por el aumento de la presión aplicada. El principio isostático significa que la transmisión de la presión aplicada en una muestra es uniforme e instantánea. Por lo tanto, el tiempo del proceso es independiente del tamaño y la forma de la muestra (Balasubramaniam, 2021).

Las altas presiones producen la inactivación de las células vegetativas de las bacterias, los mohos y las levaduras. Sin embargo, los esporos bacterianos son muy resistentes a la presión (Georget et al., 2015).

Los mecanismos de inactivación de los microorganismos por efecto de los tratamientos con altas presiones han sido objeto de numerosos estudios. Estos tratamientos pueden actuar de forma simultánea sobre diversos componentes celulares, tales como el DNA, los ribosomas y RNA, y diversas proteínas y enzimas. Se han sugerido varias hipótesis acerca de cuál es el mecanismo último implicado en la muerte celular, pero ninguna de ellas es válida para todas las especies microbianas estudiadas y todos los estados fisiológicos (Balasubramaniam et al., 2016).

La tecnología de altas presiones ha mostrado ser adecuada para cumplir el requisito de la FDA para los zumos de frutas sin modificar las propiedades organolépticas y nutritivas de la fruta (EFSA Panel on Biological Hazards et al., 2022).

En las **Tablas 6 y 7** se muestran los niveles de inactivación bacteriana de algunas especies microbianas vegetativas y los atributos de calidad obtenidos en el tratamiento de zumos de frutas con altas presiones. Como se puede observar, estas bacterias son eficazmente inactivadas con tratamientos de intensidad y duración que podríamos calificar como medios.

Tabla 6. Inactivación de microorganismos en productos a base de frutas por efecto de las nuevas tecnologías de conservación (Vasantha Rupasinghe y Juan, 2012).

ALIMENTO	MICROORGANISMO	TRATAMIENTO	REDUC. LOG.
ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS			
Zumo de manzana	<i>Escherichia coli</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Salmonella</i>	545 MPa/1 min	5
PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE			
Zumo de manzana	<i>Escherichia coli</i> 8739 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	30kV/cm, 172 μ s, <35 °C	5
ULTRASONIDOS			
Sidra	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	20 kHz, 150 W, 18 min, 118 W/cm ² , 57 °C	6

Tabla 7. Efecto de los tratamientos con nuevas tecnologías de conservación en los atributos de calidad de los productos a base de frutas (Vasantha Rupasinghe y Juan, 2012).

ALIMENTO	CAMBIOS DE CALIDAD	TRATAMIENTO
ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS		
Zumo de arándanos	Aumento del contenido total de compuestos fenólicos y antocianinas. Sin cambios en pH, °Brix y color. Disminución de la capacidad antioxidante	400-600 MPa/15 min
PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE		
Zumo de manzana	Sin cambios en color y vitamina C	35 kV/cm, 94 μ s
ULTRASONIDOS		
Sidra	Sin cambios en acidez, pH y °Brix	20 kHz, 750 W, 4 min, 0,46 W/mL, 60°C

2.6.2. Pulsos eléctricos de alto voltaje

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (1-80 kV/cm) y corta duración (μ s) a un material colocado entre dos electrodos. Las ondas aplicadas pueden ser fundamentalmente de dos tipos, de caída exponencial o de onda cuadrada. Esta tecnología se está investigando desde los años 60 para su aplicación en el campo alimentario. El investigador pionero fue Doevenspeck, quien generó una patente que describió los equipos y métodos para el procesado de salchichas (Barbosa-Cánovas, 1999).

Esta tecnología ha mostrado ser eficiente para la inactivación de mohos, levaduras y bacterias en diversos tipos de alimentos. Los PEAV se han usado también para la inactivación de enzimas que afectan a la calidad de diferentes alimentos, así como tecnología auxiliar en procesos de extracción.

Los tratamientos de PEAV producen fenómenos de electroporación de las membranas celulares. Ello da lugar a la permeabilización de las membranas, lo que constituye la base de su aplicación en la industria alimentaria, ya que permite mejorar tanto los procesos de extracción, deshidratación y obtención de compuestos del interior celular, como la inactivación microbiana, logrando así la pasteurización de los alimentos. Los tratamientos que hay que aplicar para un caso u otro y a pesar de que la tecnología sea la misma son muy diferentes y dependen de los parámetros de procesado que se hayan fijado, así como del tamaño de las células que sea preciso permeabilizar. Así, para la permeabilización de células eucariotas, es suficiente con aplicar una intensidad de campo eléctrico superior a 1 kV/cm e inferior a 10 kV/cm, mientras que, para procariotas, es necesaria la aplicación de tratamientos superiores a 16 kV/cm.

En el ámbito de los zumos de frutas, algunos de los resultados más relevantes en la mejora de extracción mediante PEAV, solos o en combinación con otras tecnologías, se han visto en la extracción de zumo de zanahoria, manzana, uva, remolacha roja o leche de coco, con mejoras superiores al 20% de rendimiento y mayor concentración de compuestos activos (Saldaña et al., 2017; Vasantha Rupasinghe y Juan, 2012). Los estudios en procesos de preextracción de zumos de frutas muestran que las mejoras de rendimiento que se consiguen con esta tecnología permitirían eliminar el uso de tratamientos térmicos o enzimáticos previos a la extracción o reducir la presión aplicada, alcanzando mejores rendimientos a un coste muy bajo, del orden de 0,5 a 1 €/t.

Desde hace más de una década, la tecnología de los PEAV se ha aplicado en la higienización de zumos de frutas consiguiendo reducir de forma eficiente la carga microbiana y extender su conservación, sin afectar a sus atributos sensoriales (**Tablas 6 y 7**).

En los últimos años, han aparecido en el mercado zumos de frutas procesados por PEAV. El tratamiento prolonga el tiempo de conservación en refrigeración de los zumos hasta tres semanas garantizando un producto sanitariamente seguro y con unas propiedades sensoriales y nutritivas similares a las de un zumo recién obtenido.

2.6.3. Ultrasonidos

La tecnología de los ultrasonidos consiste en la aplicación de ondas de frecuencias del orden de 20 a 100 kHz e intensidad entre 10 y 100 W/cm². Al atravesar un medio líquido, los ultrasonidos generan ciclos alternativos de compresión y expansión y, como consecuencia, la aparición de burbujas de gas en la masa del líquido (cavitación). En sucesivos ciclos, las burbujas crecen, alcanzan un tamaño crítico y al superarlo, implosionan. Al chocar entre sí las moléculas del líquido, como consecuencia del colapso, se producen ondas de presión que se transmiten por el medio inactivando a las bacterias (O'Donnell et al., 2010; Vanga et al., 2017).

La aplicación de los ultrasonidos en la inactivación microbiana de diferentes zumos de frutas ha sido objeto de diversos estudios (**Tabla 6**). Para cumplir con los requerimientos de la FDA, esta tecnología debe combinarse con la aplicación de calor (termosonicación) o presión (manosonicación) o ambas (manotermosonicación). Así, la aplicación de tratamientos de termosonicación en zumos de frutas ha mostrado ser efectivo para inactivar los microorganismos y enzimas, produciendo una menor pérdida de ácido ascórbico, componentes fenólicos y flavonoides (Abdullah y Chin, 2014).

Por otra parte, los ultrasonidos pueden facilitar el proceso de extracción de los zumos mediante el incremento de la superficie de transferencia de masa y la mejora de la penetración en las membranas celulares, provocadas por el fenómeno de cavitación (Ordóñez-Santos et al., 2015).

2.6.4. Tratamientos enzimáticos

A mediados de la década de 1930 cuando comenzó a desarrollarse la industria de obtención de zumos de frutas, el rendimiento en la extracción era muy bajo debido a la dificultad en los procesos de filtración y clarificación. Esta dificultad en el procesado se solucionó en gran medida con la utilización de enzimas, fundamentalmente pectinasas, celulasas, hemicelulasas y amilasas, enzimas que se conocen en conjunto en esta industria como enzimas de maceración. El uso de estas enzimas mejora considerablemente el rendimiento y el proceso de clarificación de un amplio rango de zumos tales como el de manzana, pera, naranja y melocotón.

El prensado mecánico de las frutas ricas en pectina da lugar a un producto de elevada viscosidad en el que es difícil obtener el jugo. Ello es debido a que la presión ejercida en los tejidos produce un jugo que se mantiene unido a la pulpa mediante las pectinas contenidas en esta, formando una masa gelatinosa. La adición de pectinasas solventa notablemente este problema mejorando el rendimiento en la extracción, debido a que al degradar las pectinas, disminuyen su capacidad de retención de agua y, por lo tanto, mejoran la liberación del jugo de la pulpa y proporcionan un jugo más clarificado (Kumar, 2015).

La adición de celulasas y hemicelulasas también facilitan la extracción, ya que, al degradar componentes de la pared celular y pectinas solubles, disminuyen la viscosidad del jugo obtenido. La utilización de amilasas en la elaboración de zumos de frutas comenzó a utilizarse hacia 1970 cuando esta industria experimentó un gran auge de ventas. La gran demanda de frutas hizo que estas fueran recolectadas en un bajo grado de madurez y almacenadas durante tiempos relativamente largos para conseguir un stock suficiente de materia prima. En esas circunstancias, el contenido en almidón de la pulpa de la fruta es relativamente alto en comparación con el fruto maduro, y ello conlleva un incremento en la turbidez e incluso una gelatinización del almidón durante el procesado, dificultando la extracción. Por ello, la adición de amilasas, especialmente glucoamilasa es una práctica extendida en el sector de elaboración de zumos de frutas (Schilling et al., 2007).

Otros enzimas que pueden usarse en la industria de los zumos de frutas, fundamentalmente de cítricos, son la limoneno-deshidrogenasa y la naringinasa, para degradar el limoneno y la naringina presentes en esas frutas, respectivamente, y que son responsables de un elevado amargor en el producto final. También puede usarse el enzima

lacasa para degradar componentes fenólicos que producen un excesivo oscurecimiento en los zumos (Lorente et al., 2011). Así mismo, en algunos estudios se ha indicado que la adición de proteasas disminuye considerablemente la turbidez de los zumos de cereza recién obtenidos, aunque tiene un bajo efecto durante el posterior almacenamiento (Kumar, 2015; Pinelo et al., 2010).

2.7. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la desnaturalización y alergenicidad de las frutas

Las tecnologías de procesado podrían tener un impacto significativo en el potencial alergénico de los alimentos. El procesado puede inducir en las proteínas diferentes efectos como desnaturalización, agregación, hidrólisis o entrecruzamiento con otros componentes, y estos cambios pueden alterar la unión de las IgE a ciertas proteínas alergénicas. Debido a estas modificaciones, el procesado puede destruir los epítomos existentes o generar otros nuevos (formación de neoalérgenos). Esto significa que el procesado puede influir en la alergenicidad de manera positiva, negativa o no tener ningún efecto (Jiménez-Saiz et al., 2015). Dada la alta prevalencia de la alergia a las frutas, los investigadores han buscado activamente tecnologías de procesado que puedan reducir su alergenicidad.

Los tratamientos térmicos se utilizan comúnmente en la industria alimentaria para la conservación y prolongación de la vida útil de los alimentos. Se ha demostrado que el tratamiento con zumo de melocotón a 121 °C durante 30 min no disminuye la reactividad de Pru p 3 con IgE de pacientes alérgicos al melocotón (Brenna et al., 2000). Sin embargo, Lavilla et al. (2016) observaron que el tratamiento del extracto de melocotón a 100 °C durante 15 min indujo una inhibición de alrededor del 25 % de unión con las IgE. Mediante dicroísmo circular (CD) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), Gaier et al., (2008) observaron que la proteína Pru p 3 se desnaturalizaba y no podía replegarse después de un tratamiento a 95 °C en condiciones neutras, pero sí volvía a adoptar su conformación nativa después de tratarla a pH 3, que son las condiciones generalmente aplicadas en zumos de melocotón, néctares, mermeladas, etc. A su vez, Sancho et al. (2005) estudiaron el efecto del tratamiento térmico en la Mal d 3 observando que el calentamiento a 90 °C durante 20 min no era efectivo para alterar la estructura de la proteína; sin embargo, el tratamiento a 100 °C durante 2 h provocó una disminución de la reactividad con las IgE.

En las últimas décadas, con el desarrollo de tecnologías de procesado no térmico, los investigadores han realizado estudios para conocer el impacto de estos tratamientos en las proteínas alergénicas con el objetivo de producir alimentos hipoalergénicos (Chizoba Ekezie et al., 2018; Paschke, 2009).

Estos tratamientos podrían también inducir una serie de cambios estructurales (reversibles o irreversibles) en las proteínas alergénicas que podrían modificar su alergenicidad (Chizoba Ekezie et al., 2018; Huang et al., 2014).

Garino et al., (2012) observaron que el tratamiento secuencial de microondas y ultrasonidos no parece tener efecto en la reactividad de las IgE con la Pru p 3. El efecto del tratamiento de las altas presiones en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 ha sido estudiado por Lavilla et al. (2016), quienes observaron que el tratamiento no era efectivo para producir una disminución de la alergenicidad e incluso la mayoría de los tratamientos aplicados aumentaban la inmunorreactividad de las proteínas con las IgE del suero de alérgicos a melocotón. Estudios llevados a cabo en proteínas alergénicas de manzana. Meyer-Pittroff et al. (2007) han indicado que el tratamiento de láminas de manzana con altas presiones en el rango de 100 a 600 MPa resulta en una reducción considerable de la unión de la proteína Mal d 1 a las IgE. Este hecho se ha atribuido a los cambios producidos en la estructura secundaria de la proteína, como determinaron por técnicas de espectroscopía. Sin embargo, en los estudios realizados por diversos autores (Fernández et al., 2009; Houska et al., 2009; Husband et al., 2011; Johnson et al., 2010) utilizando técnicas de inmunoensayo con anticuerpos de conejo y con sueros humanos de alérgicos a manzana se ha observado que las proteínas Mal d 1 y Mal d 3 muestran una alta resistencia a la desnaturalización por la presión, pero son susceptibles si se aplica un tratamiento combinado de presión y temperatura. Además, estos autores observaron que el medio de tratamiento influye notablemente en la barorresistencia de la Mal d 3, siendo más sensible cuando es tratada en tampón que en el extracto de fruta, lo que se ha relacionado con el efecto protector que ejercen las pectinas. En cuanto al tratamiento con PEAV, Johnson et al. (2010) estudiaron el efecto que tiene el tratamiento de 0 a 35 kV/cm en la proteína Mal d 3 y no observaron cambios en la estructura de la proteína determinada mediante la técnica de difracción circular, pero sí observaron una disminución en su inmunorreactividad al enfrentar las muestras tratadas con antisueros de conejo mediante una técnica de ELISA.

El tratamiento que ha resultado ser eficaz en la disminución de la alergenicidad es la degradación de las proteínas alergénicas con proteasas. Esta tecnología es la que se utiliza

en la elaboración de las fórmulas infantiles hipoalergénicas a base de proteínas lácteas, que son bien toleradas por los niños alérgicos a la leche de vaca (Maryniak et al., 2022).

A este respecto, las proteínas de la familia LTP de las frutas se caracterizan por presentar una alta resistencia a la degradación por las proteasas digestivas. Hasta la fecha, hay pocas publicaciones sobre el efecto de la proteólisis en las LTP. Concretamente, se ha estudiado el efecto del tratamiento enzimático de néctar y zumo de melocotón en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 utilizando proteasas fúngicas de *Aspergillus* y *Rhizopus* (Brenna et al., 2000), que no han mostrado ser eficientes a la hora de disminuir la reactividad de la proteína con las IgE de los individuos alérgicos a melocotón.

En estudios llevados a cabo con Pru p 3 mediante la técnica de digestión simulada, se ha observado que más del 75% de la proteína permanece intacta. La proteína resiste la acción de la pepsina mientras es degradada por la tripsina y la quimotripsina a péptidos de diferentes tamaños, manteniendo los que tienen un tamaño entre 5-8 kDa la capacidad de reaccionar con las IgE del suero de alérgicos, mientras que los menores de 1 kDa han perdido dicha propiedad (Cavatorta et al., 2010; Wijesinha-Bettoni et al., 2010). Así mismo, resultados similares se han indicado en un estudio de digestión simulada de LTP de uva, en el que los hidrolizados obtenidos no disminuyeron el potencial alérgico de la proteína determinado mediante las técnicas de prick test en pacientes alérgicos a la uva e inmunoblotting con los sueros de dichos pacientes (Vassilopoulou et al., 2006).

Hasta la fecha, el tratamiento que ha resultado ser efectivo para disminuir la alergenicidad de la proteína Pru p 3 es la combinación de una etapa de pelado químico de la fruta con hipoclorito sódico y una etapa de ultrafiltración a través de membranas de punto de corte de 10 kDa al final del procesado (Brenna et al., 2000). No obstante, estas condiciones de filtración no podrían ser usadas a nivel industrial dadas las características de viscosidad del zumo de melocotón.

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de frutas

Las muestras de melocotón de la variedad ‘amarillo tardío’ clon Calante fueron proporcionadas por el grupo de Tecnología Postcosecha de la Universidad de Zaragoza.

Las manzanas de las variedades ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Verde Doncella’ y ‘Red Story’, se recogieron en parcelas pertenecientes a la empresa Agrícola Gil S. L. (La Almunia de Doña Godina, Zaragoza). Las manzanas se recolectaron de cinco árboles seleccionados al azar, y de cada árbol se recogieron entre 10 y 15 manzanas de diferentes zonas para cada ensayo. Este procedimiento se realizó con cada variedad para cada grado de madurez y tiempo de conservación. Los grados de madurez fueron el de madurez comercial, que corresponde al considerado óptimo para la venta, así como una semana antes y después de esa fecha. Los tiempos de conservación fueron de 1, 3, 5 y 7 meses en una cámara de atmósfera controlada (AC), *Ultra Low Oxygen* (ULO, 1-1,5% de oxígeno) a una temperatura entre 0 y 1 °C en la Cooperativa COSANSE (La Almunia de Doña Godina). Para realizar los análisis de cada ensayo, las manzanas se separaron al azar en 3 lotes de 15 manzanas cada uno, para obtener tres muestras independientes.

El resto de las muestras de frutas (nectarina, paraguay, albaricoque, pera, ciruela, fresa, uva, piña, kiwi, tomate, naranja y cereza) se adquirieron en establecimientos locales.

3.2. Pacientes alérgicos a LTP y sueros sanguíneos

Los individuos incluidos en este estudio fueron reclutados por personal sanitario del Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza. Los individuos tenían que cumplir los siguientes requisitos: haber presentado síntomas tras la ingestión de melocotón o manzana, ser positivos a la prueba cutánea frente a un extracto de melocotón comercial que mayoritariamente presenta Pru p 3 (ALK-Abelló S.A., Madrid, España). Después, se determinó en el laboratorio el nivel de IgE específica frente a Pru p 3 o Mal d 3 y este debía ser superior a 0,35 KU/L para considerarse positivo (ImmunoCAP FEIA system, Thermo Fisher Scientific). Para la realización de las pruebas de prick test y la obtención de los sueros se contó con la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) de los siguientes proyectos, “Estudio del efecto de los tratamientos tecnológicos en la alergenidad de las proteínas del melocotón”. (Referencia CP-CI PI15/0323); “Estudio unicéntrico transversal para

determinar el efecto de los tratamientos tecnológicos en la alergenicidad de las proteínas del melocotón”. (Referencia CP-CI PI17/0351) y “Estudio unicéntrico transversal del efecto de los tratamientos tecnológicos en las proteínas alergénicas de las frutas” (Referencia CP-CI PI20/584).

En el estudio de Pru p 3, se reclutaron 22 pacientes alérgicos con niveles de IgE específica a Pru p 3 superiores a 0,35 KU/L. Los sueros se dividieron en tres pools diferentes en función de la sintomatología de los pacientes: un pool de sueros de cinco pacientes que presentaron sintomatología de Síndrome de Alergia Oral (SAO), un pool de sueros de siete pacientes que presentaron sintomatología de Shock Anafiláctico (SA) y un pool de sueros de diez pacientes que presentaron al menos Uno de estos Cuatro Síntomas, urticaria, angioedema, asma o dolor abdominal, en un brote agudo (UCS).

En el estudio de Mal d 3, se reclutaron catorce pacientes alérgicos, pero solo seis presentaron un nivel de IgE específica frente a LTP superior a 0,35 KU/L por lo que se usaron en los ensayos de forma individual.

Todos los pacientes rellenaron un cuestionario en el que indicaron el género, la edad, si habían padecido alergia a alimentos, pólenes, epitelio de animales u hongos, los años que llevaban padeciendo esas alergias, la clínica, si se les había administrado adrenalina y los cofactores que presentaban. Esta información se recoge en los **Anexos II y III**.

3.3. Materiales

La proteasa de *Rhizopus* spp, la proteasa de páncreas bovino, la tripsina, la proteinasa K, la pronasa, la quimiotripsina, la alcalasa, la papaína, la bromelaína, la ficina, la quimosina y la pepsina fueron suministradas por Sigma-Aldrich (Poole, Reino Unido). Las proteasas ácidas 1 y 2 obtenidas de la misma fuente fueron donadas por diferentes empresas, cuyo nombre comercial se omite por motivos de confidencialidad. Los cuajos procedían de Laboratorios Arroyo S.A. (Cantabria, España). Los adyuvantes de Freund completo e incompleto, la agarosa, el gel SP-Sepharose, la ovoalbúmina, el timerosal, el conjugado de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa y el sustrato de la fosfatasa alcalina que contiene p-nitrofenil fosfato (pNPP) fueron también adquiridos de Sigma. El test del ácido bicinónico (BCA) y el estabilizador del conjugado de la peroxidasa eran de Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, polyvinylidene fluoride) de 0,45 µm de tamaño de poro, el sustrato 4-cloro-1-naftol y el peróxido de hidrógeno (30% p/v) se obtuvieron de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania). El sustrato de la peroxidasa que contenía tetrametilbencidina

(TMB) procedía de ZEULAB (Zaragoza, España). Los kits para la conjugación de los anticuerpos con peroxidasa (Lightning-Link™ HRP) y con fosfatasa alcalina (Alkaline phosphatase Conjugation Kit - Lightning-Link®) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Las placas de ELISA F96 Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca). Las hojas de nitrocelulosa Trans Blot Transfer Medium, la acrilamida y los geles comerciales del 4-20% de poliacrilamida fueron suministrados por Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.), el marcador de pesos moleculares por Pharmacia Biotech (Upsala, Suecia), las membranas de diálisis por Medicell (Londres, Reino Unido) y los discos de ultrafiltración por Amicon (Beverly, MA, EE.UU.). Los tubos ImmunoCAP tapizados con Pru p 3 (f420) o Mal d 3 (f435), el conjugado anti-IgE marcado con un compuesto fluorescente, los estándares de IgE, así como todas las soluciones necesarias para los ensayos con los sueros humanos y el equipo Phadia 100 fueron donados por Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).

El resto de productos utilizados no señalados específicamente fueron reactivos de grado analítico obtenidos de diversas fuentes.

3.4. Métodos

3.4.1. Preparación de extractos de frutas

Las muestras de la piel de las frutas se homogeneizaron en un ultraturrax. Para ello, se pesaron 10 g de las correspondientes muestras y se añadieron 20 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 5,6, que contenía la sal sódica del ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA), 2 mM, sodio dietilditiocarbamato trihidrato (DIECA) 10 mM, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% y azida sódica 3 mM. La mezcla se mantuvo en agitación durante 2 h a 4 °C y después se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 30 min. En algunos casos, los sobrenadantes se dializaron frente a tampón fosfato sódico 10 mM, pH 5,6, y todos se conservaron en congelación a -18°C hasta su uso o se dializaron

3.4.2. Purificación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3

Las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 se han purificado a partir de extractos de piel de melocotón y manzana, respectivamente, mediante técnicas cromatográficas y de ultrafiltración como se describe a continuación.

Los extractos de la piel de las frutas se incubaron con gel SP-Sepharose en una relación 12/1 (v/v) en batch durante una hora y media y, posteriormente, el gel se lavó con el

tampón fosfato utilizando un embudo de vidrio sinterizado hasta que la absorbancia del filtrado fue menor a 0,02. Después, el gel se montó en una columna (25 x 3 cm) y las proteínas retenidas se eluyeron utilizando el tampón fosfato que contenía NaCl 1 M. El flujo se mantuvo a 0,3 mL/min recogiendo fracciones de 2 mL. Las fracciones del eluido se juntaron y se sometieron a una etapa de ultrafiltración utilizando una membrana de punto de corte de 30 kDa, recogiendo el permeado que se concentró después con una membrana de punto de corte de 3 kDa.

3.4.3. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteína de los extractos de piel de frutas se realizó utilizando la técnica de Bradford como se describe a continuación.

El reactivo de Bradford se preparó mezclando 100 mg de Azul de Coomassie G-250 con 50 mL de metanol al 95%, 100 mL de ácido fosfórico al 85% y 850 mL de agua destilada. Los estándares de albúmina sérica bovina (BSA) para elaborar la recta patrón, se prepararon a concentraciones de entre 6 y 100 µg/mL. Posteriormente, el ensayo se realizó añadiendo 60 µL de los estándares o las muestras por duplicado en pocillos de microplaca de 96 pocillos y 240 µL del reactivo de Bradford. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después se determinó la absorbancia de los pocillos en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia) a 595 nm.

La concentración de proteína de las muestras se determinó interpolando los valores de absorbancia en la recta patrón.

3.4.4. Técnica de SDS-PAGE

En esta técnica se usaron geles comerciales y geles preparados en el laboratorio.

3.4.4.1. Preparación de geles

Los geles de electroforesis del 20% de poliacrilamida se prepararon en dos etapas. En la primera, se preparó el gel separador y para ello, se añadió entre dos placas, previamente selladas con agarosa al 1,5% en agua destilada., un volumen de 10 mL de una solución de acrilamida al 20% en tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 conteniendo 5 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 50 µL de persulfato amónico (APS) al 10% en agua Milli-Q. Después, la superficie se cubrió con 300 µL de 2 metil-2 butanol y se dejó en reposo durante 1 hora para permitir la polimerización de la acrilamida. Tras eliminar el 2

metil-2 butanol, en la segunda etapa, se preparó el gel concentrador compuesto por acrilamida a una concentración 3-4% menor que la del gel separador en tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, conteniendo 5 µl de TEMED y 25 µl de APS al 10%. Finalmente, se colocó el peine de electroforesis para marcar los pocillos y se dejó gelificar durante una hora.

3.4.4.2. SDS-PAGE

Las electroforesis en los geles de poliacrilamida (PAGE) se realizaron en presencia de docecil sulfato sódico (SDS) y en condiciones reductoras con mercaptoetanol, siguiendo el método de Laemmli (1970). Las muestras con una concentración baja de proteína se concentraron hasta 1-2 mg/mL utilizando dispositivos de ultrafiltración centrífuga de tamaño de poro de 3,5 kDa. Las muestras se diluyeron 1/1 (v/v) con tampón Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, conteniendo glicerol al 20%, SDS al 4%, β-mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0,02%, y se mantuvieron en un baño a 100 °C durante 5 min. Las cubetas de electroforesis se llenaron con tampón Tris 250 mM, glicina 1,92 M, pH 8,3, que contenía 1% SDS. Las electroforesis se realizaron en un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.) a un voltaje constante de 180 V hasta que el frente llegó al final del gel.

3.4.4.3. Tinción de los geles

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de proteínas se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie R. Esta solución colorante contiene 0,65 g de Azul de Coomassie R, 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua destilada. Los geles se cubrieron totalmente con el colorante y se mantuvieron en agitación durante una hora.

Después, se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante para aclarar los geles. El decolorante se preparó con 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Los geles permanecieron en la mezcla de decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína.

En algunos casos, se realizó una tinción adicional con plata por su mayor sensibilidad. Para ello, tras la tinción de Coomasie, el gel se incubó durante 30 min en una solución que contenía 35 mL de etanol, 7 mL de ácido acético y 28 mL de agua Milli-Q. A continuación, el gel se incubó durante 15 min en una solución que contenía 7 mL de la solución anterior y 53 mL de agua Milli-Q y después, se lavó con agua Milli-Q tres veces durante 5 min cada una. Seguidamente, el gel se incubó durante 1 min en una solución

compuesta por 12 mg de tiosulfato de sodio y 60 mL de agua Milli-Q. Tras lavar el gel con agua Milli-Q tres veces durante 30 seg cada una, se incubó durante 20 min con una solución que contenía 0,12 g de nitrato de plata, 60 mL de agua Milli-Q y 45 μ L de formaldehído al 37 %. Se realizaron tres lavados de nuevo con agua Milli-Q durante 20 seg dos veces y después el gel se incubó durante 2-3 min con la solución de revelado que contenía 3,6 g de carbonato de sodio, 30 μ L de formaldehído al 37%, 58,8 mL de agua Milli-Q y 1,2 mL de la solución de tiosulfato de sodio. Seguidamente, el gel se incubó durante 10 min con una solución compuesta por 3 mL de ácido acético y 57 mL de agua Milli-Q y finalmente se incubó durante 10 min con 7 mL de glicerina y 53 mL de agua Milli-Q.

Tras cada tinción, el gel se escaneó utilizando el equipo Image Scanner III (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) y en algunos casos, se realizó la densitometría de las carreras con el programa Image master 2D.

3.4.5. Técnicas de espectrometría de masas

3.4.5.1. Análisis de identificación de proteínas mediante huella peptídica por la técnica de MALDI-TOF

Para identificar las proteínas purificadas, éstas se sometieron a una electroforesis y las bandas obtenidas se recortaron del gel, y se enviaron a la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, para realizar un análisis de identificación de proteínas mediante huella peptídica por la técnica MALDI-TOF.

Las proteínas seleccionadas para el análisis se redujeron en gel, se alquilaron y se digirieron con tripsina como describen Sechi y Chait (1998). Los análisis de MALDI-TOF se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF / TOF 4800 Plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canadá). El equipo funcionó en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20000 V. Todos los espectros de masas se calibraron internamente utilizando péptidos de la autodigestión de tripsina.

Para la identificación de proteínas, se usó la base de datos NCBIInr sin restricción de taxonomía (40910947 secuencias; 14639572021 residuos) utilizando MASCOT 2.3 (www.matrixscience.com) a través del software Global Protein Server v 3.6 (ABSciex). Los parámetros de búsqueda fueron: carbamidometil cisteína como modificación fija y metionina oxidada como modificación variable; tolerancia de masa de péptidos, 50 ppm

(PMF) - 80 ppm (MSMS o búsqueda combinada); un sitio de escisión de tripsina omitido; tolerancia a fragmentos MS-MS, 0,3 Da.

3.4.5.2. Determinación de masa de proteínas y péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF

Esta técnica se llevó a cabo para determinar el tamaño de los péptidos en las muestras de Pru p 3 y Mal d 3 tras el tratamiento con proteasas. El análisis de masa exacta se ha llevado a cabo en el Servicio de Proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF (4800 plus MALDITOF/TOF, Sciex).

Las muestras se trataron inicialmente con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente, se mezclaron con la matriz (una solución saturada de ácido sinapínico a una concentración de 10 mg/mL preparada en acetonitrilo al 50% conteniendo 0,1% de ácido trifluoroacético) y se depositaron por duplicado en una placa MALDI-Opti-Tof 384 (Sciex).

Los análisis se realizaron en modo lineal positivo con un voltaje de aceleración de 20 kV, un rango de masas de 1000-20000 Da, focus 9000, 1000 disparos/espectro y una intensidad de láser de 4800. El equipo se calibró con una mezcla de estándares de proteínas (Proteo Mass Protein MALDI-MS Calibration Kit MSCAL3, Sigma).

3.4.6. Métodos inmunoquímicos

3.4.6.1. Obtención de antisueros

Los antisueros policlonales frente a las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 purificadas se obtuvieron en conejo según el siguiente protocolo. A cada conejo se le inyectaron por vía subcutánea 0,4 mg de proteína disuelta en 0,5 mL de tampón fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, NaCl 0,14 mM, pH 7,4 (PBS), y emulsionados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Tras un mes, se repitió la misma inoculación, pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. A los 8-10 días de esta segunda inoculación se extrajeron 30 mL de sangre por punción en la vena marginal de la oreja utilizando una cánula de mariposa, y se inyectó subcutáneamente al animal la misma cantidad de suero fisiológico estéril. En las extracciones sucesivas los

animales tuvieron un tiempo de recuperación de 15 días, repitiéndose las inoculaciones cada 30 días.

La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente y se mantuvo en refrigeración durante toda la noche tras lo cual se centrifugó a 5000 g durante 15 min obteniéndose el suero sanguíneo. Los sueros se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Los procedimientos para la inmunización y obtención de antisueros han sido aprobados por el Comité Ético para animales de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza (Proyecto PI 30/19). El manejo y cuidado de los animales se realizará siguiendo las indicaciones del RD 1201/05 y de la Directiva UE 86/609 sobre protección animal.

3.4.6.2. Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto

En la **Figura 7** se muestra un esquema de las etapas de esta técnica, que se ha usado para realizar la titulación de los anticuerpos específicos en los antisueros policlonales obtenidos. Para ello, los pocillos se tapizaron con 120 µL/pocillo de la proteína Pru p 3 o Mal d 3 (6 µg/mL) en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4 °C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 µL/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 µL/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v), en PBS a temperatura ambiente durante 2 h, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas.

Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con agua destilada, se dejaron secar y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización. Antes del ensayo, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,5% de Tween-20 (PBST). Para el ensayo, las placas se incubaron con 100 µL/pocillo de diferentes diluciones del antisuero de conejo a 37 °C durante 1 h. Tras cinco lavados con PBST, se añadieron 100 µL/pocillo de una dilución adecuada de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa en PBS, se mantuvieron a 37 °C durante 1 h y se lavaron de nuevo cinco veces con PBST. Por último, se añadieron 100 µL/pocillo de una solución del sustrato comercial que contenía tetrametilbencidina, y tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2 M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia).

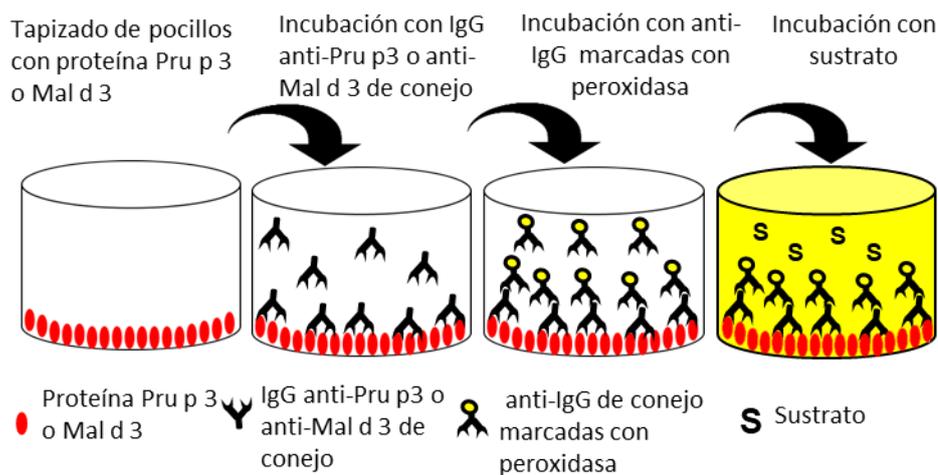


Figura 7. Esquema de la técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto para la titulación de los antisueros obtenidos en conejo frente a Pru p 3 y Mal d 3.

3.4.6.3. Técnica de Western-blotting

Esta técnica se llevó a cabo para determinar la reactividad de las muestras con los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un equipo de transferencia MilliBlot-SDE Transfer System (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Para ello, se recortaron 6 láminas de papel de filtro Whatmann 3MM y una membrana de PVDF de dimensiones similares al gel de electroforesis. Cada uno de los papeles de filtro permaneció sumergido en uno de los siguientes tampones: un papel en tampón Tris 0,3 M, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo I), dos papeles en tampón Tris 25 mM, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo II) y tres papeles en tampón Tris 25 mM, glicina 4 mM, 20% metanol, pH 9,4 (cátodo). La membrana de PVDF se humedeció en agua Milli-Q.

En el sistema de transferencia se colocaron encima de la unidad del ánodo y en este orden el papel de filtro del ánodo I, los del ánodo II, la membrana de PVDF, el gel de electroforesis y los papeles de filtro del cátodo. Después, se colocó la unidad del cátodo y la transferencia se realizó utilizando una intensidad de 2 mA/cm² durante 45 min. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se reveló añadiendo el sustrato de la peroxidasa que contenía 6 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 2 mL de metanol, 8 mL de SSF y 10 µL de H₂O₂ al 30%. Para detener la reacción enzimática, se lavó la membrana dos veces con agua Milli-Q.

3.4.6.4. Purificación y conjugación de anticuerpos

La purificación de los anticuerpos específicos frente a Pru p 3 o Mal d 3 se realizó utilizando columnas comerciales HiTrap NHS-Sepharose activated (1 mL) en las que se insolubilizó previamente la correspondiente proteína purificada. Para preparar el inmunoadsorbente, se pasaron por la columna cinco volúmenes de HCL 1 mM a un flujo de 1 mL/min con el fin de activar los grupos de unión a proteínas. A continuación, 1 mL de la solución de Pru p 3 o Mal d 3 (5 mg/mL) se recirculó a través de la columna. Para el bloqueo de los grupos activos que no habían reaccionado con la proteína, se aplicó una solución de etanolamina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3. Seguidamente, se lavó la columna con seis volúmenes de tampón acetato sódico 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4 y con un volumen de tampón glicina 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8. Para su conservación, la columna se lavó con 2 mL de PBS y se mantuvo a 4 °C.

Para la purificación de los anticuerpos específicos, la columna se equilibró con PBS que contenía 0,5 M de NaCl y el antisuero (10-20 mL) se aplicó a un flujo de 0,5 mL/min. A continuación, se lavó la columna con 10 volúmenes del mismo tampón a un flujo de 1 mL/min. Los anticuerpos específicos retenidos en la columna se eluyeron con tampón glicina 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8 y se recolectaron en fracciones de 1 mL en tubos en los que anteriormente se había añadido 225 µL de tampón Tris 0,5 M, pH 8 para neutralizar la acidez del tampón de elución. La absorbancia de las fracciones se midió a 280 nm y las de mayor absorbancia se recogieron conjuntamente, se dializaron frente a PBS y se almacenaron a -20 °C. Esta etapa de cromatografía de afinidad se llevó a cabo en un equipo ÄKTA Start, GE Healthcare (Fariway, Connecticut).

La conjugación de los anticuerpos específicos con los enzimas peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina se realizó utilizando kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos conjugados se guardaron en alícuotas de 100 µL a -20 °C.

3.4.6.5. Técnica de ELISA tipo sandwich

En la **Figura 8** se muestra un esquema de las etapas de esta técnica, que se ha usado para determinar la concentración de proteína inmunorreactiva (Pru p 3 o Mal d 3).

Los pocillos de las placas se tapizaron con 110 µL/pocillo de una solución de los anticuerpos purificados anti- Pru p 3 (1 µg/mL) o anti-Mal d 3 (10 µg/mL) en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH de 9,6 a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 300 µL/pocillo de agua destilada y se bloquearon con 300

μL /pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3 % (p/v) en PBS durante 2 h a temperatura ambiente, para saturar todos los puntos de unión de proteínas. Después, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y una vez con PBS que contenía timerosal al 0,05% (PBS), y tras dejarlos secar a temperatura ambiente, se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Antes de cada ensayo, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contenía 0,5% de Tween-20 (PBST). Posteriormente, los pocillos se incubaron con 100 μL /pocillo de las soluciones estándar de Pru p 3 o Mal d 3 o de las muestras problema diluidas en PBS que contenía sacarosa al 5%, albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% en el caso del ELISA de Pru p 3 y con PBS en el caso del ELISA de Mal d 3, ambos incubándose a 37 °C durante 1 h. Tras cinco lavados con PBST, se añadieron 100 μL /pocillo de una dilución 1/65.000 de anticuerpos anti-Pru p 3 marcados con peroxidasa diluidos en PBS con sacarosa al 5%, BSA al 0,1% o una dilución 1/1000 de anticuerpos anti-Mal d 3 marcados con fosfatasa alcalina diluidos en PBS y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Tras cinco lavados con PBST, se añadieron 100 μL /pocillo de la solución de sustrato comercial de la peroxidasa para el ELISA de la Pru p 3 o de la fosfatasa alcalina para el de Mal d 3 y tras 30 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de H_2SO_4 2 M para el ELISA de Pru p 3 ó 25 μL /pocillo de NaOH 2 N para el ELISA de Mal d 3. La absorbancia de los pocillos se midió en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia) a 450 nm para el ELISA de Pru p 3 y a 405 para el ELISA de Mal d 3.

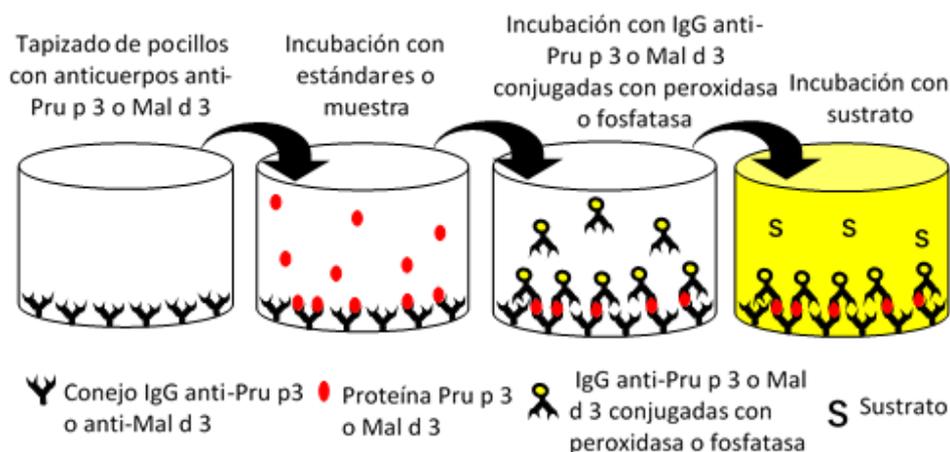


Figura 8. Esquema de la técnica de ELISA de tipo sandwich para la determinación de Pru p 3 o Mal d 3.

3.4.6.5.1. Preparación de estándares para las técnicas de ELISA sandwich

La concentración de las soluciones de proteína Pru p 3 y Mal d 3 purificadas se determinó mediante espectrofotometría usando un coeficiente de extinción de 0,345 a 280 nm para una concentración de 1 mg/mL. Los estándares de Pru p 3 se prepararon a la concentración final de su uso en PBS que contenía sacarosa al 5%, BSA al 0,1% y timerosal al 0,05%. Los estándares de Mal d 3 se prepararon en PBS que contenía BSA al 0,1% (p/v) y 0,05% de timerosal a una concentración cincuenta veces mayor a la usada en los ensayos. Antes de cada ensayo, estos estándares se diluyeron x 50 en PBS. Ambos estándares se guardaron en alícuotas que se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su uso.

3.4.6.5.2. Validación de los test ELISA sandwich

Los test ELISA desarrollados para la determinación de Pru p 3 y Mal d 3 se han validado siguiendo los procedimientos estandarizados establecidos en los protocolos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) (Abbott et al., 2010; AOAC INTERNATIONAL, 2016). A continuación, se definen los parámetros determinados en dicha validación.

La sensibilidad es el mínimo contenido de analito que un método es capaz de distinguir de una muestra sin analito (Límite de Detección, LD) y cuantificar (Límite de Cuantificación, LC) con un nivel de probabilidad específico. El cálculo se realizó con la media de los valores de diez réplicas del blanco de tampón más tres veces su desviación estándar (DS) para el LD y diez veces para el LC.

$$\begin{aligned}LC &= \bar{x}(\text{blanco}) + 3 \cdot DS \\LD &= \bar{x}(\text{blanco}) + 10 \cdot DS\end{aligned}$$

Para determinar la reactividad cruzada con otras frutas, se analizaron los extractos de nectarina, paraguayo, albaricoque, pera, ciruela, fresa, uva, piña, kiwi, naranja, cereza, manzana, melocotón y tomate.

Los parámetros de precisión (repetibilidad, reproducibilidad intra-ensayo e inter-ensayo) se han determinado a dos niveles de concentración de analito, que han sido zumo de piña adicionado con 0,02 % y 0,01 % de zumo de melocotón. Estos parámetros sólo se han determinado para el test ELISA de Pru p 3

La repetibilidad es el grado de concordancia entre los resultados de varias mediciones sucesivas bajo las mismas condiciones de medición (analista, instrumento, lugar y

período de tiempo). Para determinarla, se analizaron diez réplicas de la misma muestra a los dos niveles de analito.

$$RSD_r = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

La reproductibilidad es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes con el mismo método en condiciones de reproducibilidad. Para calcular la reproducibilidad intra-ensayo se analizaron diez muestras independientes por duplicado, a los dos niveles de analito. La reproducibilidad inter-ensayo se calculó analizando tres muestras en tres días diferentes, a los dos niveles de analito.

$$RSD_R = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

La robustez es la capacidad del método para no verse alterado por ligeras variaciones deliberadas en los factores que se han establecido previamente. Los parámetros ensayados se muestran en la **Tabla 8**. Para evaluar la robustez, se realizó una matriz de Youden (**Tabla 9**) con los parámetros que podrían tener una influencia en los resultados, modificándolos ligeramente de su valor establecido (Karageorgou y Samanidou, 2014).

Tabla 8. Parámetros ensayados para determinar la robustez

Parámetro	Valor del protocolo	Valor modificado
Temperatura de incubación todas las etapas	37 °C (A)	25 °C (a)
Volumen de todas las etapas	100 µL (B)	110 µL (b)
Tiempo de incubación de la muestra	1 h (C)	1 h y 10 min (c)
Tiempo de incubación del conjugado	1 h (D)	1 h y 10 min (d)
Tiempo de incubación del sustrato	1 h (E)	1 h y 10 min (e)
Número de lavados	5 (F)	4 (f)
Tiempo de lectura	30 min (G)	40 min (g)

Se considera un método robusto cuando el valor obtenido de SDi es menor a la desviación estándar inter-ensayo (Karageorgou and Samanidou, 2014).

Tabla 9. Combinaciones de los parámetros modificados según la matriz de Youden

Parámetro	Número de experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	A
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados	s	t	u	v	w	x	y	z

Tras la obtención de los resultados, se calculó la desviación de las diferencias de cada parámetro con la siguiente fórmula: $SDi = \sqrt{2} \cdot \Sigma(Dif)^2/7$

3.4.6.6. Técnica de inmunofluorescencia de tipo no competitivo o competitivo indirecto

El formato no competitivo con dispositivos ImmunoCAP tapizados con Pru p 3 o Mal d 3 se utilizó para determinar las IgE específicas presentes en los sueros o pools de sueros, siguiendo el protocolo del fabricante. En la **Figura 9** se muestra un esquema de las etapas de esta técnica. El formato competitivo se ha adaptado para ser usado en la determinación de los cambios en la inmunorreactividad de los extractos de frutas o de las proteínas purificadas sometidos a los diferentes tratamientos tecnológicos con las IgE del suero o de los pools de sueros y que denominaremos también alergenidad.

En este formato competitivo, las muestras de Pru p 3 o Mal d 3 nativas o tratadas, diluidas 1/40 en PBS, se mezclaron con el suero o pool de sueros (1/1, v/v) y se determinó la IgE específica. Como control negativo, se usó en el mismo ensayo una mezcla de PBS sin proteína y el mismo suero o pool de sueros (1/1, v/v). Los cambios en la unión de la proteína Pru p 3 o Mal d 3 a las IgE inducidos por los tratamientos (sIgE de la muestra) con respecto a la muestra no tratada (sIgE 0%) y al control negativo (tampón, sIgE 100%) se estimaron para cada muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Reactividad IgE (\%)} = \frac{\text{slgE muestra} - \text{slgE 0\%}}{\text{slgE 100\%} - \text{slgE 0\%}}$$

Por tanto, un valor de unión de IgE inferior al 100% sugiere un menor reconocimiento de las IgE (disminución de la alergenicidad) y un valor superior al 100% sugiere un mayor reconocimiento de IgE (aumento de la alergenicidad).

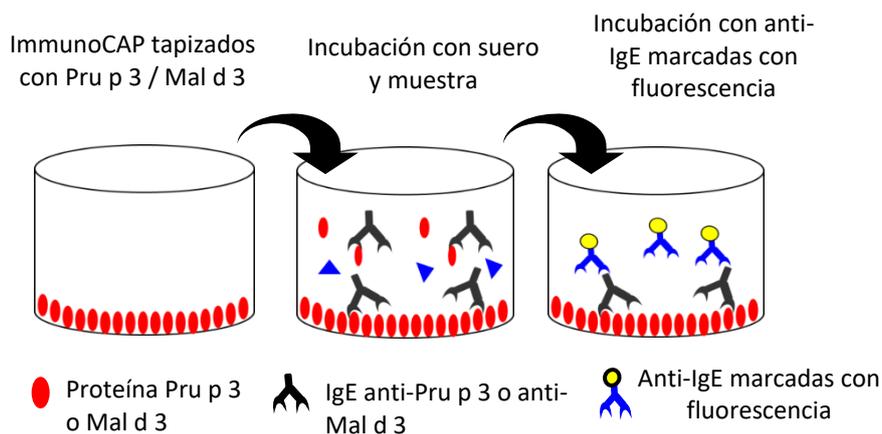


Figura 9. Esquema de la técnica de inmunofluorescencia de tipo competitivo indirecto.

3.4.7. Técnica de punción intraepidérmica (skin prick test)

Las pruebas de prick test se han realizado en individuos voluntarios alérgicos a LTP en el Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa por parte de personal sanitario.

La técnica se realizó en la cara interna del antebrazo usando una lanceta estándar de 1 mm de punta. Como control positivo y negativo se usó una solución de clorhidrato de histamina (10 mg/mL) y suero fisiológico, respectivamente. La lectura se realizó a los 20 min tras la punción.

En los pacientes que dieron un resultado positivo, se midió el diámetro longitudinal (mayor) y transversal (menor), y se calculó el producto de los mismos. La prueba se consideró positiva si alguno de los diámetros del habón era igual o mayor a 3 mm o al habón producido por la histamina.

3.4.8. Tratamientos tecnológicos

La proteína Pru p 3 y/o el extracto de piel de melocotón se sometieron a diferentes tratamientos (térmicos, altas presiones, pulsos eléctricos de alto voltaje, ultrasonidos y proteólisis) en las condiciones que se indican a continuación. De cada tratamiento efectuado, se realizaron al menos dos experimentos independientes y las muestras se analizaron por triplicado. En el caso de la proteína Mal d 3 solo se realizó el tratamiento de proteólisis.

3.4.8.1. Tratamientos térmicos

Un volumen de 100 μ l de proteína pura (1 mg/mL) o extracto de melocotón, dializados en el tampón fosfato sódico 10 mM, pH 5,6, se añadió en tubos de vidrio de 1,2 mL con un diámetro de 8,2 mm y una altura de 40 mm. Los tubos se introdujeron en un baño termostático ($\pm 0,1$ °C) y se trataron a diferentes temperaturas (75, 85 y 95 °C), tomándose muestras por duplicado a diferentes tiempos de tratamiento (15 seg, 5, 10, 20 y 40 min). Los tubos se enfriaron inmediatamente por inmersión en un baño de agua con hielo.

3.4.8.2. Pulsos eléctricos de alto voltaje

La proteína Pru p 3 (1 mg/mL) o extracto de melocotón en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 5,6 se sometieron a 50 pulsos de forma de onda cuadrada de 3 μ s a 25 kV/cm a 20 °C y a 50 °C. Los tratamientos se aplicaron en un equipo y una cámara de tratamiento suministrados por ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), como se describe en el estudio de Saldaña et al. (2010). Las muestras se trataron en una cámara de tratamiento de electrodos paralelos previamente atemperada. La distancia entre electrodos fue de 0,25 cm, el área de los electrodos fue de 1,76 cm² y la frecuencia de los pulsos fue de 1 Hz. La temperatura de las muestras se midió con un termopar antes y después del tratamiento encontrándose diferencias inferiores a 2 °C. La energía por pulso (W) y la energía específica total (kJ/kg) se calculó considerando la conductividad eléctrica y la masa de cada medio de tratamiento (Luengo et al., 2014).

3.4.8.3. Altas presiones hidrostáticas

Las muestras de Pru p 3 (1 mg/mL) o de extracto de melocotón en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 5,6 se introdujeron en tubos Eppendorf sin espacio de cabeza y se sometieron a tratamientos a presiones de 400 MPa, 500 MPa o 600 MPa durante 5 y 10 min a 20 °C, 50 °C y 80 °C. Los tratamientos se aplicaron utilizando un equipo isostático

discontinuo Stansted Fluid Power FPG 11500 B (Stansted, Essex, Reino Unido). El fluido transmisor de presión, compuesto por una mezcla de etanol y aceite de ricino (70/30, v/v), fue previamente equilibrado a la temperatura de los tratamientos correspondientes. El aumento de temperatura debido al calentamiento adiabático fue de aproximadamente 3 °C por 100 MPa. La tasa de aumento de presión fue de aproximadamente 240 MPa/min y el tiempo de liberación de presión fue inferior a 30 s.

3.4.8.4. Ultrasonidos

Los tratamientos se llevaron a cabo utilizando a un equipo generador de ultrasonidos modelo Digital Sonifier® 450 Ultrasonic Cell Disruptor (Branson Ultrasonics, Danbury, Conn) de 100 mL de capacidad descrito por Raso et al., (1998). Se utilizaron muestras de extracto de piel de melocotón diluidas 1/10 en el tampón fosfato sódico 10 mM pH 5,6, que se trataron utilizando un dispositivo de alta intensidad y un sistema de sonda con cuerno de titanio a una frecuencia de 20 kHz. Los tratamientos se aplicaron a diferentes amplitudes (43, 72 y 100 μm), presiones manométricas (0, 50 y 100 kPa) y tiempos (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 y 8 min).

3.4.8.5. Tratamientos de proteólisis

3.4.8.5.1. Preparación de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos de bazo bovino y porcino se obtuvieron siguiendo el protocolo previamente descrito (Lardeux et al., 1983). Para ello, el bazo se trituro y se homogeneizó con un Potter en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4, que contenía sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM. El homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 1000 g y luego 10 min a 4000 g. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 20.000 g durante 20 min y el sedimento se homogeneizó en tampón fosfato 20 mM, pH 5,8, y se congeló a -20°C. El homogeneizado congelado se descongeló después de 48 h y el sobrenadante del extracto enriquecido en lisosoma se recuperó después de 20 min de centrifugación a 100.000 g.

Los extractos enzimáticos de sardina se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Castillo-Yañez et al., (2004). Para ello, se homogeneizaron 100 g de vísceras completas (extracto 1) y 100 g de estómago (extracto 2) durante 1 min con 200 mL de agua destilada helada, utilizando un Ultraturax. El homogeneizado se centrifugó a 26.000 g durante 20 min a 2-4 °C y el sobrenadante se congeló a -20 °C hasta su uso.

3.4.8.5.2. Ensayos de proteólisis

Las proteínas Pru p 3 o Mal d 3 a una concentración de 1 mg/mL y los enzimas se prepararon en tampón McIlvaine de diferente pH según el ensayo a realizar como se muestra en la **Tabla 10**. Los tratamientos se llevaron a cabo en una estufa al pH y la temperatura óptima indicada para cada proteasa. La duración de los tratamientos fue de 2 h. En algunos ensayos se utilizaron también otros pHs, temperaturas y tiempos de tratamiento. En todos los ensayos se usó un control que contenía la proteína sin adicionar enzima. Los enzimas fueron añadidos en la relación recomendada por los fabricantes, generalmente una relación 1/40 (p/p). Para la proteasa ácida 1 el fabricante recomienda una concentración del 3% y para la proteasa ácida 2 del 1%. Para finalizar la reacción, las muestras se calentaron en un baño termostático a 100 °C durante 5 min.

El nombre comercial de las proteasas ácidas 1 y 2 se omite a lo largo del texto por motivos de confidencialidad.

Tabla 10. Condiciones óptimas de tratamiento de las proteasas utilizadas.

pH 7	37°C	Páncreas bovino	Pronasa	Tripsina	
	50°C	Quimotripsina	Alcalasa		
	65°C	Proteinasa K			
pH6	50°C	Ficina	Bromelaina		
	65°C	Papaina			
pH 3,4	37°C	Quimosina	Bazo bovino	Bazo porcino	
		Pepsina	Cuajo animal	Cuajo microbiano	Cuajo vegetal
	50°C	Sardina 1 y 2	<i>Rhizopus</i> sp.	Proteasa ácida 1	Proteasa ácida 2

3.4.9. Determinación de parámetros fisicoquímicos en manzana

En este trabajo, se han determinado los parámetros de firmeza, sólidos solubles totales (SST) y acidez en muestras de manzana recolectadas en diferente grado de madurez y a lo largo de su conservación en atmósfera controlada a 0-1 °C durante siete meses.

3.4.9.1. Firmeza

El análisis de la firmeza se realizó en las dos caras opuestas del fruto una vez pelado. Para ello, se utilizó un penetrómetro digital de mesa (Agrosta, Serqueux, Francia) con una sonda cilíndrica de 11 mm de diámetro, que proporciona la medida de fuerza en g.

3.4.9.2. Sólidos solubles totales

Para la determinación de SST, se tomaron varios trozos de mesocarpio (pulpa) de las manzanas y se trituraron utilizando una licuadora. El licuado obtenido se analizó con un refractómetro digital (ORF 1PM, Kern & Sohn, Balingen, Alemania), que proporciona el contenido de SST en grados Brix.

3.4.9.3. Acidez

Para determinar el grado de acidez se mezclaron 10 g de zumo con 90 mL de agua destilada, excepto para la variedad Granny Smith, en la que se tomó 1 g de zumo y 99 mL de agua destilada. El grado de acidez se determinó en un titulador automático, mediante una valoración ácido-base, utilizando NaOH 0,1 N como agente valorante y un electrodo de pH para determinar el punto final de la valoración, que fue de 8,5. La medición se realizó por triplicado para cada lote de manzanas. Los resultados se expresaron en gramos de ácido málico/kg, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez} \left(\frac{\text{g ácidomálico}}{\text{kg}} \right) = \frac{V \cdot N \cdot 67}{P}$$

Donde V es el volumen en litros de NaOH gastado en la valoración, N es la normalidad de NaOH (0,1 N), 67 es el peso equivalente del ácido málico y P es el peso de la muestra en kg.

3.4.10. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 8, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba post-hoc de Tukey para determinar si las diferencias entre los datos eran significativas ($p \leq 0,05$). El valor p, se representa en forma de asterisco (*) y puede tener diferentes grados de significación * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

La relación entre los diferentes parámetros analizados se determinó mediante la correlación de Pearson utilizando el programa Excel 2016.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Purificación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3

La proteína Pru p 3 se ha aislado a partir de extractos de piel de melocotón de la variedad Calanda y la proteína Mal d 3 a partir de extractos de piel de manzana de una mezcla de variedades. Para realizar la extracción de las proteínas, se ha utilizado un tampón fosfato de pH 5,6 que contenía EDTA, DIECA, PVPP y azida sódica. El pH se ha seleccionado considerando que el rendimiento óptimo de extracción de esas proteínas se obtiene a pH entre 5,0 y 6,0 (Saito et al., 2010).

Los reactivos DIECA y EDTA son quelantes de metales por lo que su adición es necesaria para inhibir la acción de las enzimas, entre ellas, las polifenoloxidasas, que requieren iones metálicos. El reactivo PVPP se ha usado porque forma complejos con los compuestos fenólicos, de tal manera que inhibe las reacciones de pardeamiento y la azida sódica por ser un compuesto inhibidor del crecimiento microbiano (Carnes et al., 2002; Pastorello et al., 1999; Saito et al., 2010).

Una vez obtenidos los extractos, la purificación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 se realizó mediante una cromatografía de intercambio iónico en gel SP-Sepharose y ultrafiltración. Los perfiles de la elución con NaCl del gel SP-Sepharose se muestran en las **Figuras 10 a y c**, donde se observa la presencia de un pico simétrico y en la **Figura 10 c y d** se muestra el perfil electroforético de las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de purificación.

Como puede observarse, el extracto presenta varias bandas de diversos pesos moleculares de débil intensidad, entre las que se encuentra la Mal d 3. En el pico de las fracciones eluidas de la cromatografía en SP-Sepharose con NaCl, la banda de Mal d 3 así como algunas bandas de peso molecular de entre 40 y 70 kDa muestran una mayor intensidad, debido a que son retenidas en el gel. En el retenido y el permeado de la ultrafiltración se concentran aquellas proteínas mayores o menores al punto de corte (30 kDa), respectivamente, constituyendo la Mal d 3 la proteína mayoritaria del permeado (**Figura 10 d**). El análisis mediante densitometría del carril de las proteínas purificadas mostró que el grado de pureza de ambas es mayor del 90% (**Carriles 2 y 5 de las Figuras 10 b y d**).

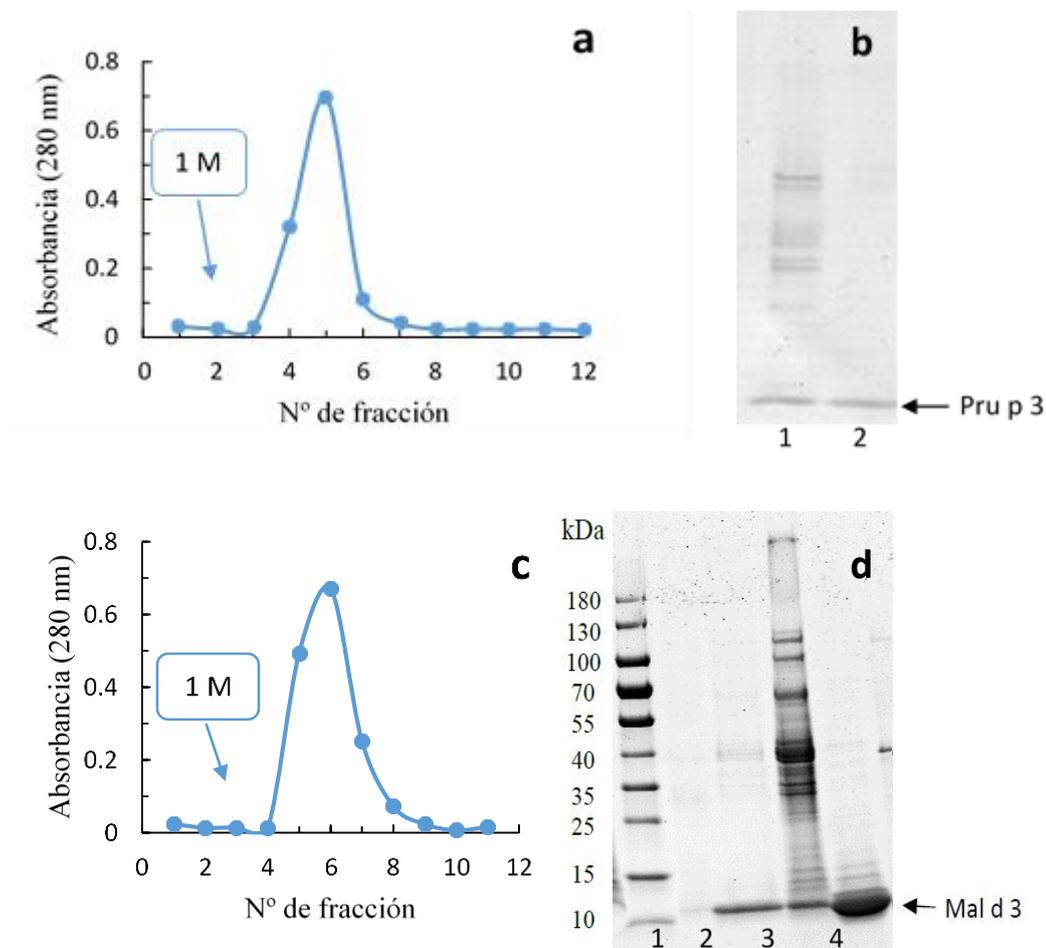


Figura 10. Cromatograma de la etapa de elución con NaCl 1 M de la cromatografía en SP-Sepharose del extracto de piel de melocotón (a) y manzana (c). Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. La flecha indica la aplicación del tampón con NaCl 1 M. SDS-PAGE en gel de poliácridamida (4-20 %) de: (b) (1) Extracto de piel de melocotón; (2) Proteína Pru p 3 purificada. (d) (1) Patrón de pesos moleculares, (2) Extracto de manzana, (3) Fracciones conjuntas del pico eluido con NaCl 1 M de la cromatografía en SP-Sepharose (4) retenido y (5) permeado de las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración con una membrana de punto de corte de 30 KDa.

Las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 se han purificado en este trabajo siguiendo el método descrito por Pastorello et al., 1999. Algunos autores han utilizado otros tipos de cromatografía como fase reversa (Duffort et al., 2002; Larocca et al., 2013) o filtración en gel seguida de una cromatografía hidrofóbica (Carnes et al., 2002). El utilizar en la primera etapa del aislamiento una columna de intercambio iónico conlleva la ventaja de poder trabajar con un volumen de extracto grande y de obtener una fracción enriquecida en Pru p 3 o Mal d 3 concentrada en la etapa inicial del proceso.

4.2. Identificación de Pru p 3 por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

La identificación de la proteína Pru p 3 se ha realizado a partir de la banda de 9 kDa recortada del gel de electroforesis mediante análisis por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF, comparando los péptidos obtenidos con los péptidos teóricos indicados en la base de datos NCBIInr para la proteína Pru p 3. En todos los casos la proteína identificada tiene una cobertura de secuencia suficiente para asegurar ($p < 0,05\%$) que las coincidencias no se deben al azar.

4.3. Titulación de antisueros

El título de los antisueros frente a Pru p 3 y Mal d 3 se ha determinado mediante una técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto. El título se define como el inverso de la dilución correspondiente al 50% de la máxima absorbancia obtenida.

Como ejemplo, en la **Figura 11** se muestra la curva de titulación de un antisuero frente a Mal d 3. El suero preinmune (antes de inocular Mal d 3) tiene una absorbancia muy baja a todas las diluciones ensayadas, mientras que el suero inmune da una señal alta que disminuye al aumentar la dilución. Los títulos obtenidos frente a la Pru p 3 y la Mal d 3 han mostrado una diferente respuesta entre animales y extracciones, variando entre 1/5.000 y 1/32.000.

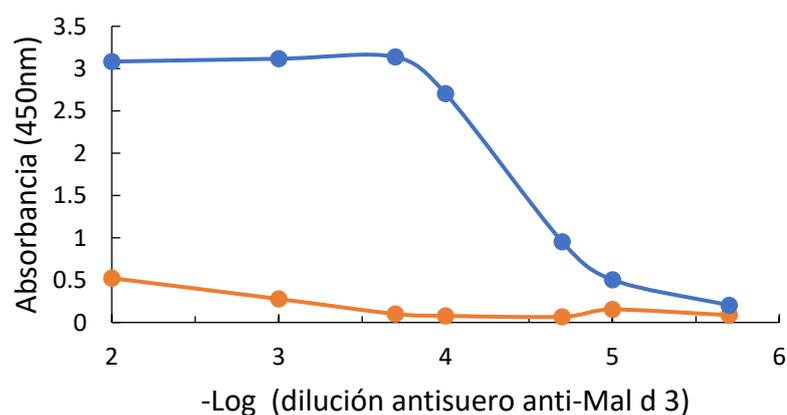


Figura 11. Titulación de un antisuero anti-Mal d 3 realizada mediante la técnica de ELISA no competitivo indirecto. Antisuero pre-inmune (•) e inmune (•).

4.4. Purificación de anticuerpos anti-Pru p 3 y anti-Mal d 3

Los anticuerpos específicos frente a las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 presentes en los antisueros se aislaron por inmunoafinidad, con una columna que contenía la respectiva proteína purificada insolubilizada en una matriz cromatográfica, que se preparó previamente.

En la **Figura 12** se muestra como ejemplo el perfil cromatográfico de la cromatografía de inmunoafinidad realizada con un antisuero anti-Pru p 3. Como puede observarse, el perfil cromatográfico presenta dos picos. En el primer pico eluyen todos los componentes del antisuero que no han interactuado con la matriz cromatográfica y en el segundo pico, eluido a pH 2,8, eluyen los anticuerpos específicos. Los anticuerpos fueron inmediatamente neutralizados a pH 7,4 con el fin de no modificar su estructura, se dializaron y se conjugaron con un enzima. Los anticuerpos anti-Pru p 3 se conjugaron con peroxidasa de rábano y los anticuerpos anti-Mal d 3 con fosfatasa alcalina, utilizando en ambos casos kits comerciales de conjugación. Los anticuerpos no conjugados y conjugados se utilizaron como anticuerpos de captura y detector, respectivamente, para desarrollar las técnicas de ELISA.

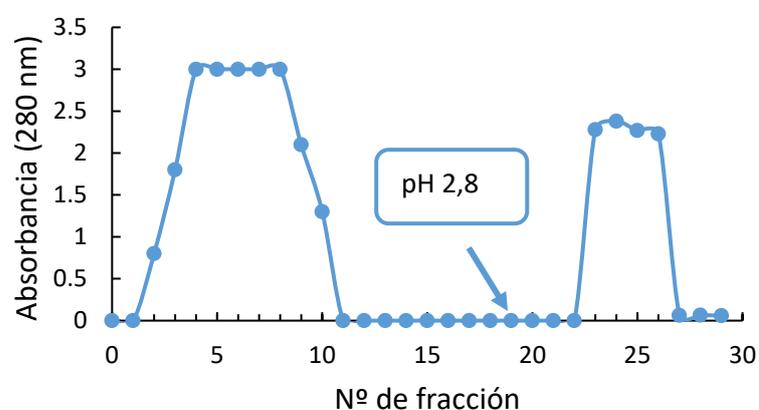


Figura 12. Perfil de la cromatografía de inmunoafinidad de un antisuero anti-Pru p 3. Las fracciones recogidas fueron de 1 ml. La flecha indica la aplicación del tampón de pH 2,8.

4.5. Desarrollo de una técnica de ELISA sandwich para la determinación de Pru p 3

Para el desarrollo de la técnica ELISA sandwich, se ensayaron diferentes concentraciones de anticuerpos específicos para tapizar los pocillos (1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes diluciones del conjugado (1/25.000 a 1/65.000). Como ejemplo, en la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos. La concentración seleccionada para el anticuerpo de captura fue 1 $\mu\text{g/ml}$ y la dilución elegida para el anticuerpo conjugado con el enzima fue la 1/65.000, ya que esas condiciones proporcionaban absorbancias adecuadas con los estándares ensayados y un ruido de fondo considerablemente bajo.

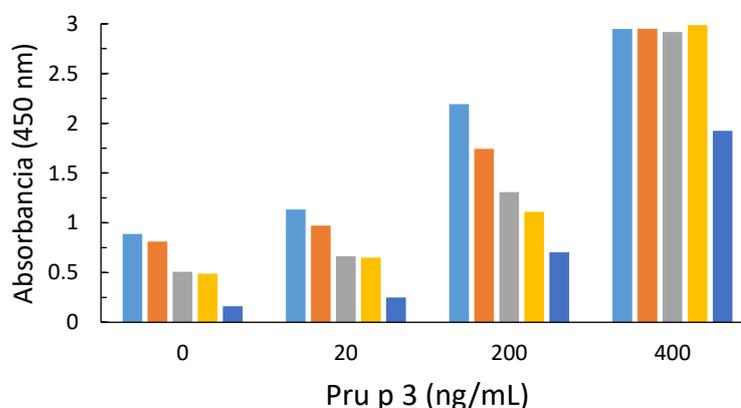


Figura 13. ELISA sandwich para la determinación de la proteína Pru p 3 con pocillos tapizados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de captura y diferentes diluciones del anticuerpo conjugado con el enzima: 1/25.000 (•), 1/35.000 (•), 1/45.000 (•), 1/55.000 (•) y 1/65.000 (•).

Además, se ensayaron diferentes bloqueantes (BSA, sacarosa, NaCl y Tween 20) en el tampón de dilución de los estándares, muestras y conjugado con el objeto de disminuir más el ruido de fondo. Se seleccionó el tampón que contenía un 0,1 % de BSA y 5% de sacarosa por ser el que proporcionaba el menor ruido de fondo y una mayor absorbancia en presencia de los estándares (resultados no mostrados).

4.6. Desarrollo de una técnica ELISA sandwich para la determinación de Mal d 3

4.6.1. Conjugado de anticuerpos con peroxidasa

Para desarrollar la técnica de ELISA sandwich para la determinación de Mal d 3, se prepararon en principio anticuerpos específicos conjugados con el enzima peroxidasa. Los ensayos realizados combinando diferentes concentraciones de tapizado de anticuerpos y diluciones del conjugado mostraron que las condiciones que proporcionaban una señal adecuada con los estándares daban un ruido de fondo muy alto (absorbancia a 280 nm mayor de 0,5) y con los que proporcionaban un ruido de fondo bajo, la absorbancia de los estándares era también muy baja (menor de 0,4).

Para comprobar que el ruido de fondo no se debía a la proteína ovoalbúmina utilizada como bloqueante de los pocillos, se tapizaron pocillos únicamente con diversos bloqueantes (gelatina de pescado, albúmina sérica bovina y leche en polvo) y se incubaron con el conjugado. Los resultados obtenidos mostraron una absorbancia muy baja en todos los pocillos, menor de 0,08, lo que indicaba que ninguno de los bloqueantes ensayados producía interferencias con el conjugado de peroxidasa (resultados no mostrados).

En las condiciones en las que se obtenía una mejor relación entre el ruido de fondo y la absorbancia de los estándares, se ensayó la utilización de diferentes bloqueantes (BSA, sacarosa, NaCl y Tween 20), no mejorándose sustancialmente en ninguno de los casos los resultados obtenidos (**Figura 14**).

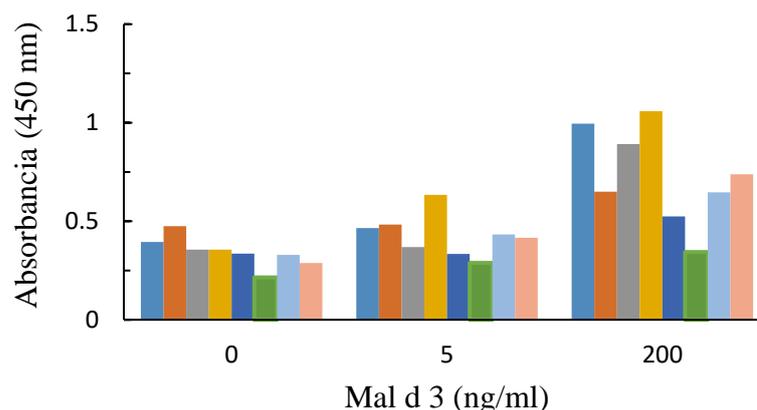


Figura 14. ELISA sandwich para la determinación de la proteína Mal d 3 utilizando diferentes bloqueantes en el tampón de dilución de los estándares y el anticuerpo conjugado con peroxidasa. Pocillos tapizados con 1 µg/ml del anticuerpo de captura y dilución del anticuerpo conjugado con el enzima 1/40.000. PBS (•), NaCl 0,5 M (•), Tween 20 0,05 % (•), BSA 0,5 % (•), sacarosa 5 % (•), NaCl 0,5 M, Tween 20 0,05 %, BSA 0,5 % y sacarosa 5 % (•), BSA 0,1 % y sacarosa 5 % (•), BSA 0,2 % (•)

Estos resultados nos hicieron sospechar que pudiera haber alguna interacción específica entre los anticuerpos anti-Mal d 3 y la peroxidasa. Por ello, se realizó un ensayo en el que los pocillos tapizados o bien con anticuerpos anti-Mal d 3 o bien con anticuerpos obtenidos frente a otras proteínas alérgicas disponibles (anticuerpos anti-Cor a 9 de avellana y anti-Pru p 3 de melocotón) se incubaron con los enzimas peroxidasa o fosfatasa alcalina a diferentes diluciones. En la **Figura 15** se muestran los resultados obtenidos con una dilución 1/1000 de peroxidasa y de fosfatasa alcalina. Los resultados indican que existe una fuerte reactividad entre los anticuerpos anti Mal d 3 y la peroxidasa, que no se observa con los otros anticuerpos ensayados, lo que sugiere que la peroxidasa y la Mal d 3 pueden tener algún epítipo común. Además, con los tres tipos de anticuerpos la reacción con la fosfatasa alcalina fue muy baja. Por ello, se decidió preparar un conjugado de anticuerpos anti-Mal d 3 con fosfatasa alcalina para ser usados en el desarrollo de la técnica de ELISA sandwich.

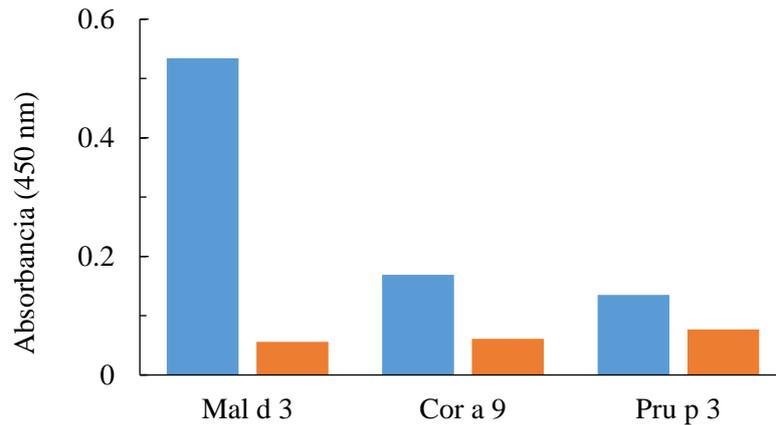
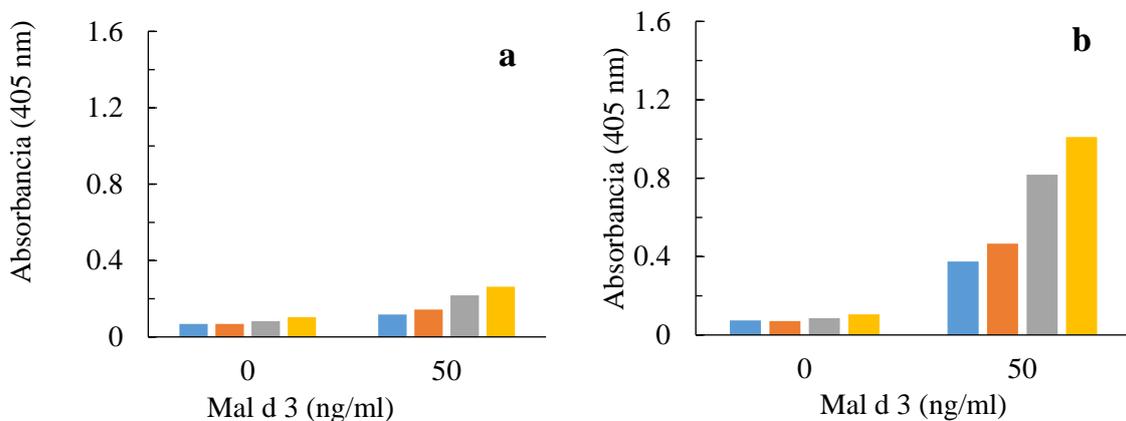


Figura 15. Ensayo con pocillos tapizados con anticuerpos frente a las proteínas Mal d 3, Cor a 9 y Pru p 3 incubados con peroxidasa (•) o fosfatasa alcalina (◦).

4.6.2. Conjugado de anticuerpos con fosfatasa alcalina

Los anticuerpos anti-Mal d 3 se conjugaron con fosfatasa alcalina y se realizaron ensayos en pocillos tapizados con diferentes concentraciones de anticuerpos y con diferentes diluciones del conjugado (**Figura 16**), incluyendo además un blanco y un estándar de Mal d 3. Los resultados mostraron que la absorbancia aumenta conforme disminuye la dilución del conjugado, obteniéndose valores de absorbancia mayores en los pocillos tapizados con mayor cantidad de anticuerpos. La dilución de los anticuerpos conjugados se fijó en 1/1000. La concentración de anticuerpos de captura para el tapizado se fijó en 10 µg/ml, pues concentraciones menores daban unas absorbancias bajas y una concentración mayor (15 µg/ml) daba unos valores de absorbancia similares a los obtenidos con 10 µg/ml (resultados no mostrados).



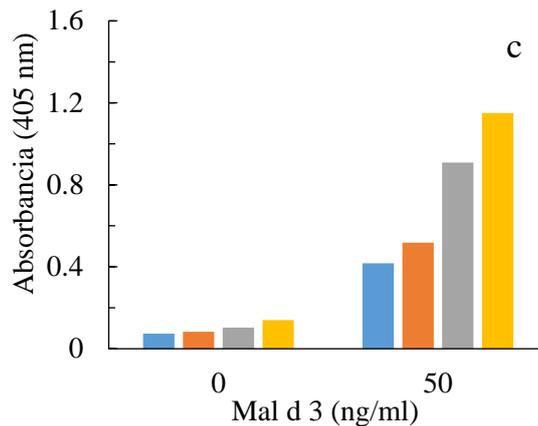


Figura 16. ELISA sandwich para la determinación de la proteína Mal d 3 utilizando anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Pocillos tapizados con 1 (a), 5 (b) y (c) 10 µg/ml de anticuerpos de captura. Los colores corresponden a la dilución del conjugado 1/10.000 (•), 1/5000 (◐), 1/2000 (◑), 1/1000 (◒).

4.7. Validación de la técnica de ELISA sandwich para determinar Pru p 3 y Mal d 3

La curva de calibración obtenida para la técnica de ELISA sandwich para la determinación de Pru p 3 en las condiciones optimizadas se muestra en la **Figura 17**. El mejor ajuste se obtuvo al representar la absorbancia a 450 nm de los estándares frente a la concentración de Pru p 3 mediante una curva polinomial de segundo grado, con concentraciones de proteína de entre 2,5 y 100 ng/ml. Los límites LD y LC de la técnica optimizada, han sido de 3,7 y 12,4 ng/ml, respectivamente.

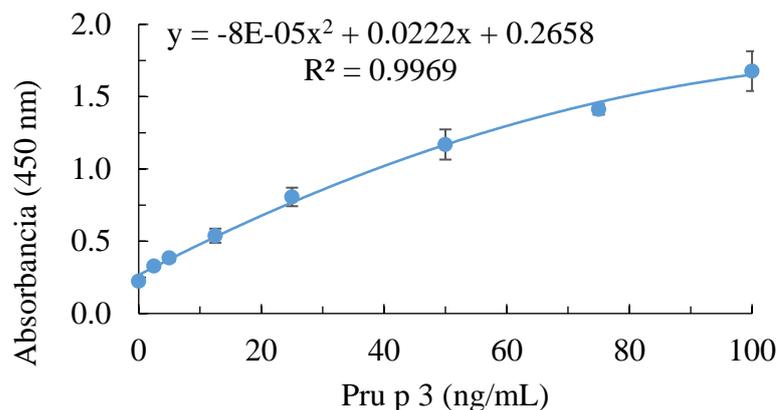


Figura 17. Curva de calibración obtenida mediante la técnica de ELISA sandwich para la determinación de la proteína Pru p 3. Los valores corresponden al promedio de diez determinaciones ± desviación estándar.

La recta de calibración obtenida para la técnica de ELISA sandwich para la determinación de Mal d 3 en las condiciones optimizadas se muestra en la **Figura 18**. El mejor ajuste se obtuvo al representar la absorbancia a 405 nm de los estándares frente a la concentración de Mal d 3 mediante una representación lineal en un rango de concentraciones entre 1,25 y 50 ng/mL. El LD y el LC de la técnica optimizada han sido de 0,15 y 0,52 ng/mL, respectivamente.

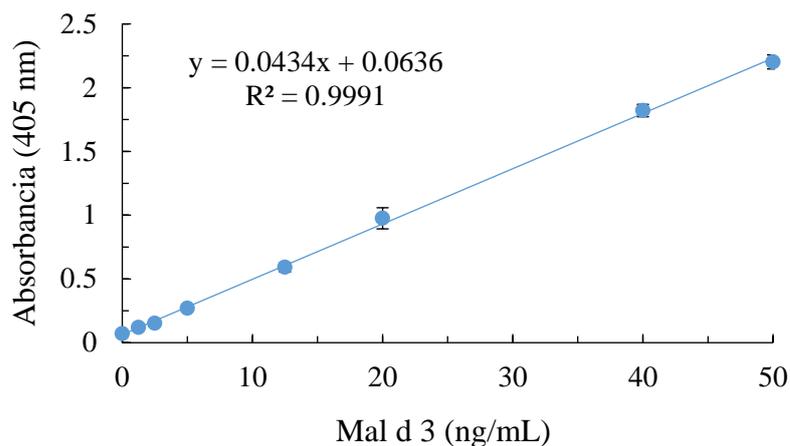


Figura 18. Recta de calibración obtenida mediante la técnica de ELISA sandwich para la determinación de la proteína Mal d 3. Los valores corresponden al promedio de diez determinaciones \pm desviación estándar.

La especificidad del test ELISA desarrollado para la determinación de Pru p 3 se determinó utilizando extractos de una amplia gama de frutas como se muestra en la **Figura 19**. El test mostró una reactividad cruzada considerablemente alta con la nectarina y el paraguayo (48% y 78%, respectivamente), lo que se atribuye a que estas frutas pertenecen a la misma especie que el melocotón (*Prunus persica*, variedad nucipersica y platycarpa, respectivamente). El resto de frutas dieron una reactividad cruzada inferior al 10%.

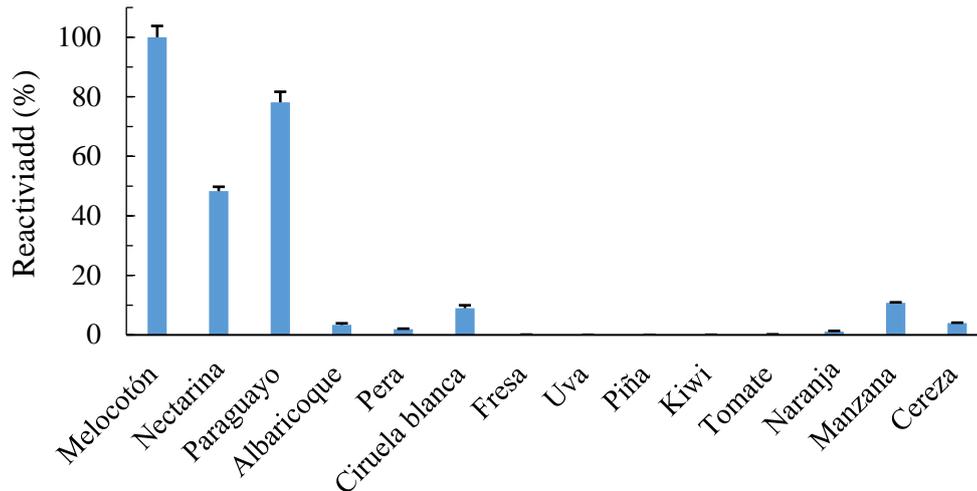


Figura 19. Reactividad cruzada de los anticuerpos frente a Pru p 3 de melocotón con otras frutas determinada con la técnica ELISA sandwich. La reactividad está expresada como porcentaje respecto a la muestra de melocotón (100%).

La determinación de los parámetros de precisión del test ELISA para Pru p 3 se muestra en la **Tabla 11**. La repetibilidad dio como resultado coeficientes de variación que oscilaron entre el 10,4% y el 12,1%, la reproducibilidad intra-ensayo entre el 8,2% y el 13,9% y la reproducibilidad inter-ensayo entre el 9,6% y el 13,0%. Estos valores están dentro de los límites aceptables por la AOAC para la determinación de alérgenos alimentarios mediante inmunoensayos (Abbott et al., 2010; AOAC INTERNATIONAL, 2016).

Tabla 11. Resultados del estudio de precisión para la determinación de Pru p 3 realizada con la técnica de ELISA sandwich. Las muestras estaban compuestas por zumo de piña adicionado con 0,02% y 0,01% de zumo de melocotón.

	Zumo de melocotón 0,02%		Zumo de melocotón 0,01%	
	Media (ng/g)	CV (%)	Media (ng/g)	CV (%)
Repetibilidad	24,021	10,434	11,977	12,09
Reproducibilidad intra-ensayo	24,956	8,270	11,665	13,98
Reproducibilidad inter-ensayo	24,400	12,977	12,182	9,62
Día 1	28,008		13,220	
Día 2	22,081		12,415	
Día 3	23,113		10,911	

Para determinar la robustez, se realizaron ensayos modificando ligeramente las condiciones establecidas para observar su impacto en los resultados. La comparación entre los valores medios de las letras mayúsculas (AA a AG) con las medias de las letras minúsculas correspondientes (Aa a Ag) permite evaluar el efecto de cada modificación (**Tabla 9**). Cuando se calculó el valor de la desviación estándar de las diferencias Dt (SDi), se obtuvieron valores de 1,482 y 0,913 para las muestras que contenían 0,01% y 0,02% de zumo de melocotón, respectivamente (**Tabla 12**). Estos valores son inferiores a la desviación estándar de la reproducibilidad inter-ensayo (3,2 y 1,2, respectivamente), lo que implica que el ELISA sandwich desarrollado es robusto (Karageorgou y Samanidou, 2014).

Tabla 12. Diferencias de los promedios de los valores de las letras mayúsculas con respecto a las correspondientes minúsculas (D_i) obtenidas para la matriz de Youden en la determinación de la robustez. Desviación estándar de las diferencias (SD_i) y desviación estándar de la reproducibilidad inter-ensayo (SD inter-ensayo).

D_i	Zumo de melocotón 0,02%	Zumo de melocotón 0,01%
A-a	-2,679	-1,326
B-b	0,157	-0,790
C-c	-0,453	-0,228
D-d	-0,277	0,442
E-e	0,389	0,126
F-f	0,035	0,522
G-g	0,221	-0,034
SD_i	1,482	0,913
SD inter-ensayo	3,166	1,172

4.8. Determinación de la IgE específica frente a Pru p 3 y Mal d 3 en los sueros humanos

Las IgE específicas en los sueros de pacientes alérgicos se han determinado mediante la prueba serológica de inmunofluorescencia no competitiva indirecta. En la **Figura 20** se muestra la curva de calibración de la técnica de inmunofluorescencia no competitiva, obtenida con estándares de IgE en la que se observa que el mejor ajuste se obtiene con una regresión logística de cuatro parámetros en un rango de 0 a 100 unidades de IgE (kU/L). A partir de esta curva de calibración, que elabora el equipo Phadia, se han determinado los niveles de IgE específica frente a Pru p 3 y Mal d 3 del suero de cada paciente. Estos resultados, así como los valores de los diámetros longitudinal (mayor) y transversal (menor) del habón y el producto de estos dos últimos de la prueba de prick test se incluyen en los **Anexos IV y V**. La determinación de la IgE específica que reacciona con las proteínas Pru p 3 o Mal d 3 sometidas a los diferentes tratamientos tecnológicos se ha determinado utilizando el formato competitivo de la técnica de inmunofluorescencia como se muestra en la sección **3.4.6.6.** de la metodología.

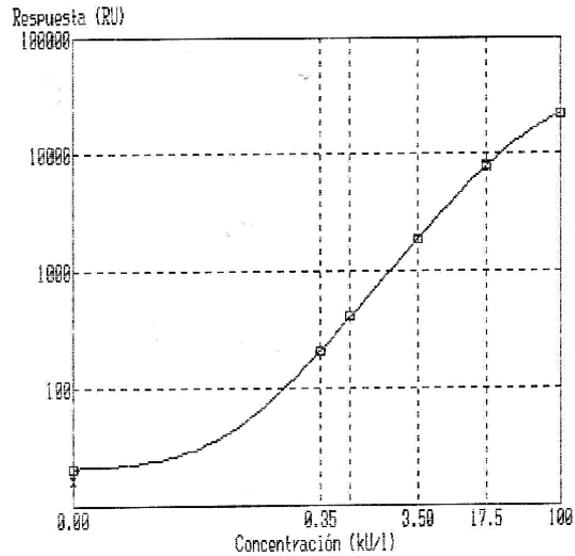


Figura 20. Curva de calibración con estándares de IgE obtenida para la determinación de IgE en los sueros humanos mediante la técnica de inmunofluorescencia de tipo no competitivo indirecta.

4.9. Efecto de los tratamientos tecnológicos en las proteínas Pru p 3 y Mal d 3

En este estudio, se ha determinado el efecto de los tratamientos térmicos, PEAV, altas presiones hidrostáticas y ultrasonidos en la desnaturalización de la proteína Pru p 3. Además, se ha determinado el efecto de la proteólisis en la degradación de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3. El grado de desnaturalización y degradación se ha determinado mediante la técnica ELISA sandwich utilizando anticuerpos específicos obtenidos en conejo. Por otra parte, se ha determinado también el efecto de los tratamientos tecnológicos y de proteólisis en la alergenicidad de la Pru p 3 y Mal d 3 mediante la prueba de prick test y una prueba serológica de inmunofluorescencia de tipo competitivo indirecto en pacientes alérgicos a melocotón y manzana.

Debe considerarse que los anticuerpos anti-Pru p 3 y anti-Mal d 3 empleados en este estudio se purificaron mediante inmunoafinidad utilizando la proteína correspondiente nativa insolubilizada en una matriz cromatográfica. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos utilizados reconozcan preferentemente epítopos conformacionales y/o lineales que se encuentran en las áreas superficiales de la forma nativa de la proteína (Wehbi et al., 2005). Por esta razón, las reacciones de unión de los anticuerpos podrían verse perturbadas por cambios en la estructura conformacional de la proteína, como los producidos por los tratamientos tecnológicos. Por tanto, las técnicas inmunoquímicas constituyen una estrategia analítica para determinar el efecto de los tratamientos

tecnológicos sobre la desnaturalización de las proteínas, ya que la pérdida de inmunorreactividad está relacionada con cambios en la estructura. Las técnicas inmunoquímicas se han utilizado ampliamente para determinar el efecto del procesado en las proteínas alergénicas de diferentes alimentos (Monaci y Visconti, 2010; Navarro et al., 2015; Shriver y Yang, 2011).

Estas consideraciones se pueden extender también de forma similar a la alteración de la alergenicidad por modificación de los epítopos reconocidos por las IgE (van Hengel, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los epítopos reconocidos por las IgG y las IgE no tienen por qué coincidir, por lo que cambios en la antigenicidad no tienen por qué ir asociados a cambios en la alergenicidad.

4.9.1. Tratamientos térmicos

El efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento en la desnaturalización de la proteína Pru p 3 se determinó en la proteína purificada y en el extracto de piel de melocotón, ambos en tampón fosfato pH 5,6. El grado de desnaturalización de Pru p 3 se determinó mediante la técnica ELISA sandwich. Como se muestra en la **Figura 21**, la desnaturalización de la Pru p 3 depende de la intensidad del tratamiento térmico aplicado. El tratamiento a 75 °C y 85 °C durante 40 min en el extracto de piel de melocotón no mostró diferencias significativas en la concentración de proteína inmunorreactiva respecto a la muestra no tratada. Sin embargo, a 95 °C, el grado de desnaturalización aumentó con el tiempo de tratamiento, obteniéndose valores de inmunorreactividad un 30% y 60% inferiores respecto al control a los 20 y 40 min de tratamiento, respectivamente.

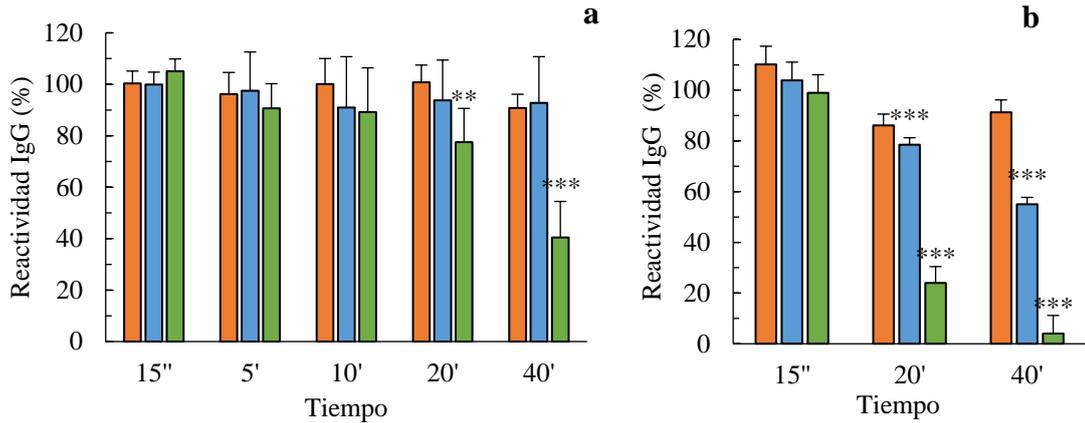


Figura 21. Efecto del tratamiento térmico del extracto de piel de melocotón (a) y Pru p 3 (b) en la desnaturalización de la Pru p 3 determinada por la técnica ELISA sandwich. Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresan en porcentaje con respecto a la muestra sin tratar (100%). Los asteriscos indican diferencias significativas con el control (* $p < 0,05$), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Las barras corresponden a los tratamientos a 75 °C (•), 85 °C (•) y 95 °C (•), respectivamente.

Para la proteína tratada en tampón, el efecto del tratamiento térmico sobre la desnaturalización de la proteína Pru p 3 mostró una desnaturalización más marcada. Así, el tratamiento a 85 y 95 °C durante 40 min disminuyó la cantidad de Pru p 3 inmunorreactiva en un 45% y un 95%, respectivamente.

Estos resultados, concuerdan con los obtenidos por Johnson et al., 2010 quienes observaron, usando una técnica de ELISA, que el tratamiento de la Mal d 3 purificada, disminuía la inmunorreactividad más del 60% y el 95% tras un tratamiento a 90 °C y 100°C respectivamente durante 10 min a pH 7,0.

Las diferencias en el grado de desnaturalización de la Pru p 3 tratada en tampón o en el extracto se deben probablemente a la influencia de los componentes de la matriz alimentaria, que ejercen un efecto protector como se ha mostrado para la pectina, que previene la desnaturalización inducida por la presión de la proteína Mal d 3 (Husband et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo tras el tratamiento térmico de la Pru p 3 pura a pH 5,6 están de acuerdo con los observados por Gaier et al., (2008) utilizando espectroscopía de dicroísmo circular (CD). Estos autores observaron que, cuando el calentamiento de Pru p 3 se realiza a pH neutro (pH 7,5), tiene lugar una desnaturalización tras el tratamiento a 95 °C, que comienza alrededor de los 85 °C, y que la proteína no es capaz de replegarse cuando se atempera a 25 °C, mientras que la proteína recupera su estructura nativa al enfriarse tras ser tratada a pH ácido (pH 3). Asimismo, estos

resultados concuerdan con los obtenidos por CD con la proteína homóloga Mal d 3 de manzana, que muestran una marcada pérdida de la estructura en α -hélice cuando se calienta a una temperatura igual o mayor de 90 °C (Johnson et al., 2010). Estos resultados se han atribuido a la ruptura de los enlaces disulfuro de la proteína en condiciones ligeramente ácidas o neutras, como observamos en nuestro estudio, y a la mayor estabilidad de los puentes disulfuro a pH muy ácido.

Cuando las muestras de Pru p 3 pura, se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura 22**) en condiciones reductoras no se observaron cambios aparentes en la intensidad de la banda de Pru p 3 con respecto a la muestra sin tratar, excepto para el tratamiento a 95 °C durante 40 min, que mostró una disminución considerable de su intensidad. Este resultado concuerda con el observado en el estudio de Lavilla et al. (2016), en el que no se observaron cambios aparentes en la intensidad de la banda de la Pru p 3 tras un tratamiento a 90 °C durante 10 min, mientras que a 100 °C durante 15 min, la proteína exhibió una banda de proteína más tenue.

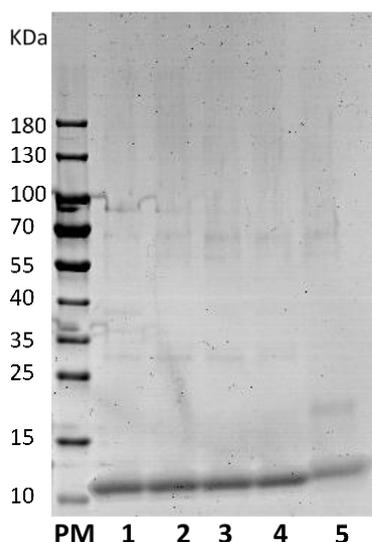


Figura 22. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4–20 %) en condiciones reductoras de muestras de Pru p 3 tratadas térmicamente: PM, marcador de peso molecular. (1), muestra sin tratar; (2) 75 °C/15 s. (3) 95 °C/ 15 s. (4), 75 °C/40 min. (5), 95 °C/ min.

Dicha desnaturalización o cambio en la conformación de la proteína no siempre implica una disminución de la alergenicidad como se ha mencionado anteriormente. Por ello, se determinó también el efecto de los tratamientos térmicos en la reactividad de la Pru p 3 con las IgE mediante la técnica de inmunofluorescencia competitiva. En este

ensayo, la disminución de la unión entre la proteína tratada y las IgE en comparación con la proteína sin tratar implicará una disminución de la alergenicidad.

Cuando se realizan estudios para determinar el efecto de tratamientos tecnológicos en el potencial alergénico de las proteínas alergénicas alimentarias, es habitual trabajar con sueros individuales o con un pool de suero de todos los pacientes. Sin embargo, en nuestro estudio consideramos más relevante preparar tres pools de sueros realizando previamente una selección de pacientes en función de la gravedad de la sintomatología que presentaban como se ha indicado en el apartado 3.2. de métodos. Los pools se prepararon con los sueros de los pacientes que presentaron un nivel de IgE frente a Pru p 3 superior a 1,30 kU/L. El nivel de IgE específica en los tres pools de suero (SAO, SA y UCS) fue de 5,43, 6,84 y 9,86 kU/L, respectivamente.

Los resultados obtenidos con las muestras de Pru p 3 pura tratadas a 75, 85 y 95 °C durante 40 min indican que dichos tratamientos térmicos no parecen afectar a la unión de la proteína a las IgE, ya que solo se observó una ligera inhibición, inferior al 10%, después del tratamiento a 95 °C durante 40 min, cuando se ensayó con el pool de pacientes UCS, aunque no se determinó la significación estadística (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que después de los tratamientos térmicos aplicados, la Pru p 3 mantiene su potencial alergénico.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Brenna et al. (2000), quienes observaron que un tratamiento térmico severo (121 °C durante 10-30 min) aplicado al zumo de melocotón mantenía intacta la estructura de la Pru p 3 observada mediante SDS-PAGE y no modificaba su alergenicidad cuando se analizó mediante Western-blotting utilizando dos pools de sueros de pacientes alérgicos a melocotón. Esta alta termoestabilidad se atribuyó a que los epítomos que reaccionan con las IgE son probablemente lineales y, por tanto, no se ven afectados por el calor. Sin embargo, Lavilla et al., (2016) utilizando una técnica de ELISA competitivo y un pool de sueros de pacientes alérgicos al melocotón, mostraron que un tratamiento térmico suave (80–90 °C) de la Pru p 3 pura durante 5-15 min tuvo tan solo un ligero efecto en el reconocimiento de las IgE mientras que el aumento de la temperatura a 100 °C durante 15 min causó un 60% de inhibición en la unión a las IgE. Estos autores observaron que cuando el tratamiento térmico se realizaba en un extracto de melocotón solo se obtenía un 25% de inhibición, lo que sugiere un efecto protector de los componentes presentes en el extracto sobre el potencial alergénico de la proteína Pru p 3. También se han observado resultados similares en estudios en los que se ha sometido a la proteína Mal d 3 a tratamiento térmico,

mostrando una alta estabilidad a los tratamientos por debajo de 90 °C durante 20 min, mientras que la exposición a condiciones más severas (100 °C durante 2 h) provocó la alteración de la estructura secundaria y una reducción considerable en la capacidad de unión de las IgE. Asimismo, estos autores observaron que el calentamiento en presencia de glucosa provocó una menor reducción de la unión a las IgE, sugiriendo que la presencia de azúcares en las frutas podría contribuir a mejorar la estabilidad de la actividad alérgica de la Mal d 3 en alimentos procesados por calor (Sancho et al., 2005).

4.9.2. Tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje

Los resultados obtenidos en el efecto de los tratamientos de PEAV en la Pru p 3 purificada tratada a 25 kV/cm a 20 °C no han mostrado efecto en la proteína. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de Mal d 3 mediante dicroísmo circular (Johnson et al., 2010), ya que estos autores no observaron cambios en la estructura secundaria de la proteína tratada a 35 kV/cm a 20 °C. En el tratamiento combinado realizado en nuestro estudio a 35 kV/cm a 50 °C, se observó una desnaturalización de aproximadamente el 50% (**Figura 23a**).

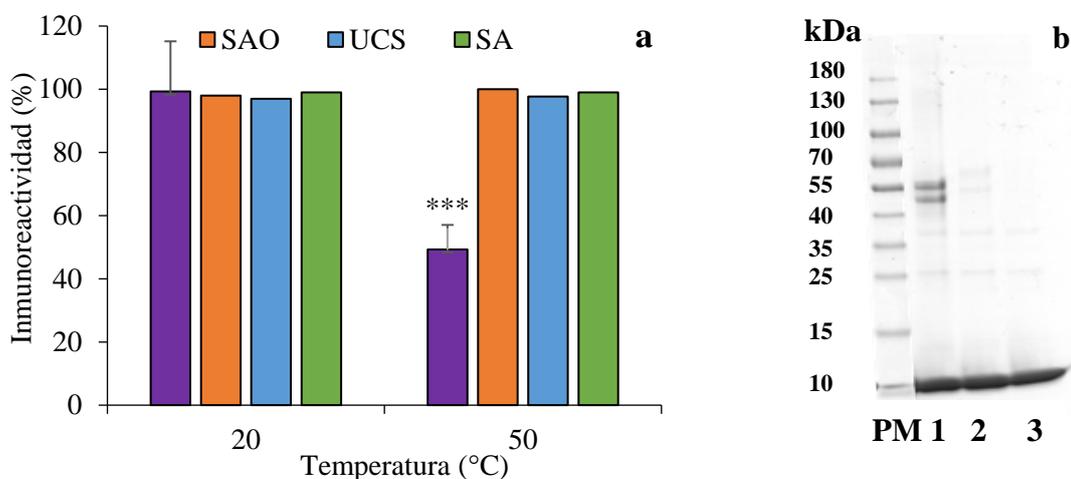


Figura 23. (a) Efecto del tratamiento de PEAV a 25 kV/cm a 20 °C y 50 °C en la desnaturalización de la Pru p 3 determinada por la técnica ELISA sandwich (barras moradas) y sobre la alergenidad de Pru p 3 determinada por inmunofluorescencia con los tres pools de sueros SAO, UCS y SA. Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresan en porcentaje con respecto a la muestra sin tratar (100%). Los asteriscos indican diferencias significativas con el control (* $p < 0,05$), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (b) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4-20%) en condiciones reductoras. PM: marcador de peso molecular (1) muestra sin tratar; (2) 25 kV/cm a 20 °C; (3) 25 kV/cm a 50 °C.

El análisis mediante SDS-PAGE de las muestras de Pru p 3 sometidas a los tratamientos PEAV mostró que la banda de Pru p 3 así como las bandas de

aproximadamente 25 y 38 kDa permanecieron inalteradas mientras que la intensidad de las bandas de aproximadamente 45-60 kDa disminuyó notablemente (**Figura 23b**).

Las muestras de Pru p 3 sometidas a PEAV a las dos temperaturas (20 y 50 °C) se ensayaron también para determinar su efecto en la alergenicidad, pero en ninguno de los casos se observaron cambios en la reactividad con las IgE utilizando los tres pools de sueros de pacientes alérgicos (**Figura 23a**). No hay hasta la fecha estudios del efecto de los PEAV en la proteína Pru p 3, pero nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente para otras proteínas alergénicas, en las que estos tratamientos no mostraron ningún efecto sobre las propiedades de las mismas. Así, se ha demostrado que el tratamiento con PEAV no modifica la estructura secundaria de la Mal d 3 de manzana o la Ara h 2,6 de cacahuete a intensidades de campo aplicadas de 30 y 35 kV a 20 °C (Johnson et al., 2010). Así mismo, no se han detectado cambios en la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina cuando la leche o el suero son sometidos a tratamientos PEAV de diferente intensidad a 20 °C (de Luis et al., 2009).

Los resultados obtenidos en la prueba de prick test se muestran en la **Tabla 13**. En la expresión de los resultados, se ha utilizado el producto de los diámetros longitudinal y transversal, ya que varios pacientes presentaban un área irregular o desarrollaron pseudópodo durante la prueba de punción cutánea (Vohlonen et al., 1989).

Al comparar la media del producto de los diámetros del habón estimados para las muestras no tratadas y tratadas con PEAV, no se encontraron diferencias para los tratamientos a 20 y 50 °C, respectivamente.

Por otra parte, en conjunto, en la prueba de prick test se observó un aumento de la reacción cutánea en el 41% y 55% de los pacientes y una disminución en el 50% y 40% cuando se comparó el habón producido con PEAV a 20 °C y 50 °C con respecto a la proteína sin tratar, respectivamente (**Tabla 14**).

Estos resultados indican que el tratamiento de PEAV combinado con calor induce un cambio de conformación considerable de la Pru p 3. Sin embargo, el tratamiento combinado o no con calor no modifica la reactividad de la Pru p 3 frente a las IgE de los pacientes alérgicos al melocotón. Estos resultados sugieren que la desnaturalización observada no indica una reducción del riesgo para el paciente alérgico.

Tabla 13. Efecto del tratamiento con PEAV a 25 kV / cm a 20°C (PEAV20) y 50 °C (PEAV 50) en la alergenicidad de la Pru p 3 purificada determinada mediante prick test en pacientes alérgicos al melocotón. Los cambios en la alergenicidad se expresan como el porcentaje del producto de los diámetros del habón respecto a la muestra sin tratar (100%). Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Producto de los diámetros del habón			Alergenicidad (%)	
	Control	PEAV20	PEAV50	PEAV20	PEAV50
LTP001	63	63	88	100	139
LTP002	63	40	128	63	203
LTP003	72	36	41	50	58
LTP004	98	112	144	114	146
LTP005	200	126	200	63	100
LTP006	180	160	154	88	85
LTP007	-	-	-	-	-
LTP008	63	160	160	254	254
LTP009	56	84	128	150	228
LTP010	35	70	50	200	142
LTP011	48	96	176	200	366
LTP012	-	-	-	-	-
LTP013	-	-	-	-	-
LTP014	630	960	750	152	119
LTP015	208	390	351	187	168
LTP016	54	30	70	55	129
LTP017	-	-	-	-	-
LTP018	200	63	72	31	36
LTP019	160	80	144	50	90
LTP020	-	-	-	-	-
LTP021	252	176	168	69	66
LTP022	176	162	120	92	68
LTP023	25	20	15	80	60

Paciente	Producto de los diámetros del habón			Alergenicidad (%)	
LTP024	54	224	120	414	222
LTP025	110	0	80	0	72
LTP026	224	192	105	266	145
LTP027	175	120	300	68	171

Tabla 14. Número de pacientes alérgicos al melocotón (n) que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenidad en la prueba de prick test frente a Pru p 3 en muestras tratadas a 25 kV a 20 °C (PEAV20) y 50 °C (PEAV50). \bar{X} (%) corresponde al valor medio de los porcentajes de los productos de los diámetros de los habones para cada grupo.

Tratamiento	Aumento alergenidad		Disminución alergenidad		Sin cambios
	n	\bar{X} (%)	n	\bar{X} (%)	
PEAV 20	9	186	11	66	2
PEAV 50	12	188	9	68	1

4.9.3. Tratamientos de altas presiones hidrostáticas (AP)

Los resultados del tratamiento de altas presiones del extracto de melocotón se muestran en la **Figura 24**. El tratamiento a 400 MPa a 20 °C, no indujo una desnaturalización de la proteína Pru p 3 mientras que hubo una disminución significativa de la proteína inmunorreactiva a mayores presiones. La mayor disminución a 20 °C se obtuvo después del tratamiento a 500 MPa durante 10 min, que fue del 40%, y se detectó un pequeño aumento a 600 MPa. Cuando se determinó el efecto del tratamiento combinado de presión y temperatura, la proteína Pru p 3 mostró una alta sensibilidad, obteniendo un grado de desnaturalización a 400 MPa y a 50 °C superior al 50%, con respecto a la proteína no tratada. Además, se observó una desnaturalización similar cuando los tratamientos se realizaron a presiones más altas (500 y 600 MPa) a dicha temperatura. En todas las presiones y temperaturas ensayadas, se observó que la disminución en la concentración de Pru p 3 inmunorreactiva tuvo lugar principalmente en los primeros 5 min de tratamiento y a los 10 min la reducción adicional fue muy baja.

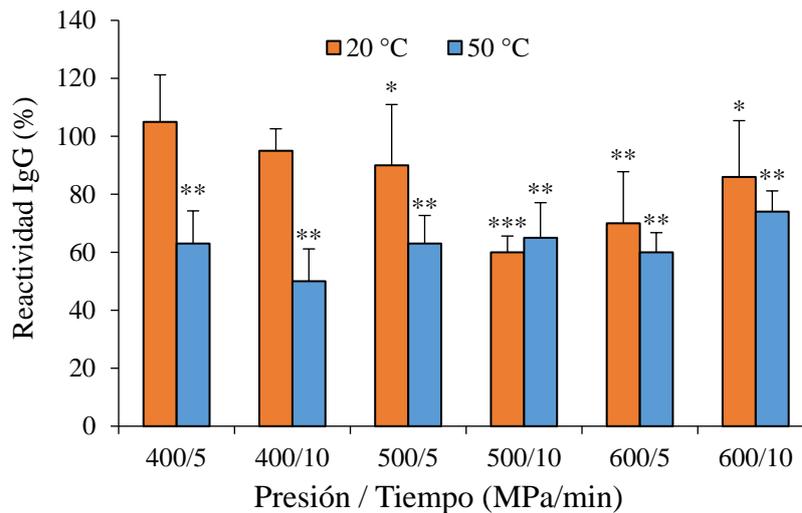


Figura 24. Efecto del tratamiento de altas presiones del extracto de piel de melocotón sobre la desnaturalización de la proteína Pru p 3 determinado por la técnica de ELISA sandwich. Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresan como porcentaje con respecto a la muestra no tratada (100%). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la muestra no tratada. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Los números del eje de abcisas indican la presión (MPa) y el tiempo (min) de los tratamientos.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Johnson et al. (2010) con la proteína homóloga Mal d 3. Estos autores determinaron la reactividad de Mal d 3 mediante ELISA usando anticuerpos específicos de conejo y mostraron que el efecto de la presión (150–800 MPa) a 20 °C sobre la Mal d 3 fue mínimo, mientras que cuando se trató a presiones de entre 400 y 800 MPa a 80 °C se produjo una marcada pérdida de inmunorreactividad (alrededor del 60-70%). En ese estudio se observó además una buena correlación entre la pérdida de inmunorreactividad y los cambios en la estructura secundaria de Mal d 3 determinados por dicroísmo circular. Estos autores tampoco obtuvieron cambios en la estructura secundaria de Mal d 3 tras el tratamiento a 20 °C, mientras que a 80 °C observaron un despliegue significativo de la estructura de α -hélice, sobre todo por encima de 400 MPa.

Husband et al., (2011) también estudiaron el efecto de las altas presiones de extractos de piel de manzana en la desnaturalización de la Mal d 3 mediante Western-blotting utilizando un pool de sueros de pacientes alérgicos a la manzana. Estos autores mostraron que un tratamiento a 700 MPa durante 10 min a 20 °C induce una disminución de intensidad de la banda de Mal d 3, determinada por densitometría, de alrededor del 70 %, y la banda todavía se visualizaba después del mismo tratamiento realizado a 115 °C.

Cuando la Pru p 3 pura se trató a 600 MPa durante 10 min, la desnaturalización de la proteína fue aproximadamente de un 25% a 20 °C y de un 50% a 50 °C y 80 °C (**Figura 25a**). La reactividad observada de la Pru p 3, incluso en las condiciones más extremas, indica que la proteína mantiene una inmunoreactividad residual significativa con los anticuerpos. Este hecho podría deberse a que la desnaturalización inducida por la alta presión no afecta a algunos epítomos conformacionales de la proteína, y / o que algunos anticuerpos reconocen epítomos lineales que no se ven afectados por la presión.

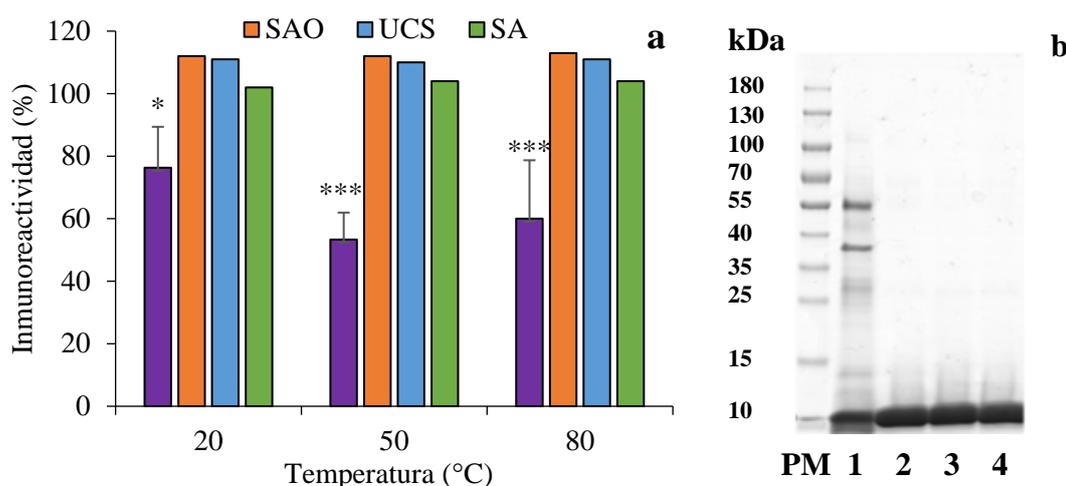


Figura 25. (a) Efecto del tratamiento de altas presiones de la proteína Pru p 3 pura realizado a 600 MPa durante 10 min a diferentes temperaturas sobre la desnaturalización de la proteína determinada por ELISA sandwich (barras moradas) y sobre la alergenicidad de Pru p 3 determinada por inmunofluorescencia con los tres pools de sueros (SAO, UCS y SA). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresan en porcentaje con respecto a la muestra sin tratar (100%). (b) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4-20%) en condiciones reductoras de: PM, marcador de peso molecular. (1) muestra sin tratar, (2) tratamiento a 20 °C, (3) tratamiento a 50 °C, (4) tratamiento a 80 °C.

Al comparar la desnaturalización de la Pru p 3 tratada a 600 MPa durante 10 min en el extracto (**Figura 24**) y en la forma pura (**Figura 25a**), se observó que la proteína muestra una mayor sensibilidad a la presión cuando se trata en tampón, principalmente a 50 °C. Estos resultados sugieren que hay algunos componentes presentes en la matriz alimentaria que ejercen un efecto protector sobre la desnaturalización de la Pru p 3 durante el procesado, como se ha observado en nuestros resultados de los tratamientos térmicos y en otros estudios con Mal d 3 (Husband et al., 2011) y Pru p 3 (Lavilla et al., 2016). Este

efecto protector se ha atribuido, como se ha indicado anteriormente, a las pectinas presentes en el extracto (Husband et al., 2011).

Cuando se analizaron las muestras de Pru p 3 tratadas con altas presiones mediante SDS-PAGE, no se observaron cambios aparentes en la intensidad de la banda de Pru p 3 con respecto a la muestra no tratada (**Figura 25b**), como se había observado en estudios previos (Lavilla et al., 2016). Por el contrario, se observó que las bandas de las proteínas de alto peso molecular presentes en las muestras no tratadas desaparecían después del tratamiento, lo que indica una desnaturalización severa y / o agregación de esas proteínas.

Cuando se determinó el efecto del tratamiento a 600 MPa durante 10 min en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 (**Figura 25a**), se observó que el tratamiento no parecía afectar a su reactividad con las IgE de los pools de sueros de pacientes alérgicos o incluso parecía inducir un pequeño aumento de la reactividad. Estos resultados sugieren que el tratamiento con altas presiones hidrostáticas mantiene o incluso puede incrementar ligeramente el potencial alergénico de la proteína Pru p 3. Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos por Lavilla et al., (2016) quienes observaron que la mayoría de las combinaciones de presión / tiempo aplicadas a 20 °C a la Pru p 3 purificada o al extracto de melocotón aumentaron la unión “in vitro” de la proteína a las IgE.

Los resultados obtenidos en la prueba del prick test con Pru p 3 tratada a 600 MPa durante 10 min, a las tres temperaturas de tratamiento (20, 50 y 80 °C), se muestran en la **Tabla 15**. Como se puede observar, la gravedad de los síntomas comunicados por los pacientes no parece estar relacionada ni con el valor de la IgE específica ni con el tamaño del habón. Estos resultados sugieren que el potencial alergénico de la Pru p 3 depende de la sensibilización de cada paciente.

Además, cuando se compararon las muestras de Pru p 3 tratadas con altas presiones con la muestra control sin tratar, se encontró un aumento del tamaño del habón en el 50% de los pacientes para las muestras tratadas a 20 °C y 50 °C, y en el 64% de pacientes para la muestra tratada a 80 °C. También se produjo una reducción de la reacción en un 45%, 50% y 27% para los mismos grupos de pacientes (**Tabla 16**).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Lavilla et al. (2016). Estos autores indicaron que la prueba de prick test realizada con Pru p 3 purificada tratada a 600 MPa a 20 °C mostró un aumento del diámetro del habón en el 35% de los alérgicos al melocotón, una disminución en el 41% y una respuesta similar en el 24%.

Tabla 15. Efecto del tratamiento de altas presiones a 600 MPa durante 10 min a 20 °C (HP20), 50 °C (HP50) y 80 °C (HP80) en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 pura determinada por prick test en pacientes alérgicos al melocotón. Los cambios en la alergenicidad también se expresan como el porcentaje del producto de los diámetros del habón con respecto a la muestra sin tratar (100%). Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Producto de los diámetros del habón				Alergenicidad (%)		
	Control	HP20	HP50	HP80	HP20	HP50	HP80
LTP001	280	220	144	70	78	51	25
LTP002	48	56	84	56	116	175	116
LTP003	35	112	60	105	320	171	300
LTP004	108	96	70	117	88	64	108
LTP005	375	140	252	375	37	37	100
LTP006	128	96	120	140	75	93	109
LTP007	-	-	-	-	-	-	-
LTP008	180	160	81	200	88	45	111
LTP009	72	96	70	80	133	97	111
LTP010	112	84	60	48	75	53,6	42
LTP011	112	90	144	240	80	128,6	214
LTP012	-	-	-	-	-	-	-
LTP013	-	-	-	-	-	-	-
LTP014	558	315	800	900	56	143	161
LTP015	200	264	392	448	132	196	224
LTP016	54	84	35	60	155	64	111
LTP017	-	-	-	-	-	-	-
LTP018	42	128	64	90	304	152	214
LTP019	64	180	264	176	281	412	275
LTP020	-	-	-	-	-	-	-
LTP021	440	400	350	400	90	79	90
LTP022	100	200	240	250	200	240	250
LTP023	20	24	30	24	120	150	120

Paciente	Producto de los diámetros del habón				Alergenicidad (%)		
LTP024	108	132	210	90	122	194,4	83
LTP025	90	168	112	48	186	124	53
LTP026	120	260	144	120	232	240	114
LTP027	70	320	360	300	457	514,3	428

Tabla 16. Número de pacientes alérgicos al melocotón (n) que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenicidad cuando se realizó el tratamiento de altas presiones hidrostáticas en la proteína Pru p 3 mostrado mediante prick test. \bar{X} (%) corresponde al valor medio de los porcentajes del producto de los diámetros del habón para cada grupo. La proteína Pru p 3 se trató a 600 MPa durante 10 min a 20 °C (HP20), 50 °C (HP50) y 80 °C (HP80).

Tratamiento	Aumento alergenicidad		Disminución alergenicidad		Sin cambios
	n	\bar{X} (%)	n	\bar{X} (%)	n
HP20	11	192	10	74	1
HP50	11	194	11	69	0
HP80	14	169	6	60	2

4.9.4. Tratamientos de ultrasonidos

En este estudio, se ha determinado el efecto del tratamiento con ultrasonidos a diferentes intensidades, presiones y tiempos de tratamiento sobre la desnaturalización y alergenicidad de la Pru p 3. Los tratamientos se realizaron únicamente en el extracto de piel de melocotón debido al gran volumen requerido para llevar a cabo los experimentos (mayor de 1 litro).

Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 26 a-c**. Para los tratamientos realizados a cada amplitud, la disminución de la reactividad de Pru p 3 frente a IgG de conejo fue similar a las tres presiones ensayadas, excepto en la muestra tratada a la mayor amplitud (100 μ m) en la que la presión de 100 kPa indujo una mayor desnaturalización. Además, la disminución de la Pru p 3 inmunoreactiva se produjo principalmente en el primer minuto de tratamiento y en tiempos más prolongados, la reducción fue muy baja, siendo la diferencia entre 1 y 8 min menor del 15% de la pérdida total de inmunorreactividad.

Al considerar el factor de presión, el grado de desnaturalización obtenido después de 8 min a una presión de 100 kPa fue del orden del 30 %, 38 % y 43 % para las amplitudes

de 43, 72 y 100 μm , respectivamente. Estos resultados confirman que el efecto combinado de la presión con el tratamiento de ultrasonidos (manosonicación) aumenta la desnaturalización de la proteína Pru p 3.

Garino et al. (2012) determinaron mediante Western-blotting, utilizando un antisuero específico de conejo, el efecto de tratamientos secuenciales del extracto de pulpa de nectarina con microondas a 140 °C durante 30 min y ultrasonidos durante 30 min a 150 W en la desnaturalización de la Pru p 3. Estos autores observaron que la muestra tratada parecía tener una afinidad mayor por los anticuerpos que la no tratada, lo que atribuyeron a que el procesado induce un aumento de la concentración de proteínas termoestables, como es el caso de la Pru p 3, y una disminución de las termolábiles. Nuestros resultados utilizando la técnica de ELISA indican que la concentración de Pru p 3 inmunorreactiva disminuye cuando el extracto de melocotón se somete a un tratamiento con ultrasonidos, lo que sugiere que la estructura de la Pru p 3 se ha modificado. Esta modificación parece inducir la destrucción de algunos epítomos conformacionales que son reconocidos por las IgG específicas de conejo y el mantenimiento de otros, lineales y probablemente algunos conformacionales, que no se ven afectados por este procesado.

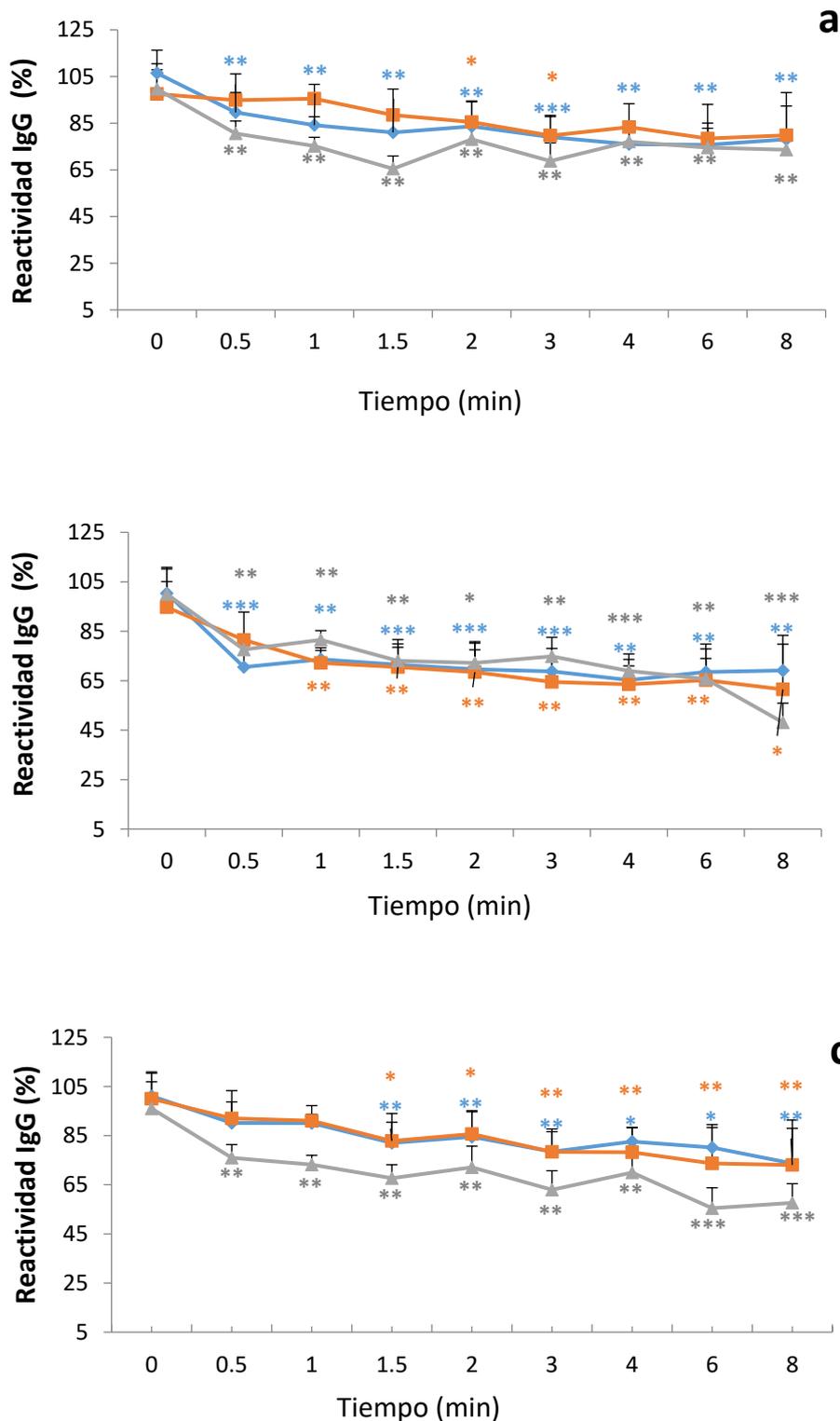


Figura 26. Efecto del tratamiento de ultrasonidos del extracto de piel de melocotón a diferentes amplitudes: 43 μm (a), 72 μm (b) y 100 μm (c) en la desnaturalización de la proteína Pru p 3, determinada por la técnica ELISA sandwich. Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresan en porcentaje respecto a la muestra sin tratar (100%). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (●) 0 kPa (◐) 50 kPa (◑) 100 kPa.

Cuando los extractos de melocotón tratados con ultrasonidos se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 27**), no se observó ningún cambio en el perfil de proteínas ni en la intensidad de las bandas en las muestras tratadas con respecto al extracto sin tratar. Este resultado concuerda con el obtenido por Garino et al. (2012), ya que tampoco observaron cambios en la intensidad de las bandas correspondientes a la Pru p 3 después del procesado con calentamiento por microondas y ultrasonidos.

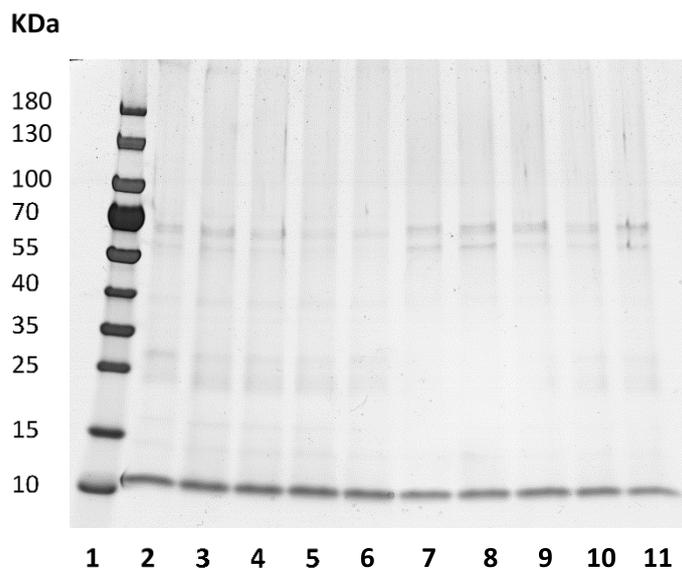


Figura 27. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4-20%) en condiciones reductoras de muestras de extracto de piel de melocotón sometidas a tratamientos de ultrasonidos. Los números incluidos en la descripción de los carriles indican la presión (kPa) y amplitud (μm) de los tratamientos aplicados.

- | | |
|-----------------------|---------------|
| 1. Marcador PM | 7. 50 / 72 |
| 2. Muestra sin tratar | 8. 100 / 72 |
| 3. 0 / 43 | 9. 0 / 100 |
| 4. 50 / 43 | 10. 50 / 100 |
| 5. 100 / 43 | 11. 100 / 100 |
| 6. 0 / 72 | |

Los resultados obtenidos sobre el efecto del tratamiento de ultrasonidos en la alergenicidad de la Pru p 3 mostraron que tan solo el tratamiento más severo aplicado (100 kPa y 100 μm de amplitud) indujo una ligera disminución, entre 5 y 10%, de la reactividad de la proteína con las IgE del pool de sueros de pacientes con SAO y UCS (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que, al igual que en el caso de los tratamientos indicados en las secciones anteriores, los tratamientos de ultrasonidos aplicados a la Pru p 3 mantienen sus propiedades alergénicas. Nuestros resultados

concuerdan con los obtenidos por Garino et al. (2012), ya que en su estudio no observaron pérdida en la intensidad de la banda correspondiente a la Pru p 3 por Western-blotting utilizando sueros de pacientes alérgicos al melocotón

4.9.5. Tratamientos de proteólisis

En este trabajo se ha determinado el efecto del tratamiento con diferentes extractos enzimáticos o con proteasas en la degradación y alergenicidad de las proteínas Pru p 3 y Mal d 3. Los extractos enzimáticos de bazo porcino y bovino, así como de las vísceras de sardina, preparados como se indica en la sección de **Métodos 3.4.8.5.1.**, se ensayaron dada la alta actividad proteolítica indicada en algunos trabajos (Castillo-Yañez et al., 2004; Ladrat et al., 2003; Lardeux et al., 1983; Melendo et al., 1998). El resto de los enzimas son productos comerciales obtenidos de diferentes fuentes.

Los ensayos se realizaron utilizando las proteínas purificadas Pru p 3 o Mal d 3, y en algunos casos extracto de piel de fruta; y los enzimas a su pH, temperatura y relación enzima-sustrato óptimas y en algunos casos en otras condiciones. En todos los ensayos se incluyó un control de la proteína purificada en ausencia de enzima y enzima en ausencia de proteína.

El efecto de la proteólisis en la degradación se determinó en primer lugar mediante la técnica de electroforesis. En el caso de aquellos enzimas en los que se observó una disminución considerable de la intensidad de la banda de proteína y que eran capaces de actuar al pH ácido, que corresponde al de los productos derivados de frutas, se analizaron los hidrolizados por la técnica de ELISA sandwich y por espectrometría de masas MALDI-TOF. El efecto de la proteólisis en la alergenicidad se ha determinado sólo para las proteasas ácidas que han mostrado una degradación intensa de las proteínas Pru p 3 o Mal d 3.

Previamente a la realización de los experimentos con las proteínas Pru p 3 y Mal d 3, se realizaron ensayos con algunas proteasas y α -lactalbúmina bovina, una proteína del lactosuero bovino considerablemente sensible a la proteólisis, cuyos resultados obtenidos mediante la técnica de electroforesis, se muestran en la **Figura 28.**

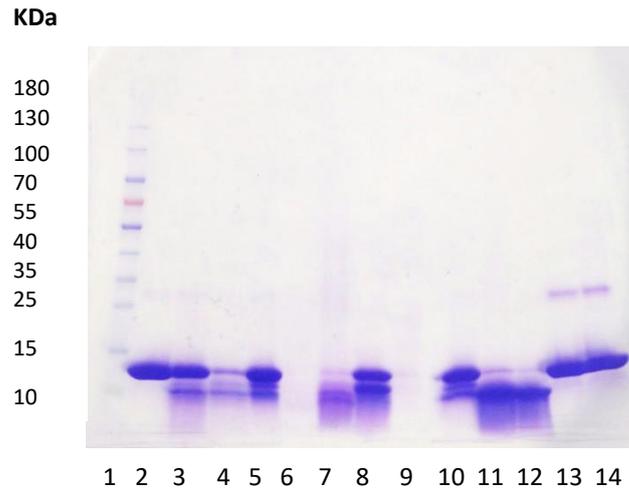


Figura 28. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4–20 %) en condiciones reductoras de muestras de α -lactalbúmina bovina no tratada y tratada con diferentes proteasas. Entre paréntesis se indica el pH, la temperatura y el tiempo de tratamiento (h).

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Marcador de peso molecular. | 8. Detergente |
| 2. α -lactalbúmina sin tratar | 9. Páncreas bovino (7/37/2) |
| 3. Alcalasa (7/50/2) | 10. Ext. sardina (2) (3,5/50/2) |
| 4. Pronasa (7/37/2) | 11. Ext. bazo porcino (3,5/37/2) |
| 5. Quimosina (3,5/37/2) | 12. Ext. bazo bovino (3,5/37/2) |
| 6. Quimotripsina (7/50/2) | 13. Cuajo animal (3,5/37/2) |
| 7. Ext. sardina (1) (3,5/50/2) | 14. Cuajo microbiano (3,5/37/2) |

Los resultados obtenidos indican que, exceptuando la incubación con los dos tipos de cuajos utilizados, todas las proteasas son capaces de producir en mayor o menor medida la degradación de la proteína, donde se observa por electroforesis la disminución de la intensidad de la banda de 14 kDa y la aparición de bandas de menor peso molecular. Cuando se realizó la incubación con quimotripsina o con la proteasa de páncreas bovino, se observó la desaparición de la banda de 14 kDa y no se observaron bandas de menor peso molecular, lo que sugiere una degradación más extensa a péptidos de menor tamaño que no se visualizan por electroforesis.

4.9.5.1. Ensayos de proteólisis en la proteína Pru p 3

Los resultados obtenidos en los ensayos de proteólisis de la proteína Pru p 3 se muestran en la **Figura 29**. En estos experimentos se utilizaron las condiciones óptimas de pH y temperatura de los enzimas ensayados y en algunos casos, otras condiciones. Como se puede observar, la mayoría de los enzimas ensayados tiene poco efecto en la degradación de la Pru p 3 a excepción de la pronasa, la quimotripsina y la proteinasa K,

con las que se observa una marcada disminución de la intensidad de la banda de 9 kDa a sus pHs y temperaturas óptimas y, sobre todo, con el extracto de páncreas bovino y las proteasas ácidas 1 y 2. En las muestras incubadas con estos últimos enzimas no se visualiza la banda de proteína nativa ni bandas de menor peso molecular, lo que indica que los hidrolizados contienen péptidos de un peso molecular muy bajo. Además, cabe destacar que cuando la proteinasa K se incubó a pH 6, la capacidad de degradación fue mucho menor que a su pH óptimo; y a pH ácido, no se apreció cambio en la intensidad de la banda de Pru p 3 respecto a la muestra sin tratar. Por otra parte, las bandas de mayor peso molecular que se observan en algunas muestras y que no están presentes en la proteína sin tratar, corresponden a las proteínas presentes en los extractos enzimáticos.

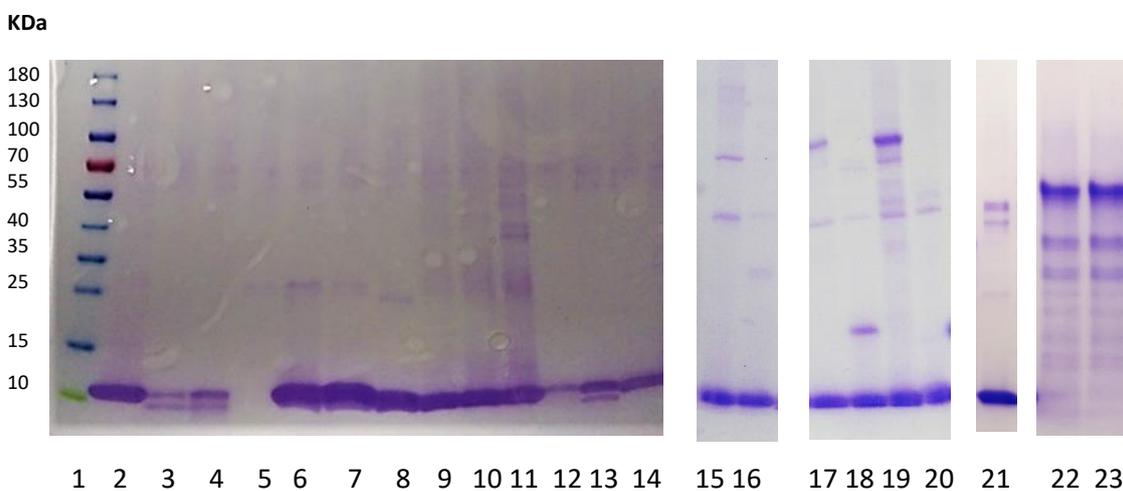


Figura 29. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4–20 %) en condiciones reductoras de muestras de Pru p 3 no tratada y tratadas con proteasas. Entre paréntesis se indica el pH, la temperatura (°C) y el tiempo de tratamiento (h).

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1. Patrón pesos moleculares | 13. Proteinasa K (6/65/2) |
| 2. Pru p 3 sin tratar | 14. Proteinasa K (3,5/65/2) |
| 3. Pronasa (7/37/2) | 15. Alcalasa (7/50/2) |
| 4. Quimotripsina (7/50/2) | 16. Quimosina (3,5/37/2) |
| 5. Páncreas bovino (7/37/2) | 17. Cuajo microbiano (3,5/37/2) |
| 6. Papaína (6/65/2) | 18. Cuajo animal (3,5/37/2) |
| 7. Bromelaína (6/50/2) | 19. Coagulante vegetal (3,5/37/2) |
| 8. Ficina (6/50/2) | 20. Pepsina (3,5/37/2) |
| 9. Bazo porcino (3,5/37/2) | 21. <i>Rhizopus</i> (3,5/50/2) |
| 10. Bazo bovino (3,5/37/2) | 22. Proteasa ácida 1 (3,5/50/2) |
| 11. Sardina (3,5/50/2) | 23. Proteasa ácida 2 (3,5/37/2) |
| 12. Proteinasa K (7/65/2) | |

El pH del melocotón se encuentra en torno a 3,5, por lo que las proteasas que eventualmente podrían usarse durante el procesado para conseguir degradar la Pru p 3, deberían ser capaces de tener una actividad eficiente a ese pH. Por ello, se hicieron algunos experimentos adicionales con el extracto de páncreas bovino, que había mostrado una marcada degradación de la proteína Pru p 3, utilizando otras condiciones cuyos resultados se muestran en la **Figura 30**. Los resultados obtenidos indican que a pH 7 y 25 °C, la degradación es muy intensa, como se ha indicado anteriormente. Se observa también como a pH 7 y a 25 °C, los diferentes tiempos de incubación ensayados muestran un resultado similar. Sin embargo, cuando la incubación se realiza a 4 °C o a pHs más ácidos, la actividad del enzima disminuye considerablemente y se compensa sólo en parte alargando el tiempo de incubación, aunque no alcanza la degradación que se observa a pH 7. Estos resultados sugieren que esta proteasa no podría ser usada en la industria de los derivados de frutas ya que las condiciones de pH que son efectivas inducirían el pardeamiento del producto.

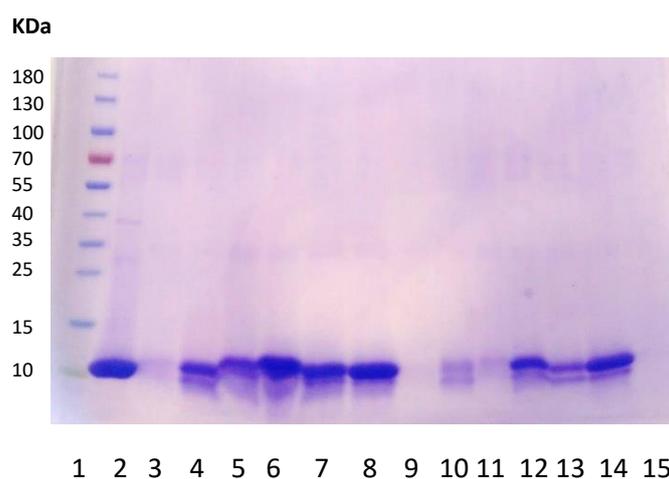


Figura 30. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4–20 %) en condiciones reductoras. Incubación de Pru p 3 con proteasa del páncreas bovino en diferentes condiciones. Entre paréntesis se indica el pH, la temperatura en °C y el tiempo de tratamiento en h.

- | | |
|------------------------------------|---------------|
| 1. PM, marcador de peso molecular. | 9. (7/25/72) |
| 2. Pru p 3 sin tratar. | 10. (7/4/72) |
| 3. (7/25/24) | 11. (6/25/72) |
| 4. (7/4/24) | 12. (6/4/72) |
| 5. (6/25/24) | 13. (5/25/72) |
| 6. (6/4/24) | 14. (5/4/72) |
| 7. (5/25/24) | 15. (7/37/72) |
| 8. (5/4/24) | |

En vista de los resultados obtenidos, se seleccionaron las proteasas ácidas 1 y 2 para determinar su efecto en la proteína Pru p 3 fijando el pH a 3,5 pero variando otras condiciones de incubación. Los ensayos a 25 °C durante 2 h con diferentes relaciones enzima/sustrato, desde 0,1 a 1% P/V (siendo 1% la utilizada para los ensayos anteriores) mostraron una degradación similar (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que la degradación de la Pru p 3 se podría llevar a cabo durante el proceso de clarificación del zumo a 50 °C durante 2 h o tras el proceso de elaboración del zumo, añadiendo el enzima esterilizado por filtración y manteniendo el producto a temperatura ambiente o en refrigeración. Como el producto terminado tarda en liberarse unos días, la proteína Pru p 3 podría ser degradada eficientemente antes de salir al mercado. Esta práctica de degradar un componente alimentario que induce efectos adversos en personas sensibilizadas es ya una práctica habitual en el mercado de las leches sin lactosa para intolerantes. En estas leches, el enzima lactasa se suele añadir estéril al producto terminado para que actúe durante el tiempo que el producto debe permanecer en fábrica para realizar los controles de calidad pertinentes, antes de salir a venta (Harju et al., 2012).

Hasta la fecha se han publicado pocos estudios sobre el efecto que tiene la degradación con proteasas en la proteína Pru p 3. Brenna et al., (2000) realizaron ensayos con las proteasas comerciales de *Rhizopus* spp. y *Aspergillus saitoi* y no observaron disminución de la intensidad de la banda de proteína mediante electroforesis, lo que indica que es resistente a la acción de dichos enzimas. Wijesinha-Bettoni et al., (2010) realizaron un ensayo de digestión gastrointestinal simulada utilizando pepsina, tripsina y quimotripsina. Estos autores observaron que la Pru p 3 es resistente a la digestión gástrica y es lentamente degradada durante la digestión duodenal, quedando una parte de la proteína intacta y produciéndose la escisión de sólo 1-2 de los potenciales sitios de ruptura de la tripsina y quimotripsina, dando lugar a péptidos de peso molecular de 7939 Da. Esta elevada resistencia se ha atribuido a la rigidez estructural de la proteína a la que probablemente contribuyen los cuatro puentes disulfuro que la estabilizan.

Los hidrolizados obtenidos con las proteasas ácidas 1 y 2 se analizaron mediante la técnica ELISA sandwich y se caracterizaron mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF. Como control se incluyó también en estos experimentos la proteasa ácida de *Rhizopus*.

Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA sandwich (**Figura 31**), mostraron que la inmunoreactividad de la Pru p 3 incubada a pH 3,5 en las dos condiciones ensayadas (50 °C, 2 h y 25 °C 24 h) disminuyó más del 97%, mientras que la inmunorreactividad de la proteasa de *Rhizopus* incluso aumentó un 20%. Así mismo, se obtuvieron unos resultados similares cuando la incubación con la proteasa ácida se realizó con extracto o con zumo de melocotón comercial, obteniendo una disminución de la reactividad con las IgG mayor del 93%.

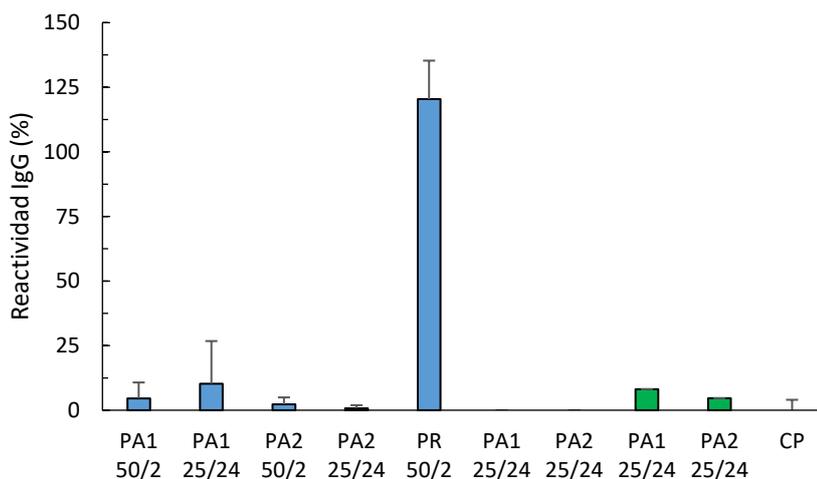


Figura 31. Degradación de la proteína Pru p 3 tras el tratamiento con las proteasas ácidas 1 y 2 y de *Rhizopus*, determinada mediante la técnica ELISA sandwich. Pru p 3 (•), extracto de piel de melocotón (◦) y zumo de melocotón comercial (◐). En el eje de abscisas se indica el tipo de proteasa: proteasa ácida 1 (PA1), proteasa ácida 2 (PA2) y proteasa de *Rhizopus* (PR), así como las condiciones de temperatura (°C) y el tiempo de incubación (h) y la PA1 control sin proteína (CP). Los resultados son la media ± desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresa como porcentaje de la muestra sin tratar (control, 100%).

El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (**Anexo VIa-d**) muestra que la proteína sin tratar presenta un pico de peso molecular de 9134 Da correspondiente a la Pru p 3 nativa. El pico de 4571 Da que se observa en esta muestra corresponde al ión molecular de la proteína ionizado con carga +2.

En los hidrolizados obtenidos con la proteasa ácida 2, no se observa el pico de 9 kDa y los péptidos predominantes obtenidos tienen un peso molecular inferior a 3,2 kDa y 1,8 kDa, para los tratamientos a 50 °C/2 h y 25 °C/24 h, respectivamente. Sin embargo, la muestra incubada con *Rhizopus* muestra un perfil cromatográfico similar al de la proteína nativa, lo que indica que no es capaz de degradar la Pru p 3. También se analizó el perfil de la proteasa, que no mostró picos en el rango de peso molecular de 0 a 20 kDa pero sí a un peso molecular mayor (resultados no mostrados).

Las fórmulas infantiles hidrolizadas obtenidas a partir de proteínas de leche bovina que van destinadas a la alimentación de niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca deben cumplir los requisitos de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPHGAN), que indican que los péptidos presentes en dichas fórmulas deben tener un tamaño menor a 3 kDa y estar dominados por péptidos con un tamaño de aproximadamente 1,5 kDa. Estos péptidos parecen contener sólo un epítipo lineal por lo que no serían capaces de entrecruzar las IgE en la superficie de los mastocitos tisulares y los basófilos sanguíneos, evitando así la aparición de la reacción alérgica (Fiocchi et al., 2016; Meulenbroek et al., 2014).

De acuerdo a este criterio, el tratamiento a 25°C durante 24 h sería capaz de producir un zumo potencialmente hipoalergénico al presentar en su mayoría péptidos de 1,8 kDa o menores.

Una vez confirmada la extensa degradación obtenida con las proteasas ácidas 1 y 2 por las técnicas utilizadas previamente, se procedió a realizar experimentos para determinar cómo afecta la degradación a las propiedades alérgicas de la Pru p 3. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 32**. Como se puede observar, los ensayos de Pru p 3 con las proteasas ácidas 1 y 2 a 50 °C durante 2 h o a 25 °C durante 24 h indican que la reactividad con las IgE disminuye hasta un 39% y un 32% para el pool SA, hasta un 24 % y 17 % para el pool SAO y hasta un 20 % y 19 % para el pool UCS, respectivamente. En el caso de la proteasa 2 estos valores disminuyeron hasta un 49 % y 46% para el pool SA, hasta un 13% y 22% para el pool SAO y un 16% y 23% para el pool UCS. Sin embargo, la muestra de Pru p 3 incubada con la proteasa de *Rhizopus* no disminuyó la reactividad de la Pru p 3 con las IgE.

Las diferencias en la disminución de la reactividad de las IgE con respecto a las IgG se deben probablemente a que los epítipos que son reconocidos por las IgG se ven más afectados por la hidrólisis que los que reaccionan con las IgE.

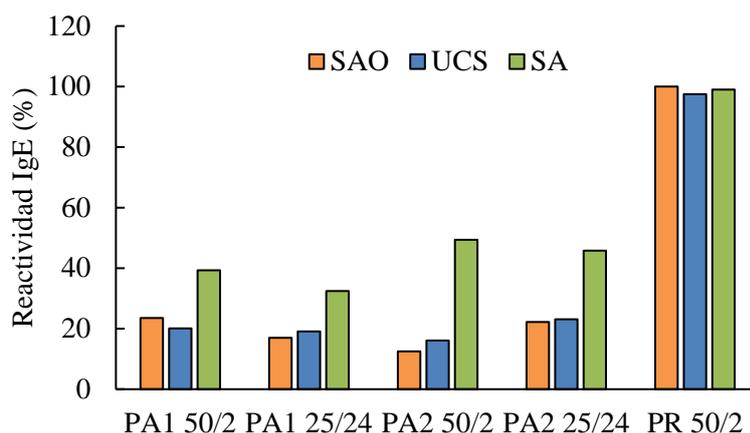


Figura 32. Efecto del tratamiento con las proteasas ácidas en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 determinada mediante la técnica de inmunofluorescencia de tipo competitivo indirecto usando los pools de sueros SAO, UCS y SA. En el eje de abcisas se indica el tipo de proteasa: proteasa ácida 1 (PA1), proteasa ácida 2 (PA2) y proteasa de *Rhizopus* (PR), así como las condiciones de temperatura (°C) y el tiempo de incubación (h). El resultado se expresa como porcentaje de la muestra sin tratar (control, 100%).

Cuando se realizaron ensayos con extracto y con zumo de melocotón comercial incubados con la proteasa ácida 1 a 25 °C durante 24 h y con el pool SA (**Figura 33**), se observó una disminución más marcada de la reactividad, mayor a la obtenida con la proteína pura. Este hecho se podría atribuir a la menor concentración de Pru p 3 presente en el extracto y en el zumo.

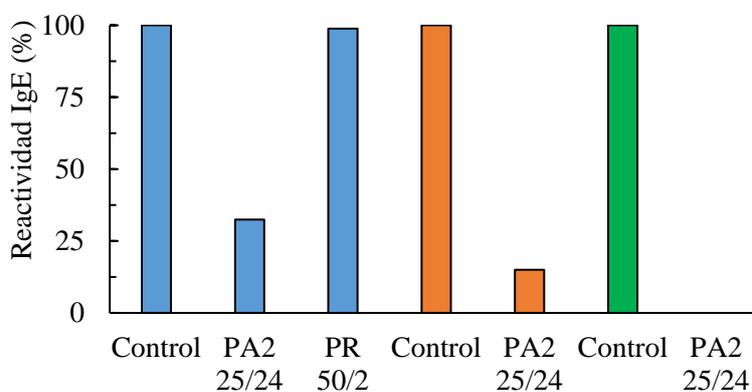


Figura 33. Efecto del tratamiento con la proteasa ácida 2 en la alergenicidad de la proteína Pru p 3 (•), extracto de piel de melocotón (◦) y zumo de melocotón comercial (◐) determinada mediante la técnica de inmunofluorescencia de tipo competitivo indirecto usando el pool SA. En el eje de abcisas se indica el tipo de proteasa: proteasa ácida 2 (PA2) y proteasa de *Rhizopus* (PR), así como las condiciones de temperatura (°C) y el tiempo de incubación (h). El resultado se expresa como porcentaje de las correspondientes muestras sin tratar (control, 100%).

Nuestros resultados están de acuerdo a los obtenidos por Brenna et al. (2000) mediante Wester-blotting, quienes indicaron que los hidrolizados obtenidos tras el tratamiento de néctar o zumo de melocotón con la proteasa de *Rhizopus* sp. no disminuía la reactividad

de la Pru p 3 con las IgE de sueros de pacientes alérgicos al melocotón. Así mismo, estos autores no observaron tampoco una disminución en la reactividad de las IgE con las mismas muestras tratadas con la proteasa de *Aspergillus saitoi*. En el estudio de Cavatorta et al. (2010), estos autores observaron que tras realizar la digestión simulada gastrointestinal, la mayor parte de la proteína permanecía intacta y una parte era degradada a péptidos de diferentes tamaño. La separación de los péptidos obtenidos por filtración en gel mostró que sólo aquellos de bajo peso molecular (menor a 1 kDa) perdieron la capacidad de reaccionar con las IgE mientras que los de alto peso molecular (mayor de 5 kDa) mantenían dicha reactividad.

Por otra parte, los ensayos realizados en este estudio con los hidrolizados de Pru p 3 obtenidos con las proteasas ácidas 1 y 2 mediante la técnica de prick test se muestran en las **Tablas 17 y 18**. En la **Tabla 17** se recogen los resultados del producto de los diámetros de los habones de los pacientes y en la **Tabla 18** estos resultados expresados como porcentaje del producto del habón respecto al de las correspondientes muestras sin tratar. Los resultados obtenidos con las proteasas ácidas 1 y 2 muestran una considerable, aunque variable, disminución del tamaño del habón respecto a las correspondientes muestras sin tratar. Para las muestras tratadas con la proteasa de *Rhizopus*, se observó una gran variabilidad en la respuesta con una marcada tendencia al incremento del tamaño del habón. En el caso de los hidrolizados de zumo, la disminución del tamaño del habón ha sido mayor que con la proteína pura a excepción del paciente LTP010, en el que no se observaron diferencias o incluso se produjo un aumento del habón con respecto al control. En cuanto a la respuesta de las proteasas, sólo el 10% de los pacientes desarrollaron habón tras la punción con la proteasa ácida 2 y éste fue menor al obtenido con el control positivo de histamina.

En la **Tabla 19** se recoge el número de pacientes alérgicos que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenidad en las pruebas de prick test. Como se puede observar, en el 90% de los pacientes el habón desarrollado tras la punción de los hidrolizados obtenidos con las proteasas ácidas es mucho menor que el obtenido con la correspondiente muestra sin tratar. El tamaño medio del habón ha disminuido hasta valores de entre 15% y 28% para la proteína pura y hasta un 5% para el zumo, siendo en muchos casos el habón menor al de la histamina.

Sin embargo, en el caso de la proteasa de *Rhizopus*, el 45 % de los pacientes mostraron una disminución del tamaño del habón, hasta un valor promedio de 53,9 %, mientras que el 50 % de los pacientes mostraron un aumento, hasta un valor promedio de 222% y tan solo el 5% no mostraron cambios.

Tabla 17. Efecto del tratamiento de la Pru p 3 y del zumo de melocotón con las proteasas ácidas y de *Rhizopus* en la alergenicidad de la Pru p 3 determinada mediante prick test en pacientes alérgicos a melocotón. Los resultados corresponden al producto de los diámetros del habón y C a la muestra control sin tratar o a la proteasa disuelta en tampón sin Pru p 3 (CP). El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Producto de los diámetros del habón									
	Pru p 3						Zumo			Tampón
	C	PA1/ 50	PA1/ 25	PA2/ 50	PA2/ 25	PR/ 50	C	PA1/ 25	PA2/ 25	CP
LTP001	80	8	12	0	12	112	24	0	0	0
LTP002	36	16	16	9	9	70	16	0	0	0
LTP003	80	16	9	16	0	98	25	0	0	0
LTP004	80	16	16	9	9	140	30	0	0	0
LTP005	168	42	36	25	56	320	48	0	0	0
LTP006	260	16	12	16	20	84	20	0	0	0
LTP007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP008	240	35	25	25	16	126	42	0	0	0
LT009	112	56	20	20	20	56	70	0	0	9
LTP010	63	30	8	8	12	72	8	8	12	15
LTP011	180	36	16	16	25	90	192	42	0	0
LTP012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP014	930	200	144	140	98	480	220	80	60	72
LTP015	168	128	60	98	35	390	63	36	0	0
LTP016	63	12	0	0	0	72	20	0	0	0
LTP017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP018	144	0	0	16	20	56	0	0	0	0
LTP019	180	0	0	25	0	160	66	0	0	0
LTP020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP022	56	36	20	16	0	325	63	0	0	0
LTP023	30	0	0	0	0	12	6	0	0	0
LTP024	36	35	30	16	12	120	40	0	0	0
LTP025	192	0	0	0	0	112	0	0	0	0
LTP026	192	25	20	16	0	120	36	0	0	0
LTP027	126	35	0	64	56	160	70	0	16	0

Tabla 18. Efecto del tratamiento de la Pru p 3 y del zumo de melocotón con las proteasas ácidas y de *Rhizopus* en la alergenicidad de la Pru p 3 determinada mediante prick test en pacientes alérgicos al melocotón. Los resultados se expresan como el porcentaje del producto de los diámetros del habón con respecto a la muestra control sin tratar (100%). El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Alergenicidad (%)								
	Pru p 3						Zumo		
	C	PA1/ 50	PA1/ 25	PA2/ 50	PA2/ 25	PR/ 50	C	PA1/ 25	PA2/ 25
LTP001	100	10	15	0	15	140	100	0	0
LTP002	100	44	44	25	25	194	100	0	0
LTP003	100	20	11	20	0	123	100	0	0
LTP004	100	20	20	11	11	175	100	0	0
LTP005	100	25	21	15	33	190	100	0	0
LTP006	100	6	5	6	8	32	100	0	0
LTP007	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP008	100	15	10	10	7	53	100	0	0
LTP009	100	50	18	18	18	50	100	0	0
LTP010	100	48	13	13	19	114	100	100	150
LTP011	100	20	9	9	14	50	100	22	0
LTP012	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP013	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP014	100	22	15	15	11	52	100	36	27
LTP015	100	76	36	58	21	232	100	57	0
LTP016	100	19	0	0	0	114	100	0	0
LTP017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP018	100	0	0	11	14	39	0	0	0
LTP019	100	0	0	14	0	89	100	0	0
LTP020	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTP022	100	64	36	29	0	580	100	0	0
LTP023	100	0	0	0	0	40	100	0	0
LTP024	100	97	83	44	33	333	100	0	0
LTP025	100	0	0	0	0	58	0	0	0
LTP026	100	13	10	8	0	63	100	0	0
LTP027	100	28	0	51	44	127	280	0	64

Tabla 19. Número de pacientes alérgicos al melocotón (n) que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenicidad en la prueba del prick test frente a Pru p 3 y zumo de melocotón en muestras tratadas con las proteasas ácidas 1 y 2 (PA1 y PA2) y la de *Rhizopus* (PR). X (%) corresponde al valor medio de los porcentajes de productos de los diámetros del habón para cada grupo. El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h.

Muestra	Proteasa	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3
		Disminuye alergenicidad		Aumenta alergenicidad		Sin cambios
		X (%)	n	X (%)	n	n
Pru p 3	PA1 (50/2)	28,4	20	-	0	2
	PA1 (25/24)	15,1	21	133	1	0
	PA2 (50/2)	14,9	21	150	1	0
	PA2 (25/24)	15,2	21	106	1	0
	PR (50/2)	53,9	10	222	11	1
Zumo	PA1 (25/24)	4,8	21	-	0	1
	PA2 (25/24)	4,7	21	150	1	0

4.9.5.2. Ensayos de proteólisis en la proteína Mal d 3

Los resultados obtenidos en los ensayos de proteólisis de la proteína Mal d 3 se muestran en la **Figura 34**. Los experimentos se han realizado en las condiciones óptimas de pH y temperatura de cada enzima. Como se puede observar, los resultados son similares a los obtenidos con la Pru p 3. La mayoría de los enzimas muestran poco efecto en la degradación de la Mal d 3, a excepción de la pronasa, la quimotripsina y la tripsina, con las que se observa una disminución de la intensidad de la banda de 9 kDa. En el caso de las muestras incubadas con la proteasa del páncreas bovino, la proteinasa K y las proteasas ácidas 1 y 2, no se visualiza la banda de proteína ni bandas de menor tamaño, indicando una degradación muy extensa,

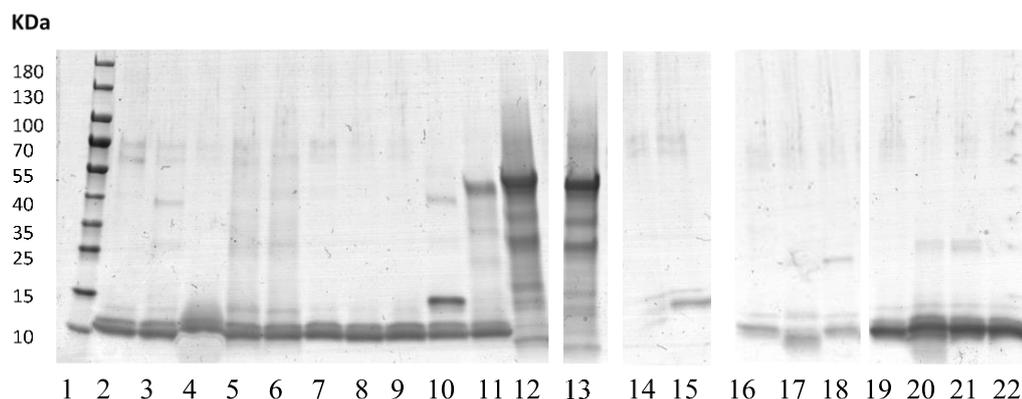


Figura 34. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4–20 %) en condiciones reductoras de muestras de Mal d 3 no tratada y tratadas con diferentes proteasas. Entre paréntesis se indica el pH, la temperatura y el tiempo de tratamiento.

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. Marcador PM | 12. Proteasa ácida 1(3,5/50/2) |
| 2. Mal d 3 sin tratar | 13. Proteasa ácida 2 (3,5/50/2) |
| 3. Quimosina (3,5/37/2) | 14. Páncreas bovino (7/37/2) |
| 4. Sardina (3,5/50/2) | 15. Proteinasa K (7/65/2) |
| 5. Bazo bovino (3,5/37/2) | 16. Pronasa (7/37/2) |
| 6. Bazo porcino (3,5/37/2) | 17. Quimotripsina (7/50/2) |
| 7. Pepsina (3,5/37/2) | 18. Tripsina (7/37/2) |
| 8. <i>Rhizopus</i> (3,5/50/2) | 19. Alcalasa (7/50/2) |
| 9. Cuajo animal (3,5/37/2) | 20. Papaina (6/65/2) |
| 10. Cuajo microbiano (3,5/37/2) | 21. Bromelaina (6/65/2) |
| 11. Coagulante vegetal | 22. Ficina (6/65/2) |

En base a los resultados obtenidos en el estudio de proteólisis de la Pru p 3, se decidió ensayar el efecto en la Mal d 3 de una de las proteasas ácidas, por ser las que habían mostrado una mayor efectividad en degradar y disminuir la alergenicidad de la proteína del melocotón

Los resultados obtenidos al analizar las muestras mediante la técnica ELISA sandwich mostraron que la inmunorreactividad disminuyó más de un 97% en los hidrolizados de obtenidos con la proteasa ácida 2 incubada en dos condiciones de pH y temperatura (37 °C durante 2 h y 25 °C durante 24 h), mientras que la incubada con *Rhizopus* solo disminuyó un 12% (**Figura 35**).

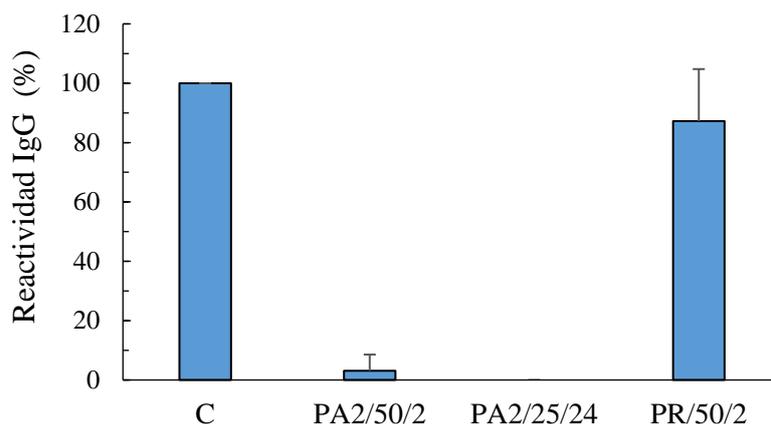


Figura 35. Degradación de la proteína Mal d 3 tras el tratamiento con la proteasa ácida 2 (PA2) y de *Rhizopus* (PR) determinada mediante la técnica ELISA sandwich. En el eje de abscisas se indica el tipo de proteasa, las condiciones de temperatura (°C) y el tiempo de incubación (h). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado y se expresa como porcentaje de la muestra sin tratar (Control, 100%).

El análisis de los hidrolizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se muestra en los **Anexos VII (a-d)**. Los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados con la proteína Pru p 3. La proteína sin tratar mostró un pico mayoritario de 9074 Da correspondiente a la proteína nativa y el pico de 4537 Da del ión molecular +2 (**Anexo VII**). El perfil obtenido con la proteasa de *Rhizopus* (**Anexo VII d**) fue similar al de la proteína nativa, lo que indica que este enzima no fue capaz de degradar la Mal d 3. En los hidrolizados obtenidos con la proteasa ácida 2, no se observa el pico de 9074 Da, y los péptidos obtenidos tienen pesos moleculares menores a 3698 Da y 1491 Da tras la incubación a 50 °C durante 2 h y a 25 °C durante 24 h, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos con la proteína Pru p 3 e indican que la degradación es más efectiva a tiempos más largos, aunque se realicen a una temperatura menor a la óptima.

Para determinar el efecto de los hidrolizados obtenidos con la proteasa ácida 2 en la alergenidad de la Mal d 3, se realizaron pruebas de prick test y se determinó la reactividad con las IgE. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 36** y en las **Tablas 20 y 21**.

De los individuos alérgicos reclutados, sólo el 40 % presentaron la cantidad de IgE específica frente a Mal d 3 necesaria para poder llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia de tipo competitivo. Por ello, en este caso dichos ensayos se realizaron con los sueros individuales. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la reactividad con las IgE mayor del 72%, siendo prácticamente del 100%

en los individuos 6, 7 y 9, a pesar de que los tres presentaban un nivel de IgE específica alta, 33,6, 10,7 y 5,65, respectivamente. En las muestras de Mal d 3 incubadas con la proteasa de *Rhizopus*, los pacientes mostraron una disminución de la reactividad menor del 6%.

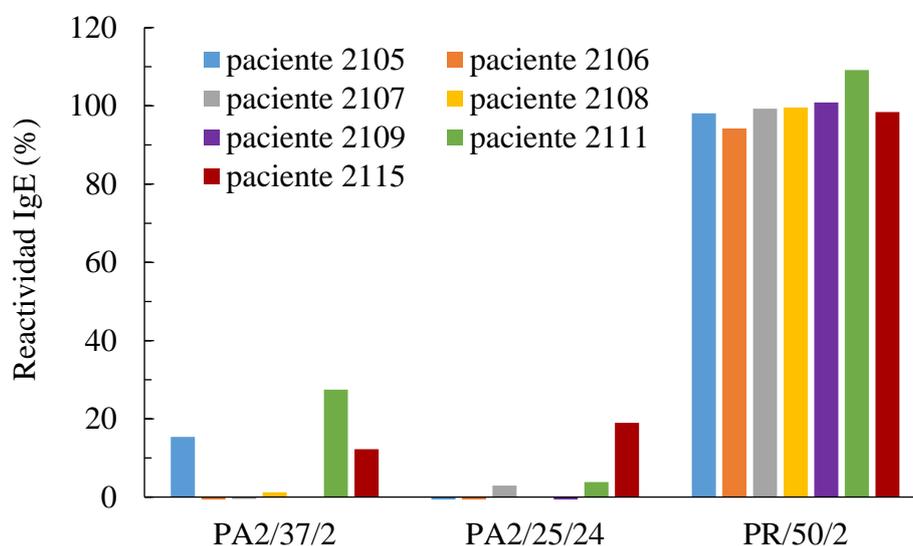


Figura 36. Efecto del tratamiento con la proteasa ácida 2 y la proteasa de *Rhizopus* en la alergenicidad de la proteína Mal d 3 determinada mediante la técnica de inmunofluorescencia de tipo competitivo indirecto usando sueros de pacientes sensibilizados a manzana. Los resultados se expresan como el porcentaje respecto a la proteína sin tratar (100%). En el eje de abcisas se indica el tipo de proteasa: proteasa ácida 2 (PA2) y proteasa de *Rhizopus* (PR), las condiciones de temperatura (°C) y el tiempo de incubación (h).

En la **Tabla 20** se muestra el producto de los diámetros del habón y en la **Tabla 21** el porcentaje del producto de los mismos respecto a su correspondiente control.

El producto de los diámetros del habón producido por el hidrolizado obtenido con la proteasa ácida 2 tenía un tamaño menor que el control en el 92 % de los pacientes para el tratamiento a 50 °C durante 2 h y en el 85% de los pacientes para el tratamiento a 25 °C durante 24 h, y en el 10 % de los pacientes no se observaron cambios. Por el contrario, con la muestra tratada con la proteasa de *Rhizopus*, el 80% de los pacientes mostraron un aumento del producto de los diámetros del habón, en el 15% de los pacientes disminuyó y en el 5 % no se vio modificado.

Tabla 20. Efecto del tratamiento de la Mal d 3 con la proteasa ácida 2 (PA 2) y la de *Rhizopus* (PR) en su alergenicidad determinada mediante prick test en pacientes alérgicos a manzana. Los resultados corresponden al producto de los diámetros del habón y C a la muestra control sin tratar. El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Producto de los diámetros del habón			
	C	PA 2 50/2	PA2 25/24	PR 50/2
2101	-	-	-	-
2102	72	9	12	132
2103	70	12	16	84
2104	9	4	9	20
2105	132	27	70	162
2106	132	12	60	42
2107	119	16	54	165
2108	63	24	63	72
2109	30	0	4	20
2110	-	-	-	-
2111	72	24	40	225
2112	-	-	-	-
2113	90	12	20	154
2114	42	12	12	42
2115	66	66	30	216
2116	12	0	0	0
2117	99	35	0	108
2118	-	-	-	-

Tabla 21. Efecto del tratamiento con la proteasa ácida 2 (PA2) y la de *Rhizopus* (PR) en la alergenicidad de la Mal d 3 determinada mediante prick test en pacientes alérgicos a manzana. Los resultados se expresan como el porcentaje del producto del diámetro del habón con respecto a la muestra Control sin tratar (100%). El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Alergenicidad (%)			
	C	PA 2 50/2	PA 2 25/24	PR 50/2
2101	-	-	-	-
2102	100	12,5	16,7	183,3
2103	100	17,1	22,9	120
2104	100	44,4	100	222
2105	100	20,5	53	122,7
2106	100	9,1	45,5	31,8
2107	100	13,4	45,4	138,7
2108	100	38,1	103,2	114,3
2109	100	0	13,3	66,7
2110	-	-	-	-
2111	100	33,3	55,6	312,5
2112	-	-	-	-
2113	100	13,3	22,2	171,1
2114	100	28,6	28,6	100
2115	100	100	45,5	327,3
2116	100	0	0	0
2117	100	35,4	0	109,1
2118	-	-	-	-

En la **Tabla 22** se recoge el número de pacientes alérgicos que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenicidad en las pruebas del prick test. Los resultados mostraron que la disminución del tamaño medio del habón fue de un 65 % y un 78 % para la hidrólisis realizada a 50 °C durante 2 h y a 25 °C durante 24 h. En el caso de la proteasa de *Rhizopus*, el tamaño medio del habón disminuyó en 2 pacientes hasta un 50% y en 10 pacientes aumentó un 72%.

Tabla 22. Número de pacientes alérgicos a la manzana (n) que mostró un aumento, ningún cambio o una disminución de la alergenicidad en la prueba del prick test frente a Mal d 3 en muestras tratadas con la proteasa ácida 2 (PA2) y la de *Rhizopus* (PR). X (%) corresponde al valor medio de los porcentajes de los productos del diámetro del habón para cada grupo. El tiempo de incubación de los tratamientos a 50 °C fue de 2 h y a 25 °C de 24 h.

Muestra	Proteasa	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3
		Disminuye alergenicidad		Aumenta alergenicidad		Sin cambios
		X (%)	n	X (%)	n	n
Mal d 3	PA2 (50/2)	22,1	12	100	1	-
	PA2 (25/24)	34,9	11	-	-	2
	PR (50/2)	49,2	2	171,6	10	1

4.2. Efecto de la madurez y el almacenamiento postcosecha en la composición y contenido en Mal d 3 de diferentes variedades de manzana

El grado de madurez en el momento de la recolección y las condiciones de almacenamiento postcosecha tienen una gran influencia en la calidad y vida útil de las frutas. Durante la madurez, el contenido en nutrientes evoluciona para alcanzar los atributos sensoriales que son deseables para su consumo. Así mismo, las condiciones de almacenamiento son factores importantes para mantener la frescura y buena calidad de los frutos durante el periodo que dura la conservación hasta su salida al mercado. Además, el grado de madurez de la fruta y las condiciones de conservación tras la recolección han mostrado también tener influencia en el contenido en proteínas alergénicas presentes en la fruta (Wang et al., 2019).

En este trabajo, se ha determinado el efecto de la madurez y la conservación en AC en el contenido en proteína Mal d 3 en la piel de diferentes variedades de manzana. La concentración de Mal d 3 se ha determinado mediante la técnica ELISA sandwich desarrollada. Además, se han determinado los parámetros de firmeza, contenido en SST y grado de acidez, indicativos de la madurez de la fruta, así como el contenido en proteína y el perfil proteico de la piel de la fruta.

4.2.1. Valores de firmeza, contenido en sólidos solubles totales y acidez

Los valores de la firmeza, el contenido en SST, y la acidez de las variedades de manzana ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Verde Doncella’ y ‘Red Story’ en el grado de madurez comercial óptimo se muestran en la **Figura 37a, b y c**. Como se puede observar, la variedad Golden es la que presenta una mayor firmeza, la variedad ‘Red Story’ un mayor contenido en SST y la variedad ‘Granny Smith’ una mayor acidez.

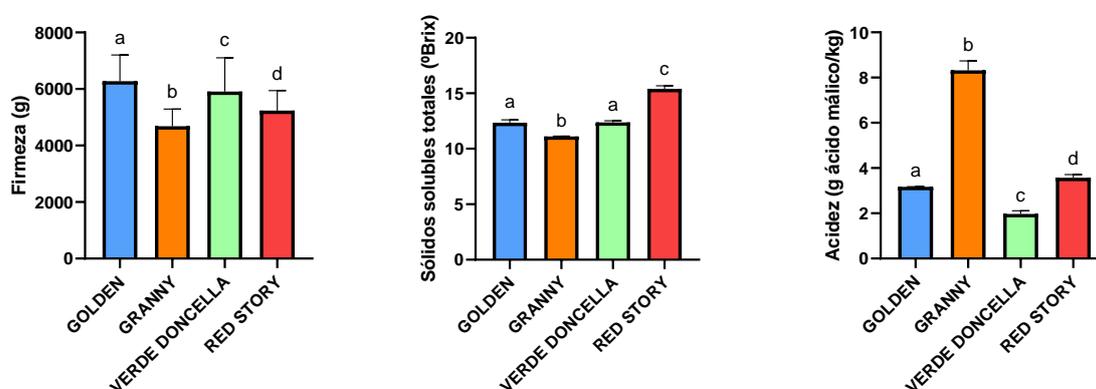


Figura 37. (a) Firmeza, (b) contenido en sólidos solubles totales y (c) acidez titulable de las cuatro variedades de manzana en el grado de madurez comercial óptimo. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

En la **Figura 38** se muestran los valores del parámetro de firmeza de cada variedad de manzana en los diferentes grados de madurez y periodo de almacenamiento. En la semana posterior al grado de madurez comercial óptimo (+1), se observó en la mayoría de las variedades un descenso significativo de la firmeza, que fue mayor en las variedades ‘Verde Doncella’ y ‘Golden Delicious’. Además, en estas variedades tuvo lugar también una considerable disminución de la firmeza desde el primer mes de almacenamiento, siendo a los siete meses los valores 25 % y 55% menores, respectivamente, con respecto al grado de madurez óptimo. Sin embargo, en las variedades ‘Red Story’ y ‘Granny Smith’ no se observó una disminución de la firmeza tras los siete meses de almacenamiento en AC.

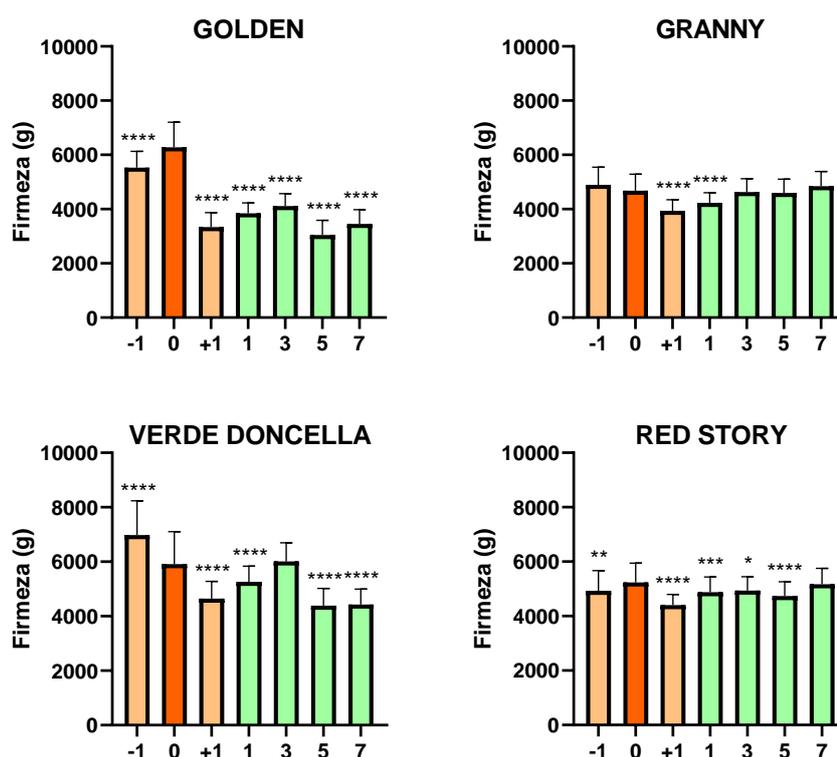


Figura 38. Valores de firmeza expresada en gramos (g) de las diferentes variedades de manzana en los distintos grados de madurez comercial y durante el almacenamiento en refrigeración en atmósfera controlada. Los números del eje de abscisas corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grado de madurez óptimo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

Skic et al. (2016) estudiaron la evolución de la firmeza de las variedades de manzana ‘Ligol’ y ‘Szampion’ recolectadas en Grojec, Polonia en el periodo del 3 de julio al 4 de octubre, y observaron que este parámetro disminuyó significativamente, así como durante 3 meses de almacenamiento en refrigeración a 2 °C. Así mismo, Gonçalves et al., 2017 observaron una clara evolución de la maduración de manzanas en el árbol, caracterizada por una reducción de la firmeza.

Los supermercados utilizan el contenido de SST como estándar comercial y requieren un valor mínimo de °Brix que sea comercialmente aceptable. También sirven como medida de dulzura y sabor y para determinar el momento de la cosecha y posterior venta, a menudo combinados con la firmeza. (Kader, 2002).

El contenido en SST de cada variedad de manzana en los diferentes grados de madurez y periodo de almacenamiento se muestra en la **Figura 39**. Durante la maduración, se observó para las variedades ‘Granny Smith’ y ‘Golden Delicious’ un pequeño incremento en SST, menor al 8 % y durante el almacenamiento, un pequeño incremento en las variedades ‘Verde Doncella’ y ‘Granny Smith’, con valores de aproximadamente un 7% y un 15% mayores cuando se comparan las muestras a los 7 meses de almacenamiento respecto al grado óptimo de madurez.

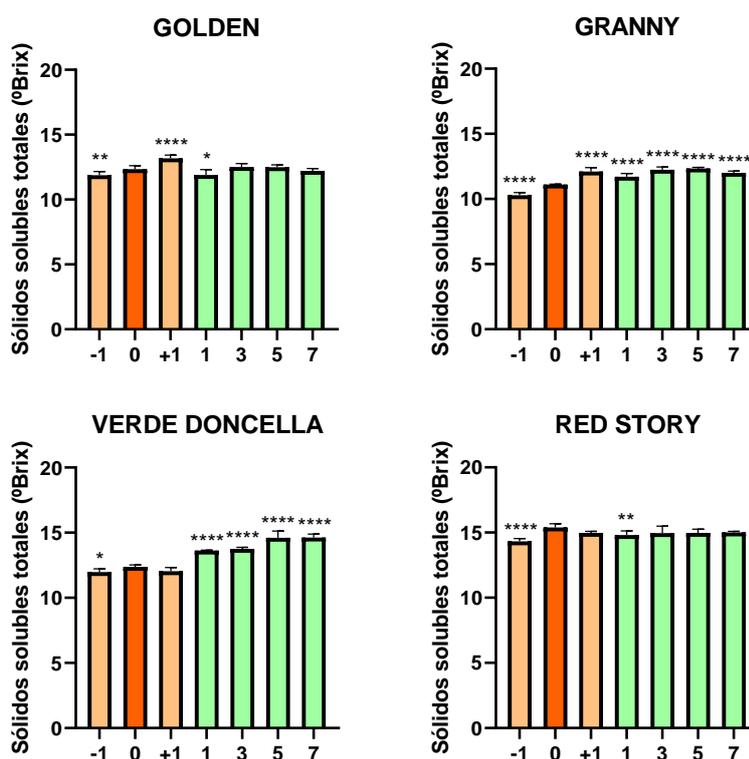


Figura 39. Concentración de sólidos solubles totales expresada en grados Brix (°Brix) de las diferentes variedades de manzana en los distintos grados de madurez comercial y durante el almacenamiento en refrigeración en AC. Los números del eje de abscisas corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grado de madurez óptimo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

Mikulič Petkovšek et al., 2009 estudiaron la evolución del contenido en SST en manzanas refrigeradas en ausencia de AC, desde la madurez fisiológica hasta el consumo. Los resultados mostraron niveles más altos de SST en la madurez de consumo en comparación con la madurez fisiológica. Este aumento puede explicarse por la degradación del almidón durante la maduración. Gonçalves et al. (2017) observaron un

aumento del contenido en SST durante la maduración en el árbol en las variedades de manzanas Gala y Fuji. Sin embargo, Skic et al. (2016) observaron que el contenido en SST no varió mucho durante el almacenamiento, mostrándose sólo un ligero aumento.

La acidez de la fruta se debe a la presencia de ácidos orgánicos, siendo los ácidos málico y cítrico los principales ácidos que se encuentran en la mayoría de las frutas maduras. La acidez titulable mide la concentración de ácido de la fruta, expresada en función del ácido primario, que en el caso de las manzanas es el ácido málico. La acidez, junto con la firmeza y °Brix, constituyen el índice de madurez, que se utiliza comúnmente para definir la calidad comercial de muchas frutas. Sin embargo, la acidez puede verse influenciada por factores agroambientales como el suministro de agua, la nutrición mineral y la temperatura, que pueden afectar la acumulación de ácidos cítrico y málico en las células de la fruta (Etienne et al., 2013; Kader, 2002).

En la **Figura 40** se muestra la acidez de cada variedad de manzana en los diferentes grados de madurez y periodo de almacenamiento. La variedad ‘Granny Smith’, se caracteriza por su sabor ácido y ello se refleja en una medida de la acidez titulable mucho más elevada que en el resto de variedades. En el resto de las variedades se produjo una ligera disminución en el grado +1, menor al 12% con respecto al grado de madurez óptimo. Durante el almacenamiento, la tendencia que se observó fue a disminuir la acidez, que fue por orden decreciente, mayor para la variedad ‘Golden Delicious’, seguido de ‘Red Story’, ‘Verde Doncella’ y ‘Granny Smith’. En todas las variedades se observa un ligero incremento de la acidez a los 5 meses, que es significativo en la variedad Granny, del orden de un 25% mayor.

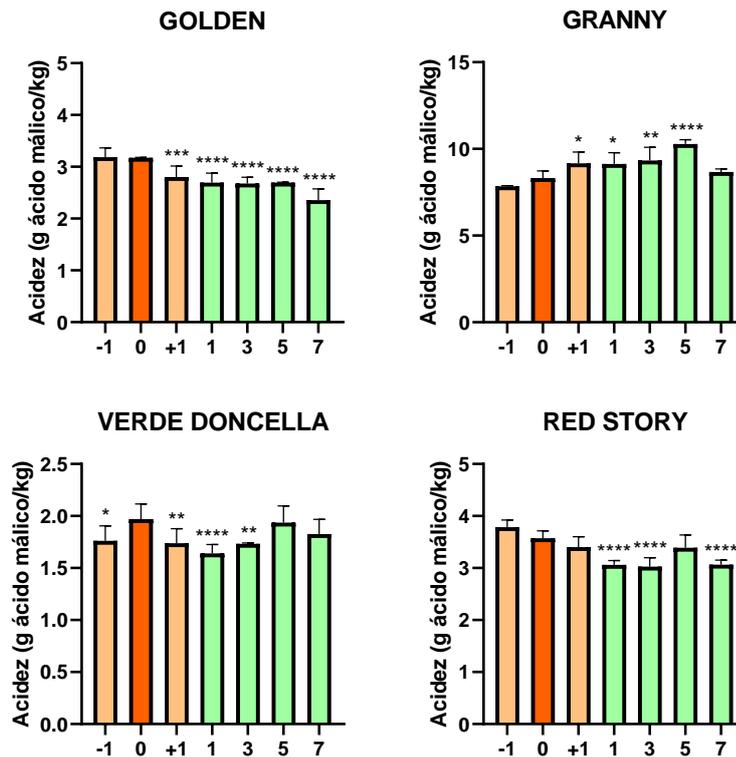


Figura 40. Valores de acidez titulable expresada en gramos de ácido málico/kilogramo de las diferentes variedades de manzana en los distintos grados de madurez comercial y durante el almacenamiento en refrigeración en AC. Los números del eje de abscisas corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grado de madurez óptimo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

Mikulič Petkovšek et al. (2009) estudiaron los cambios en el contenido de ácidos orgánicos durante la maduración de la manzana. En general, los niveles de ácido málico y cítrico disminuyen durante el almacenamiento. Sin embargo, ambos aumentaron significativamente en la variedad ‘Rubinola’ en la madurez de consumo, en comparación con la madurez fisiológica. Ackermann et al. (1992) también observaron una disminución gradual de estos ácidos en las manzanas durante el almacenamiento. Es destacable que el ácido málico es el sustrato principal en la respiración y, por tanto, disminuye más lentamente durante el almacenamiento en frío en AC con bajo contenido de oxígeno en comparación con el almacenamiento en frío convencional.

4.2.2. Contenido en proteína total y Mal d 3 en la piel de manzana

La concentración de proteína total y Mal d 3 de las cuatro variedades de manzana recolectadas en el óptimo de madurez se muestra en la **Figura 41**. En el caso de la variedad ‘Red Story’, se observó la presencia de interferencias por la técnica de Bradford que se atribuyeron a la presencia de pigmentos rojos de bajo peso molecular como el 3-glucósido de cianidina, por lo que fue necesario realizar una diálisis de los extractos antes del análisis.

La concentración de proteína total y de Mal d 3 más alta correspondió a la variedad ‘Verde Doncella’, del orden de 3 a 3,5 veces mayor y de 1,2 a 1,7 veces mayor, respectivamente, que en las otras variedades.

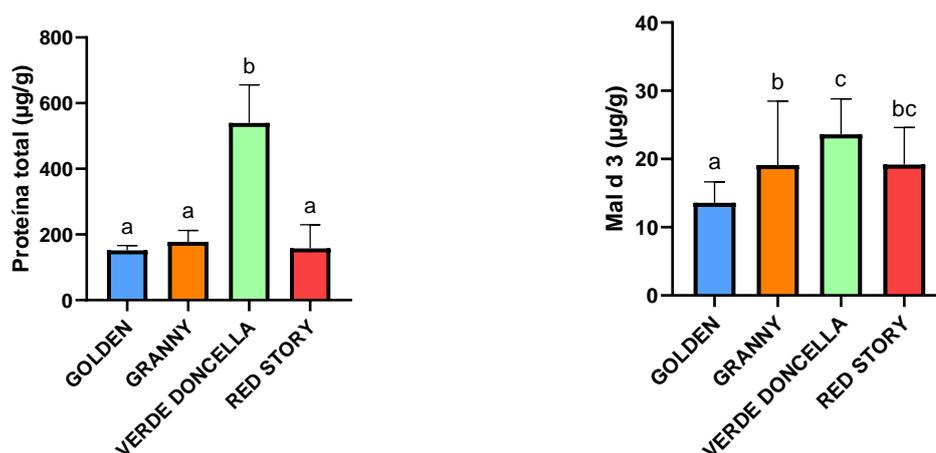


Figura 41. Concentración de proteína total (a) y Mal d 3 (b) expresada en microgramos de proteína/gramo de piel determinada en los extractos de las cuatro variedades de manzana en el grado de madurez comercial óptimo. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

La concentración de proteína total presentó un aumento con el grado de madurez en las variedades ‘Granny Smith’ y ‘Golden Delicious’ mientras que en la variedad ‘Verde Doncella’ disminuyó significativamente y en la variedad ‘Red Story’ no se observó variación (**Figura 42**). Durante el almacenamiento se observó un incremento de la concentración de proteína, que fue más marcado en el primer o tercer mes según la variedad. A pesar de que se observaron fluctuaciones en la concentración de proteína durante el almacenamiento, todas las variedades presentaron un mayor contenido a los 7

meses que en el grado de madurez óptimo, aproximadamente entre 1,5 y 2,3 veces mayor, salvo en la variedad Verde Doncella, cuyo contenido fue similar.

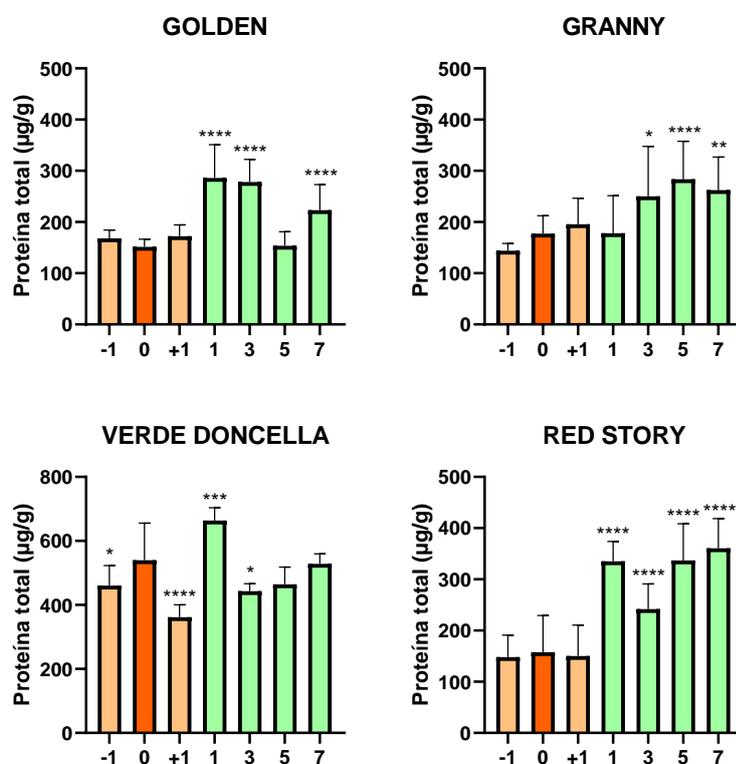


Figura 42. Concentración de proteína total determinada en los extractos de piel de manzana de las distintas variedades en diferentes grados de madurez comercial y durante el almacenamiento en refrigeración en AC, expresada en microgramos de proteína/gramo de piel. Los números del eje de abscisas corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grado de madurez óptimo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

La concentración de proteína Mal d 3 de cada variedad de manzana en los diferentes grados de madurez y periodo de almacenamiento se muestra en la **Figura 43**. En ninguna de las variedades se observó una influencia significativa del grado de madurez sobre la concentración Mal d 3. Las variedades ‘Verde Doncella’ y ‘Golden Delicious’ mostraron una concentración de Mal d 3 menor en el primer mes de almacenamiento que en el grado de madurez comercial óptimo y dicha concentración se mantuvo durante todo el periodo de almacenamiento. Sin embargo, en las variedades ‘Red Story’ y ‘Granny Smith’ se observó un ligero aumento de la Mal d 3 durante el primer mes, aunque disminuyó gradualmente en los siguientes meses de almacenamiento.

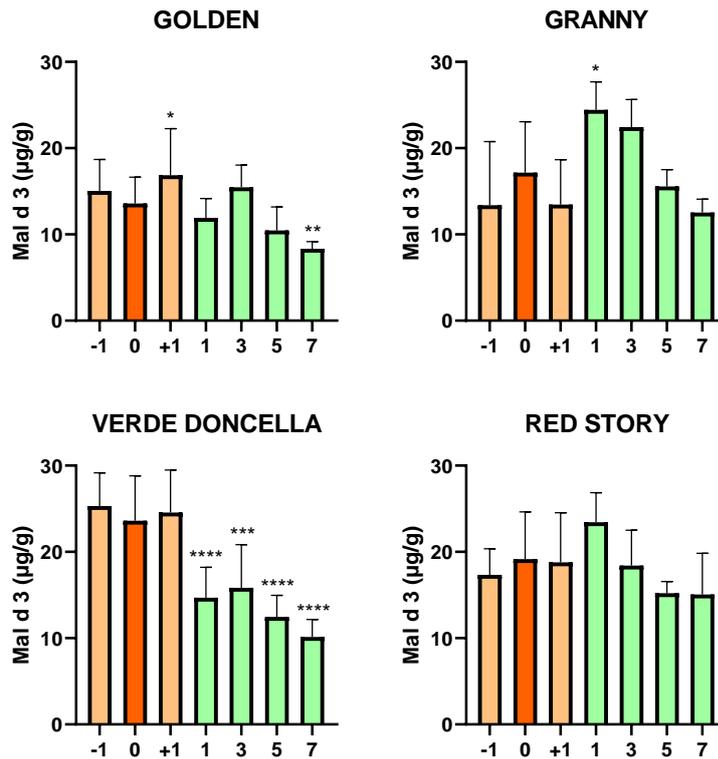


Figura 43. Concentración de proteína Mal d 3 determinada en los extractos de piel de manzana de las distintas variedades en diferentes grados de madurez comercial y durante el almacenamiento en refrigeración en AC, expresada en microgramos de proteína/gramo de piel. Los números del eje de abscisas corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grado de madurez óptimo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos experimentos analizados por triplicado.

Pocos estudios han determinado el efecto de la madurez y el almacenamiento en las concentraciones de proteína alergénica de la manzana, y los estudios que se han realizado se han centrado en la proteína Mal d 1 (Matthes y Schmitz-Eiberger, 2009; Sancho et al., 2006a; Schmitz-Eiberger y Matthes, 2011; Szabó y Takács, 2018; Szamos et al., 2011).

En el estudio llevado a cabo por Simonato et al. (2020) se cuantificó mediante Western-blotting la proteína Mal d 3 en la piel de seis variedades de manzana ('Golden Delicious', 'Belfiore', 'Pomella Genovese', 'Gravenstein', 'Bella del Bosco' y 'Piatlin'), siendo las dos últimas las que mostraron un contenido de Mal d 3 significativamente inferior al de las demás. Estos estudios demuestran que el contenido de esta proteína depende de la variedad de manzana, tal y como se observa en los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, se han realizado estudios en los que se indica que la concentración de proteínas alergénicas de la manzana aumenta con el grado de madurez, como mostraron Pagliarani et al., (2009), quienes determinaron los niveles transcripcionales del gen de la proteína Mal d 3 en los cultivares 'Gala' y 'Florina' mediante PCR en tiempo real. Estos autores observaron que la expresión de la proteína aumenta significativamente durante el desarrollo de las manzanas en los árboles durante un período de cuatro meses (junio a septiembre). Por otro lado, Sancho et al. (2006b) realizaron un estudio en manzanas de las variedades 'Cox's Orange Pippin', 'Gala' y 'Jonagored' en el que se midió la concentración de proteína Mal d 3 en extractos de piel de manzana mediante técnica ELISA. Se observó que los niveles de Mal d 3 aumentaban a medida que las manzanas alcanzaban la madurez fisiológica y aumentaban significativamente al final de la madurez fisiológica, cuando las manzanas eran comestibles, pero demasiado maduras para el almacenamiento. Este aumento repentino puede coincidir con un aumento en la actividad respiratoria de la fruta y el inicio de la biosíntesis de etileno. La maduración de la fruta se caracteriza por un proceso que altera el sabor, la textura y aumenta significativamente la susceptibilidad a los patógenos. Por lo tanto, a medida que los alérgenos se acumulan en las frutas maduras, pueden desempeñar un papel importante en la protección contra el estrés biótico.

Con respecto a la influencia del almacenamiento postcosecha Sancho et al. (2006b), determinaron la concentración de Mal d 3 en manzanas almacenadas a temperatura ambiente, en refrigeración a 2 °C o en AC a 3,8 °C durante 5 meses, en las mismas variedades y observaron un aumento inicial en los niveles de Mal d 3 durante el primer mes de almacenamiento, para todos los cultivares y condiciones estudiadas. Posteriormente, la concentración de Mal d 3 disminuyó durante el almacenamiento, con un grado de disminución dependiente de la variedad, como se ha observado en este trabajo.

4.2.3. Determinación del perfil proteico

El perfil proteico obtenido mediante electroforesis de los extractos de piel de las cuatro variedades de manzana tras tinción de los geles con Azul de Coomassie y con plata se muestra en las **Figuras 44 a y d.**

Las cuatro variedades en los diferentes grados de madurez y almacenamiento muestran un perfil de bandas similar, aunque de diferente intensidad, visualizándose proteínas de peso molecular de entre 10 y 100 kDa. En las variedades ‘Red Story’ y ‘Granny Smith’ predominan las bandas de 25-35 kDa mientras que en las variedades ‘Verde Doncella’ y ‘Golden Delicious’ las bandas predominantes son de aproximadamente 15, 25-35 y 55-60 kDa. En todas las variedades se visualiza la banda correspondiente a la proteína Mal d 3, aunque ésta muestra una baja intensidad de color debido a que es una proteína minoritaria.

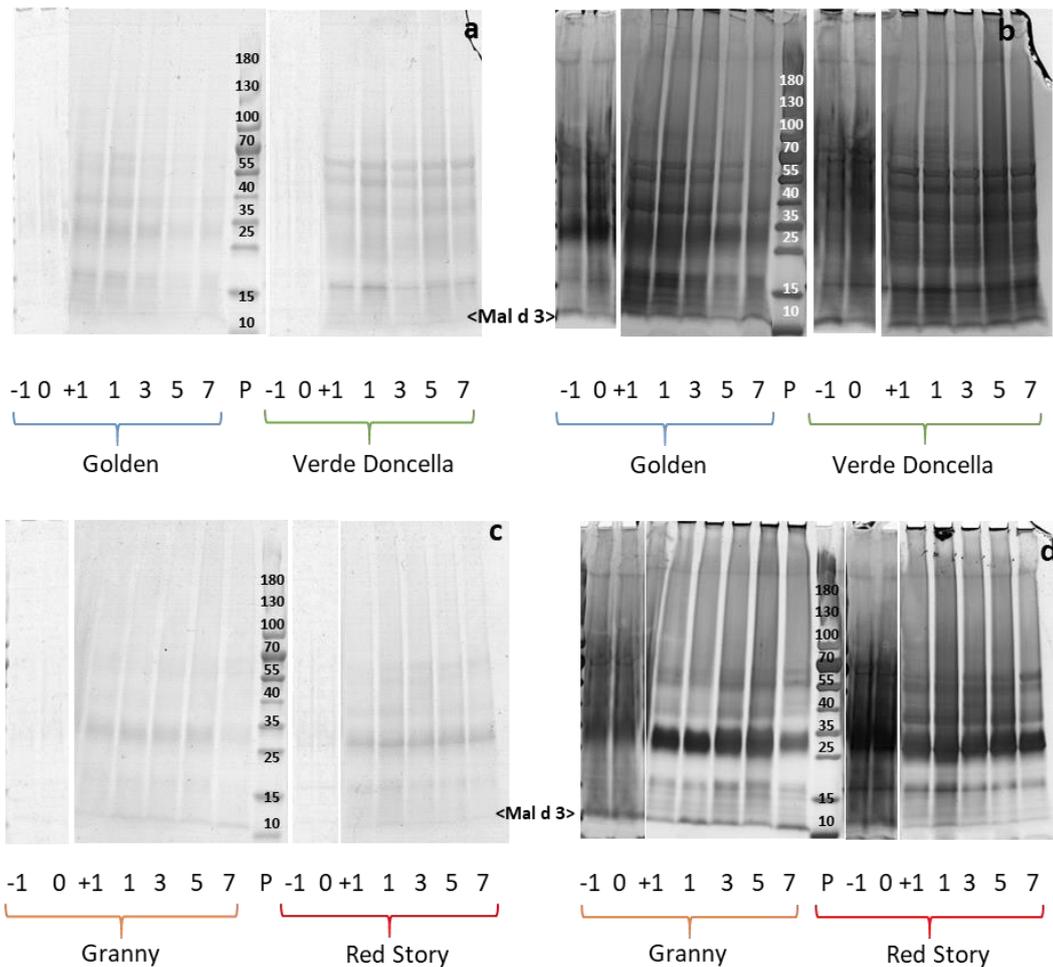


Figura 44. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (4-20 %) en condiciones reductoras de los extractos de piel de las diferentes variedades de manzana en distintos grados de madurez y tiempos de almacenamiento postcosecha. (a, c) Tinción con Azul de Coomasié. (b, d) Tinción con plata. (P) Patrón de pesos moleculares. Los números incluidos debajo de los geles corresponden al grado de madurez (0, óptimo; -1 y +1, una semana antes o después del óptimo) y al tiempo de almacenamiento en meses en refrigeración y atmósfera controlada (1, 1 mes; 3, 3 meses; 5, 5 meses; 7, 7 meses).

Se ha determinado la relación entre todos los parámetros estudiados en las muestras para cada variedad de manzana, cuyos valores del coeficiente de correlación de Pearson se muestran en las **Tablas 22 y 23**. Se observa, de forma general, que la correlación entre la mayoría de los parámetros es muy baja ($R^2 < 0,40$). Sin embargo, entre determinados parámetros existe una correlación moderada ($0,40 \leq R^2 < 0,70$), como es el caso de firmeza-acidez y acidez-Mal d 3 en la variedad Golden; SST-proteína y acidez-proteína en la variedad Granny, y acidez-proteína en la variedad Red Story. Además, entre los parámetros SST-acidez en la variedad Granny existe una correlación alta ($0,70 \leq R^2 < 0,90$), y entre los parámetros SST-Mal d 3 en la variedad Verde Doncella, una correlación muy alta ($0,90 \leq R^2 < 1,00$). El hecho de que las correlaciones corresponden a parámetros que no son coincidentes entre las variedades hace que no sea posible establecer una tendencia en el comportamiento de la mismas.

Tabla 22. Valores del coeficiente de correlación de Pearson (R^2) para las relaciones establecidas entre los parámetros físico-químicos determinados en las muestras de las variedades ‘Golden Delicious’ y ‘Granny Smith’ en los distintos grados de madurez y periodos de almacenamiento. Entre paréntesis se indica si la correlación es positiva (+) o negativa (-).

	GOLDEN				GRANNY			
	FIRMEZA	SST	ACIDEZ	PROTEÍNA	FIRMEZA	SST	ACIDEZ	PROTEÍNA
SST	0,1520 (-)				0,1750 (-)			
ACIDEZ	0,6910 (+)	0,0174 (-)			0,1567 (-)	0,7349 (+)		
PROTEÍNA	0,0826 (-)	0,0847 (-)	0,2844 (-)		0,0179 (+)	0,6855 (+)	0,5558 (+)	
MAL D 3	0,2035 (+)	0,1663 (+)	0,4568 (+)	0,0083 (-)	0,0742 (-)	0,0156 (+)	0,0365 (+)	0,0214 (-)

Tabla 23. Valores del coeficiente de correlación de Pearson (R^2) para las relaciones establecidas entre los parámetros físico-químicos determinados en las muestras de las variedades ‘Verde Doncella’ y ‘Red Story’ en los distintos grados de madurez y periodos de almacenamiento. Entre paréntesis se indica si la correlación es positiva (+) o negativa (-).

	VERDE DONCELLA				RED STORY			
	FIRMEZA	SST	ACIDEZ	PROTEÍNA	FIRMEZA	SST	ACIDEZ	PROTEÍNA
SST	0,3548 (-)				0,0588 (+)			
ACIDEZ	0,0253 (-)	0,0154 (+)			0,0031 (-)	0,0795 (-)		
PROTEÍNA	0,0005 (+)	0,1000 (+)	0,0202 (-)		0,0327 (+)	0,0076 (+)	0,5103 (-)	
MAL D 3	0,3574 (+)	0,9756 (-)	0,00001 (-)	0,1572 (-)	0,0098 (-)	0,00001 (+)	0,0362 (-)	0,0178 (-)

Discusión

5. DISCUSIÓN GENERAL

La alergia alimentaria constituye actualmente un importante problema de salud pública en los países desarrollados debido a su alta prevalencia y al considerable aumento que está experimentando en los últimos años (Sicherer y Sampson, 2018).

Aunque existen algunas estrategias que han resultado efectivas en la prevención de determinadas alergias alimentarias, como por ejemplo la inmunoterapia oral en niños alérgicos a la leche y al huevo (Wood, 2017), en la mayoría de los casos, una vez desarrollada la alergia a un alimento, la única manera de prevenirla es evitando el consumo del alimento que la causa. Por ello, la normativa de numerosos países obliga declarar de forma resaltada en la etiqueta una serie de alimentos causantes de alergias o intolerancias cuando se añaden como ingredientes. En Europa el Reglamento UE/1169/2011 incluye un anexo que recoge los alimentos de etiquetado obligatorio.

En nuestro país, las frutas frescas constituyen la causa más frecuente de alergias alimentarias, representando aproximadamente el 45% del total de alergias alimentarias, siendo las rosáceas las más frecuentemente implicadas. Sin embargo, hasta la fecha las frutas no se incluyen entre los alimentos de etiquetado obligatorio.

Los patrones de reconocimiento de las IgE y la clínica de los alérgenos de las frutas rosáceas varían según la zona geográfica. En el norte y centro de Europa estas alergias están asociadas con la sensibilización a proteínas de las familias PR-10 y profilinas, que son alérgenos lábiles por lo que producen el síndrome de alergia oral. Sin embargo, en el sur de Europa, sobre todo en España, Italia y Grecia, estas alergias están asociadas a la familia de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), a la que pertenecen la Pru p 3 del melocotón y la Mal d 3 de la manzana. Estas proteínas presentan una alta estabilidad a la proteólisis digestiva por lo que producen frecuente afectación sistémica y anafilaxia (Cavatorta et al., 2010; Wijesinha-Bettoni et al., 2010).

Además, estas proteínas presentan una alta estabilidad frente a los tratamientos que se usan en el procesado industrial de los productos derivados de frutas, fundamentalmente los tratamientos térmicos, que tienen por objeto inactivar los enzimas de la fruta e higienizar el producto. Este hecho se ha atribuido a la estabilidad que confiere a su estructura la presencia de cuatro puentes disulfuro intramoleculares.

En los últimos años, se han realizado algunos estudios para determinar el efecto que tienen diferentes tratamientos tecnológicos de procesado en la alergenicidad de las frutas, con el objetivo de diseñar métodos que reduzcan o eliminen su actividad alérgica, como requisito previo para la producción de alimentos con alergenicidad reducida (Vanga et al., 2017). Una parte de este trabajo se ha centrado en el estudio del efecto que tienen los tratamientos térmicos y las nuevas tecnologías de procesado, combinadas o no con calor, y la proteólisis en la desnaturalización y alergenicidad de las proteínas más alérgicas del melocotón y la manzana, las proteínas Pru p 3 y Mal d 3, respectivamente.

Por otra parte, una característica de las LTP es que su expresión puede cambiar según la variedad, su estado madurativo, tratamientos recibidos antes de la cosecha, condiciones medioambientales o las condiciones de almacenamiento, entre otros, dando lugar a diferentes grados de alergenicidad de las frutas. Por ello, en el estudio que se presenta en esta memoria se ha determinado el efecto de la variedad, grado de madurez y tiempo de almacenamiento postcosecha en atmósfera controlada en el contenido en Mal d 3.

Para llevar a cabo la cuantificación de Pru p 3 y Mal d 3, así como para determinar el efecto de los tratamientos tecnológicos y dado que no existen test comerciales, en este trabajo se han desarrollado técnicas de ELISA de tipo sandwich. El desarrollo de estas técnicas ha incluido realizar previamente un extenso trabajo experimental para purificar las proteínas Pru p 3 y Mal d 3 con un alto grado de pureza (> 90%) utilizando técnicas cromatográficas y de ultrafiltración, y para obtener antisueros frente a ellas en conejos. Además, se han purificado los anticuerpos específicos mediante inmunoadsorción y se han conjugado con peroxidasa en el caso de Pru p 3 y con fosfatasa alcalina en el caso de Mal d 3. Los anticuerpos sin marcar y marcados se han usado como reactivo de captura y de detección, respectivamente en las técnicas desarrolladas. Los test ELISA han mostrado tener una alta sensibilidad con límites de detección de 3,7 ng/ml para Pru p 3 y 0,15 ng/ml para Mal d 3, del orden de los obtenidos en estudios previos (Carnes et al., 2002; Duffort et al., 2002). Los resultados de la validación del test ELISA para Pru p 3 han mostrado que es un test robusto y que tiene unos valores de precisión aceptables según las guías internacionales (Abbott et al., 2010; AOAC INTERNATIONAL, 2016).

Los test desarrollados podrían ser transferidos a una empresa de fabricación de test de diagnóstico para el sector alimentario, si en un futuro se procediera a un cambio en la normativa que incluyera las frutas rosáceas en la normativa de etiquetado obligatorio,

como ha sucedido con otros alimentos alergénicos incorporados recientemente. Estos test podrían resultar también de gran interés para los productores de frutas rosáceas pues les permitiría conocer la concentración de proteínas alergénicas en distintas variedades de fruta, en distintas etapas de maduración y en condiciones variadas de almacenamiento. Estos test podrían ser utilizados por laboratorios externos y permitirían adoptar mejores prácticas en la cosecha y postcosecha para obtener frutas con un menor potencial alergénico. Los test desarrollados podrían ser utilizados también por los laboratorios de control de los organismos sanitarios para comprobar la presencia de proteínas alergénicas en un alimento sospechoso de haber producido una sensibilización en un individuo alérgico.

El efecto del procesado en la desnaturalización de las proteínas alergénicas se puede estimar utilizando diferentes técnicas como dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia y técnicas electroforéticas, entre otras (Garino et al., 2012; Husband et al., 2011; Johnson et al., 2010; Lavilla et al., 2016). En este trabajo, se han utilizado las técnicas inmunoquímicas desarrolladas con anticuerpos policlonales. Estas técnicas resultan una alternativa analítica adecuada ya que los cambios en la estructura de las proteínas se reflejan en cambios en su inmunorreactividad, debido a la destrucción de epítomos conformacionales y/o lineales que son reconocidos por los anticuerpos específicos. Estas técnicas han sido utilizadas en estudios previos publicados por nuestro grupo con otras proteínas alergénicas obteniendo también buenos resultados (Civera et al., 2022; de Luis et al., 2009; Montserrat et al., 2015; Segura-Gil et al., 2019).

Por otra parte, el efecto de los tratamientos tecnológicos en la alergenicidad de las proteínas se ha estudiado en este trabajo mediante la técnica de prick test y mediante una técnica serológica de inmunofluorescencia en pacientes sensibilizados a melocotón o manzana. La técnica de inmunofluorescencia utilizada para la determinación de IgE específica en individuos alérgicos, se ha adaptado previamente a un formato competitivo, para poder detectar cambios en la reactividad con las IgE entre la proteína tratada y sin tratar.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de los tratamientos tecnológicos (térmicos, PEAV, de altas presiones hidrostáticas y de ultrasonidos) en la desnaturalización de la Pru p 3 mediante la técnica ELISA sandwich han mostrado que la proteína presenta una considerable estabilidad. Así, para desnaturalizar la Pru p 3 por

calor son necesarios tratamientos a temperaturas por encima de 85 °C durante tiempos muy prolongados (superiores a 20 minutos), que no serían aplicables en el procesado de las frutas porque se desarrollaría pardeamiento debido a la reacción de Maillard. Así mismo, la Pru p 3 ha resultado tener una alta estabilidad frente al procesado con PEAV y con altas presiones, manteniendo su inmunorreactividad tras la aplicación de tratamientos de 25 kV o de 600 MPa a 20 °C, respectivamente. Sin embargo, el efecto combinado de estas tecnologías con calor incrementó notablemente el grado de desnaturalización de la Pru p 3, del orden del 50% a 25 Kv y 50 °C, y del 40% a 600 MPa y 80 °C.

Por otra parte, la proteína Pru p 3 ha mostrado una mayor estabilidad frente a los tratamientos térmicos y de altas presiones cuando se trata en extracto de melocotón que en tampón, indicando que los componentes presentes en el extracto ejercen un efecto protector frente a la desnaturalización. Estas diferencias dependientes de la matriz alimentaria, que se han observado también en otros estudios (Lavilla et al., 2016; Sancho et al., 2005) y que se han atribuido a la presencia de pectinas, deberían de considerarse en el caso de aplicar esas tecnologías en muestras industriales.

Respecto al procesado con ultrasonidos del extracto de melocotón, la aplicación de tratamientos a una amplitud de 100 µm a 0 KPa disminuyó la inmunorreactividad sólo un 25%. La aplicación del tratamiento combinado con presión (manotermosonicación) a 100 KPa incrementó este porcentaje hasta un 40%, obteniéndose en ambos casos la mayor pérdida de inmunorreactividad en el primer minuto de tratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio con las tecnologías aplicadas, que han sido discutidos en los correspondientes apartados, están de acuerdo a los expuestos por otros autores e indican que la proteína Pru p 3 presenta una considerable resistencia al procesado, siendo necesarias condiciones muy severas e incluso tratamiento combinados para conseguir una desnaturalización mayor al 50%.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el estudio del efecto de los tratamientos tecnológicos en la alergenicidad de la Pru p 3 muestran que los tratamientos aplicados no son capaces de disminuir la reactividad de la proteína con las IgE del suero de pacientes alérgicos a melocotón, y si lo hacen, el porcentaje de disminución es menor al 10%. Por otra parte, los resultados obtenidos en la prueba del prick test con las muestras sometidas a los tratamientos de PEAV y de altas presiones muestran muchas diferencias entre pacientes, observándose un aumento o una disminución considerable del tamaño medio

del habón en un porcentaje importante de los mismos, al igual que se ha observado previamente (Lavilla et al., 2016). Este diferente comportamiento probablemente está relacionado con la exposición y/o enmascaramiento de los epítomos que son específicamente reconocidos por cada individuo, como resultado de la desnaturalización inducida por cada tecnología de procesado. Así, el aumento de la alergenicidad se ha atribuido a que algunos pacientes tienen IgE que reaccionan con epítomos que están localizados en la parte interna de la Pru p 3 en su estado nativo y que quedan expuestos como consecuencia de la desnaturalización (García-Casado, 2003; Lavilla et al., 2016).

El conjunto de los resultados obtenidos, similares también a los indicados en otros estudios y discutidos previamente (Garino et al., 2012; Husband et al., 2011; Johnson et al., 2010; Lavilla et al., 2016), sugiere que los tratamientos de procesado estudiados, que son capaces de desnaturalizar la proteína Pru p 3 en mayor o menor medida, no resultarían efectivos para ser aplicados en el procesado de la fruta para la población alérgica a melocotón.

Por otra parte, es un hecho destacable que actualmente, sólo existen en el mercado dos productos, las fórmulas infantiles hipoalérgicas para bebés alérgicos a las proteínas de la leche de vaca, y la cerveza sin gluten para celíacos, que pueden ser ingeridos sin causar una sintomatología adversa en las personas sensibles. La tecnología para elaborar estos productos se basa exclusivamente en la utilización de enzimas proteolíticos que son eficientes para hidrolizar las proteínas de dichos alimentos a un determinado tamaño de péptidos, lo que los hace seguros para la población especial a la que van dirigidos (Bøgh and Larsen, 2021; Cela et al., 2020).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína Pru p 3 muestra una elevada resistencia a la degradación por los enzimas del tracto digestivo (Cavatorta et al., 2010; Wijesinha-Bettoni et al., 2010) y el único estudio realizado con proteasas comerciales de *Aspergillus* y *Rhizopus* no mostró ser efectivo en degradar la proteína ni en reducir su reactividad con las IgE del suero de alérgicos (Brenna et al., 2000). Por ello, en este trabajo nos planteamos realizar un estudio utilizando una amplia batería de enzimas de diferentes orígenes para determinar su efecto en la degradación de la Pru p 3. Los resultados obtenidos mostraron que la Pru p 3 es resistente a la acción de la mayoría de los enzimas ensayados y que tan sólo dos proteasas ácidas eran capaces de degradarla en las condiciones que se podrían usar en el procesado de la fruta. Los hidrolizados

obtenidos, analizados mediante electroforesis y espectrometría de masas mostraron la ausencia de proteína nativa y la presencia de péptidos de pequeño tamaño. Los péptidos obtenidos tras la incubación con las proteasas a 50 °C durante 2 horas eran menores de 3,2 kDa, y a 25 °C durante 24 h menores a 1,8 kDa. Según la ESPHGAN, en las leches hipoalergénicas elaboradas con proteínas de leche de vaca, la proteína debe ser extensamente degradada hasta obtener péptidos de 1,5 kDa o menores para evitar las reacciones en los bebés sensibilizados. Así, el producto obtenido tras la degradación de la Pru p 3, sobre todo tras el tratamiento prolongado a temperatura ambiente, es de esperar que tuviera un potencial alergénico menor.

Los resultados obtenidos en la prueba serológica con los hidrolizados obtenidos con las proteasas ácidas mostraron que la reactividad con las IgE disminuía en 60- 85% de los pacientes. Así mismo, en la prueba del prick test, en más del 93% de los pacientes alérgicos a melocotón el tamaño medio del habón disminuyó hasta valores del 15 al 28% en comparación con la proteína sin tratar.

Por otra parte, con el objeto de conocer si los resultados obtenidos con la proteína Pru p 3 eran extensibles a otras proteínas de la misma familia, se ensayaron las mismas proteasas ácidas y condiciones de incubación con la Mal d 3, en los que se obtuvieron unos resultados similares

Estos resultados sugieren que la incorporación de estas proteasas en la etapa de clarificación del zumo o la adición de las mismas, esterilizadas por microfiltración, en el producto terminado permitiría obtener productos derivados de frutas rosáceas con una alergenicidad reducida y por tanto más tolerables para la población sensible. Estos productos serían los primeros productos hipoalergénicos a base de frutas en el mercado actual.

No obstante, sería necesario realizar estudios con estas proteasas a escala piloto para comprobar que los resultados obtenidos con las proteínas puras son reproducibles en los productos comerciales. Además, habría que determinar el efecto de la proteólisis utilizando técnicas celulares como el test de activación de basófilos (Cañas et al., 2022) o ensayos de ingestión oral de estos productos mediante experimentos “in vivo” con modelos animales (Benedé et al., 2021), así como pruebas de provocación en personas sensibilizadas, realizadas bajo control médico, para conocer si están exentos de riesgo y si resultarían eficientes para aumentar la tolerancia en la población a la que van dirigidos

(Nagendran et al., 2022; Pereira et al., 2009). Habría también que realizar un análisis organoléptico de los productos obtenidos para determinar su aceptación por parte de los consumidores, aunque es de esperar que, dada la baja cantidad de proteína existente en los productos derivados de las frutas, su sabor no se vería sustancialmente modificado.

Por otra parte, una característica de las proteínas LTP es que su expresión puede cambiar según la variedad, su estado madurativo, los tratamientos recibidos antes de la cosecha, las condiciones medioambientales y las condiciones de almacenamiento, entre otros, dando lugar a diferentes grados de alergenicidad de las frutas (Botton et al., 2006; Pagliarani et al., 2009; Sancho et al., 2006a, 2006b; Schmitz-Eiberger y Matthes, 2011; Szamos et al., 2011). Por ello, en el estudio que se presenta en esta memoria se ha determinado el efecto de la variedad, grado de madurez y tiempo de almacenamiento postcosecha, en atmósfera controlada en el contenido en Mal d 3. Los resultados han mostrado que la concentración de esta proteína depende de la variedad, siendo la verde Doncella y la Golden las que presentan el valor mayor y menor, respectivamente, con diferencias entre ellas de un 70%. En ninguna de las variedades se observó una influencia significativa del grado de madurez en la concentración de Mal d 3, en contraste con estudios previos (Pagliarani et al., 2009; Sancho et al., 2006b), lo que se debe probablemente a que el periodo de madurez en el que se recolectaron las manzanas fue muy corto. Sin embargo, durante el almacenamiento se obtuvo una disminución de Mal d 3, entre 21% y 57%, dependiendo de la variedad. No obstante, la disminución de Mal d 3 durante el almacenamiento no parece probable que sea suficiente para evitar una reacción alérgica en individuos sensibilizados.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Primera: Las técnicas de ELISA tipo sándwich desarrolladas para la determinación de Pru p 3 y Mal d 3 presentan una alta sensibilidad, siendo capaces de detectar 2,5 y 3,7 ng/ml, respectivamente. La validación del test ELISA de Pru p 3 ha mostrado unos valores de los parámetros de precisión aceptables según las guías internacionales y ha resultado ser un test robusto.

Segunda: La proteína Pru p 3 presenta una considerable termorresistencia, observándose desnaturalización, entendida como la pérdida de reactividad con sus anticuerpos específicos, a una temperatura superior a 85 °C, y a tiempos largos de tratamiento, y que es mayor cuando la proteína se trata en tampón que en extracto de melocotón. Los tratamientos más severos, a 95 °C durante 40 minutos inducen una marcada desnaturalización, mayor al 75%. Por el contrario, esos tratamientos sólo producen una ligera disminución de la alergenicidad “in vitro” de la Pru p 3, entendida como la reactividad con las IgE de sueros de individuos alérgicos a melocotón, que es menor del 10%.

Tercera: Los tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje a 25 kV no inducen desnaturalización de la proteína Pru p 3 salvo que se apliquen combinados con calor, obteniendo a 50 °C un grado de desnaturalización del 50%. Estos tratamientos no modifican la reactividad de la proteína con las IgE. Sin embargo, la prueba del prick test reveló un aumento de la reactividad “in vivo”, referido al tamaño del habón, en aproximadamente el 48% de los pacientes y una disminución en el 45%.

Cuarta: La desnaturalización de la proteína Pru p 3 por efecto de las altas presiones es muy baja a 400 MPa a 20 °C y se incrementa de forma marcada al aumentar la presión y sobre todo la temperatura, teniendo lugar en mayor medida en los primeros minutos de tratamiento. La barorresistencia de la Pru p 3 está influida por el medio de tratamiento, siendo mayor en extracto de melocotón que en tampón. Sin embargo, ninguna de las condiciones aplicadas afectó de forma significativa la reactividad de las proteínas con las IgE. La prueba del prick test reveló que, en conjunto, los tratamientos de altas presiones producen un aumento del tamaño del habón en el 55% de los pacientes alérgicos y una disminución en el 41%.

Quinta: Los tratamientos de ultrasonidos inducen la desnaturalización de la proteína Pru p 3, siendo el grado de alteración de la proteína dependiente de las condiciones de amplitud aplicadas. La desnaturalización de la Pru p 3 es mayor cuando los ultrasonidos se combinan con presión (manosonicación). El tratamiento más severo aplicado (100 mm y 100 MPa) desnaturalizó un 43% de la proteína, pero sólo disminuyó un 5% la reactividad de la proteína con las IgE.

Sexta: La Pru p 3 y la Mal d 3 presentan una elevada resistencia a la proteólisis. De las 22 proteasas ensayadas de diferentes orígenes, sólo la proteasa de páncreas bovino y las proteasas ácidas 1 y 2 fueron capaces de degradar eficientemente ambas proteínas en sus respectivos óptimos de pH y temperatura, al ser analizadas mediante electroforesis.

Séptima: El grado de degradación de la proteína Pru p 3 y Mal d 3 por las proteasas ácidas 1 y 2 es mayor del 90%. Los hidrolizados obtenidos tras la incubación a 50 °C durante 2 h o a 25 °C durante 24 h contienen péptidos de peso molecular menor de 3,2 y 1,8 kDa, respectivamente.

Octava: La proteólisis de la proteína Pru p 3 o la Mal d 3 con las proteasas ácidas 1 y 2 disminuye más del 70% su reactividad con las IgE del suero de individuos alérgicos a melocotón o manzana. Así mismo, en la prueba del prick test, más del 90% de los alérgicos mostró una disminución, entre un 72% y un 85%, del tamaño medio del habón.

Novena: El tratamiento con las proteasas ácidas 1 o 2 podría aplicarse en el procesado de los productos derivados de melocotón o manzana añadiendo el enzima en la etapa de clarificación o esterilizada por filtración en el producto elaborado. Ello permitiría poner en el mercado productos novedosos derivados de frutas rosáceas elaborados con nuevas estrategias de procesado que tengan una alergenicidad reducida y sean por tanto más tolerables por la población sensible. Estos productos serían los primeros productos hipoalergénicos a base de frutas en el mercado actual.

Décima: La concentración de Mal d 3 en la piel de manzana varía dependiendo de la variedad, correspondiendo el valor más alto y más bajo a las variedades Verde Doncella y Golden, respectivamente. El grado de madurez no parece tener una influencia significativa en ninguna de las variedades, mientras que durante el almacenamiento en atmósfera controlada se produce una considerable disminución de Mal d 3, que varía entre un 21% y 57% a los 7 meses. Sin embargo, esta disminución no parece ser suficiente para evitar las reacciones alérgicas en individuos sensibilizados.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse, R.C., 2000. Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 228–238. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108434>
- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S.B., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms, R.E., Delahaut, P., 2010. Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *J. AOAC Int.* 93, 442–450. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.2.442>
- Abdullah, N., Chin, N.L., 2014. Application of Thermosonication Treatment in Processing and Production of High Quality and Safe-to-Drink Fruit Juices. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 2, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.045>
- Ackermann, J., Fischer, M., Amado, R., 1992. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *J. Agric. Food Chem.* 40, 1131–1134. <https://doi.org/10.1021/jf00019a008>
- Ahrazem, O., Jimeno, L., López-Torrejón, G., Herrero, M., Espada, J.L., Sánchez-Monge, R., Duffort, O., Barber, D., Salcedo, G., 2007. Assessing allergen levels in peach and nectarine cultivars. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 99, 42–47. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60619-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60619-9)
- Alessandri, S., Sancho, A., Vieths, S., Mills, C.E.N., Wal, J.-M., Shewry, P.R., Rigby, N., Hoffmann-Sommergruber, K., 2012. High-Throughput NMR Assessment of the Tertiary Structure of Food Allergens. *PLoS ONE* 7, e39785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039785>
- Anvari, S., Miller, J., Yeh, C.-Y., Davis, C.M., 2019. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57, 244–260. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8710-3>
- AOAC INTERNATIONAL, 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- Asero, R., 1998. Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients: Birch pollen-specific IT on apple allergy. *Clin. Exp. Allergy* 28, 1368–1373. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00399.x>
- Babiano Fernández, M.Á., Mur Gimeno, P., 2016. Shock anafiláctico con manzana: síndrome LTP. *Rev. Clínica Med. Fam.* 9, 60–62.
- Balasubramaniam, V., 2021. Process development of high pressure-based technologies for food: research advances and future perspectives. *Curr. Opin. Food Sci.* 42, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.10.001>
- Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Lelieveld, H.L.M. (Eds.), 2016. High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications, Food Engineering Series. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3234-4>
- Balasubramaniam, V.M., Ting, E.Y., Stewart, C.M., Robbins, J.A., 2004. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.04.001>
- Barbosa-Cánovas, G.V., 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. Academic Press, San Diego, Calif.

- Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H.S., 2004. Processing fruits: Science and technology, Second Edition. ed. Editorial CRC Press LLC., Boca Ratón, Florida.
- Bartra, J., 2015. Reuniones Anuales : Ponencias de la edición de 2015 : Panalérgenos emergentes: no sólo para pólenes.
- Blanco, C., 2003. Latex-fruit syndrome. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3, 47–53. <https://doi.org/10.1007/s11882-003-0012-y>
- Borges, J.-P., Jauneau, A., Brulé, C., Culerrier, R., Barre, A., Didier, A., Rougé, P., 2006. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.09.018>
- Botton, A., Andreotti, C., Costa, G., Ramina, A., 2009a. Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Allergen-Encoding Genes Are Developmentally Regulated and Affected by Fruit Load and Light Radiation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 724–734. <https://doi.org/10.1021/jf802709k>
- Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Ruperti, B., Ramina, A., 2009b. Environmental factors affecting the expression of apple (*Malus × domestica* L. Borkh) allergen-encoding genes. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 182–187. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512618>
- Botton, A., Vegro, M., De Franceschi, F., Ramina, A., Gemignani, C., Marcer, G., Pasini, G., Tonutti, P., 2006. Different expression of Pp-LTP1 and accumulation of Pru p 3 in fruits of two *Prunus persica* L. Batsch genotypes. *Plant Sci.* 171, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.016>
- Braddock, R.J., 1999. Single-strength orange juice and concentrates, Handbook of citrus by-products and processing technology. R. J. Braddock (Ed.), Wiley, New York.
- Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Pastorello, E.A., Farioli, L., 2000. Technological Processes To Decrease the Allergenicity of Peach Juice and Nectar. *J. Agric. Food Chem.* 48, 493–497. <https://doi.org/10.1021/jf9906681>
- Cálix, K.I.G., 2007. Uso de anticuerpo monoclonal anti-IgE en pacientes pediátricos con asma alérgica. Revisión cualitativa de la bibliografía 16, 10.
- Cañas, J.A., Pérez-Sánchez, N., Lopera-Doblas, L., Palomares, F., Molina, A., Bartra, J., Torres, M.J., Gómez, F., Mayorga, C., 2022. Basophil Activation Test Utility as a Diagnostic Tool in LTP Allergy. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4979. <https://doi.org/10.3390/ijms23094979>
- Carnes, J., Fernandez-Caldas, E., Gallego, M.T., Ferrer, A., Cuesta-Herranz, J., 2002. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy* 57, 1071–1075. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.23732.x>
- Carvalho, A. de O., Gomes, V.M., 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. *Peptides* 28, 1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.004>
- Casale, T.B., 2001. Effect of Omalizumab on Symptoms of Seasonal Allergic Rhinitis A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 286, 2956. <https://doi.org/10.1001/jama.286.23.2956>
- Castillo-Yañez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F.L., Toro, M. de los A.N.-D., 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine

- (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* 85, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.008>
- Cavatorta, V., Sforza, S., Aquino, G., Galaverna, G., Dossena, A., Pastorello, E.A., Marchelli, R., 2010. In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: Molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1452–1457. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900552>
- Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F., 2007. Nomenclature and structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.001>
- Chizoba Ekezie, F.-G., Cheng, J.-H., Sun, D.-W., 2018. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.007>
- Costa, J., Bavaro, S.L., Benedé, S., Diaz-Perales, A., Bueno-Diaz, C., Gelencser, E., Klueber, J., Larré, C., Lozano-Ojalvo, D., Lupi, R., Mafra, I., Mazzucchelli, G., Molina, E., Monaci, L., Martín-Pedraza, L., Piras, C., Rodrigues, P.M., Roncada, P., Schrama, D., Cirkovic-Velickovic, T., Verhoeckx, K., Villa, C., Kuehn, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Holzhauser, T., 2022. Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Plant Allergens? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 62, 37–63. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08810-9>
- De la Cruz, S., 2018. Alergias alimentarias: Importancia del control de alérgenos en alimentos. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 142–148. <https://doi.org/10.12873/381RMartin>
- de Luis, R., Arias, O., Puértolas, E., Benedé, S., Sánchez, L., Rebollar, M.C., Pérez, M.D., 2009. Effect of high-intensity pulse electric fields on denaturation of bovine whey proteins. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 64, 422–426.
- Díaz-Perales, A., Tabar, A.I., Sánchez-Monge, R., García, B.E., Gómez, B., Barber, D., Salcedo, G., 2002. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 790–796. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128242>
- Duffort, O.A., Polo, F., Lombardero, M., Díaz-Perales, A., Sánchez-Monge, R., García-Casado, G., Salcedo, G., Barber, D., 2002. Immunoassay To Quantify the Major Peach Allergen Pru p 3 in Foodstuffs. Differential Allergen Release and Stability under Physiological Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7738–7741. <https://doi.org/10.1021/jf0258398>
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA J.* 12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ Panel), Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Castle, L., Crotta, M., Grob, K., Milana, M.R., Petersen, A., Roig Sagués, A.X., Vinagre Silva, F., Barthélémy, E., Christodoulidou, A., Messens, W., Allende, A., 2022. The efficacy and safety of high-pressure processing of food. *EFSA J.* 20. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7128>

- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié, D., Bugaud, C., 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J. Exp. Bot.* 64, 1451–1469. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert035>
- European Academy of Allergy and Clinical Immunology | EAACI.org [WWW Document], n.d. URL <https://www.eaaci.org/> (accessed 3.8.22).
- Fernández, A., Butz, P., Tauscher, B., 2009. IgE binding capacity of apple allergens preserved after high pressure treatment. *High Press. Res.* 29, 705–712. <https://doi.org/10.1080/08957950903384990>
- Fernández-Rivas, M., 2003. Alergia a frutas y hortalizas [WWW Document]. URL <https://docplayer.es/24610595-Alergia-a-frutas-y-hortalizas.html> (accessed 10.8.21).
- Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Rodríguez-Pérez, R., Benito, C., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Alonso, M.D., Rosado, A., Tejedor, M.A., Vila, C., Casas, M.L., 2003. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 789–795. <https://doi.org/10.1016/S0091>
- Fiocchi, A., Dahda, L., Dupont, C., Campoy, C., Fierro, V., Nieto, A., 2016. Cow’s milk allergy: towards an update of DRACMA guidelines. *World Allergy Organ. J.* 9, 35. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0125-0>
- Gaier, S., Marsh, J., Oberhuber, C., Rigby, N.M., Lovegrove, A., Alessandri, S., Briza, P., Radauer, C., Zuidmeer, L., van Ree, R., Hemmer, W., Sancho, A.I., Mills, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Shewry, P.R., 2008. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. *Mol. Nutr. Food Res.* <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700274>
- Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., van der Meer, I.M., Kodde, L., Laimer, M., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Gilissen, L.J.W.J., 2005. Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 110, 479–491. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1856-9>
- García, B.E., Lizaso, M.T., 2011. Cross-reactivity syndromes in food allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 21, 162–170.
- Garino, C., Zitelli, F., Travaglia, F., Colsson, J.D., Cravotto, G., Arlorio, M., 2012. Evaluation of the Impact of Sequential Microwave/Ultrasound Processing on the IgE Binding Properties of Pru p 3 in Treated Peach Juice. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8755–8762. <https://doi.org/10.1021/jf302027e>
- Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., Knorr, D., 2015. Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.015>
- Gonçalves, M.W., Argenta, L.C., Martin, M.S.D., 2017. Maturity and quality of apple fruit during the harvest period at apple industry. *Rev. Bras. Frutic.* 39. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017825>
- Graell, J., Romero Fabregat, M.P., Casp Vanaclocha, A., 2014. Tecnología de los alimentos de origen vegetal. Síntesis, Madrid.

- Harju, M., Kallioinen, H., Tossavainen, O., 2012. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *Int. Dairy J.* 22, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>
- Hassan, A.K.G., Venkatesh, Y.P., 2015. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 47, 180–187.
- Hite, B.H., Giddings, N.J., Weakley, C.E., 1914. The Effect of Pressure on Certain Micro-Organisms Encountered in the Preservation of Fruits and Vegetables. West Virginia University Agricultural Experiment Station. <https://doi.org/10.33915/agnic.146>
- Houska, M., Heroldova, M., Vavrova, H., Kucera, P., Setinova, I., Havranova, M., Honzova, S., Strohalm, J., Kminkova, M., Proskova, A., Novotna, P., 2009. Is high-pressure treatment able to modify the allergenicity of the main apple juice allergen, Mal d1? *High Press. Res.* 29, 14–22. <https://doi.org/10.1080/08957950802454068>
- Huang, H.-W., Hsu, C.-P., Yang, B.B., Wang, C.-Y., 2014. Potential Utility of High-Pressure Processing to Address the Risk of Food Allergen Concerns. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 78–90. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12045>
- Husband, F.A., Aldick, T., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Hendrickx, M., Skypala, I., Mackie, A.R., 2011. High-pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1087–1095. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000566>
- Hussey, P.J., Ketelaar, T., Deeks, M.J., 2006. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 109–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105206>
- Informe del Comité Científico de la AESAN sobre Alergias Alimentarias, 2007. 61.
- Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Molina, E., López-Expósito, I., 2015. Effect of Processing Technologies on the Allergenicity of Food Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 1902–1917. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.736435>
- Johnson, P.E., Van der Plancken, I., Balasa, A., Husband, F.A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Knorr, D., Mills, E.N.C., Mackie, A.R., 2010. High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1701–1710. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000006>
- Kader, A.A. (Ed.), 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*, 3. ed. ed, Publication / University of California, Agricultural and Natural Resources. Univ. of California, Agriculture and Natural Resources Communication Services, Oakland, Calif.
- Karageorgou, E., Samanidou, V., 2014. Youden test application in robustness assays during method validation. *J. Chromatogr. A* 1353, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>
- Koppelman, S.J., Hefle, S.L., 2006. *Detecting allergens in food*, Woodhead publishing in food science and technology. Woodhead, Cambridge.
- Kumar, S., 2015. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. *Adv. Appl. Sci. Res.* 6, 114–124.

- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Fleurence, J., 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81, 517–525. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00481-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00481-8)
- Lardeux, B., Gouhot, B., Forestier, M., 1983. Improved recovery of rat liver fractions enriched in lysosomes by specific alteration of the sedimentation properties of mitochondria. *Anal. Biochem.* 131, 160–165. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90148-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90148-3)
- Larocca, M., Martelli, G., Grossi, G., Padula, M.C., Riccio, P., Rossano, R., 2013. Peel LTP (Pru p 3) – the major allergen of peach – is methylated. A proteomic study. *Food Chem.* 141, 2765–2771. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.082>
- Lavilla, M., Orcajo, J., Díaz-Perales, A., Gamboa, P., 2016. Examining the effect of High Pressure Processing on the allergenic potential of the major allergen in peach (Pru p 3). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 38, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.021>
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A.K.M., 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.06.004>
- Lorente, J., Valero, M., Ancos, B. de, Martí, N., García, S., López, N., Ramos, S., Landajo, B., Ferrer, J., Alberdi, B., Esturo, A., 2011. Aspectos industriales.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I., Raso, J., 2014. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 247, 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9688-2>
- Ma, Y., Zhao, X., Ren, H., Wu, H., Guo, M., Zhang, Y., He, Z., Han, J., Tong, R., 2018. Significant Reduction of the Expression of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Allergen-Encoding Genes by Fruit Bagging with Opaque Paper. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4051–4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00207>
- Maryniak, N.Z., Sancho, A.I., Hansen, E.B., Bøgh, K.L., 2022. Alternatives to Cow’s Milk-Based Infant Formulas in the Prevention and Management of Cow’s Milk Allergy. *Foods* 11, 926. <https://doi.org/10.3390/foods11070926>
- Matthes, A., Schmitz-Eiberger, M., 2009. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) Allergen Mal d 1: Effect of Cultivar, Cultivation System, and Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10548–10553. <https://doi.org/10.1021/jf901938q>
- Meglio, P., Bartone, E., Plantamura, M., Arabito, E., Giampietro, P.G., 2004. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow’s milk allergy. *Allergy* 59, 980–987. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00542.x>
- Melendo, J.A., Beltrán, J.A., Roncalés, P., 1998. Characterization of a crude lysosomal extract from bovine spleen for its use in the processing of muscle foods. *Food Biotechnol.* 12, 239–262. <https://doi.org/10.1080/08905439809549955>
- Messina, M., Venter, C., 2020. Recent Surveys on Food Allergy Prevalence. *Nutr. Today* 55, 22–29. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000389>
- Meulenbroek, L.A.P.M., Oliveira, S., den Hartog Jager, C.F., Klemans, R.J.B., Lebens, A.F.M., van Baalen, T., Knulst, A.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Garssen, J.,

- Knippels, L.M.J., van Hoffen, E., 2014. The degree of whey hydrolysis does not uniformly affect *in vitro* basophil and T cell responses of cow's milk-allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* 44, 529–539. <https://doi.org/10.1111/cea.12254>
- Meyer-Pittroff, R., Behrendt, H., Ring, J., 2007. Specific immuno-modulation and therapy by means of high pressure treated allergens. *High Press. Res.* 27, 63–67. <https://doi.org/10.1080/08957950601082557>
- Mikulič Petkovšek, M., Štampar, F., Veberič, R., 2009. Changes in the inner quality parameters of apple fruit from technological to edible maturity. *Acta Agric. Slov.* 93. <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0003-3>
- Molinas, J., Arduoso, L., Crisci, C., 2004. *Alergia Alimentaria*.
- Monaci, L., Visconti, A., 2010. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.003>
- Navarro, F., Harouna, S., Calvo, M., Pérez, M.D., Sánchez, L., 2015. Kinetic and thermodynamic parameters for thermal denaturation of ovine milk lactoferrin determined by its loss of immunoreactivity. *J. Dairy Sci.* 98, 4328–4337. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9403>
- Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Roberts, G., Muraro, A., Sheikh, A., the EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group, 2014. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 69, 992–1007. <https://doi.org/10.1111/all.12423>
- O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- Ordóñez-Santos, L.E., Pinzón-Zarate, L.X., González-Salcedo, L.O., 2015. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 27, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.010>
- Ortolani, C., Bruijnzeel-koomen, C., Bengtsson, U., Bindslev-jensen, C., Björkstén, B., Høst, A., Ispano, M., Jarish, R., Madsen, C., Nekam, K., Paganelli, R., Poulsen, L., Wüthrich, B., 1999. Controversial aspects of adverse reactions to food: Adverse reactions to food. *Allergy* 54, 27–45. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00913.x>
- Pagliarani, G., Paris, R., Tartarini, S., Sansavini, S., 2009. Cloning and expression of the major allergen genes in apple fruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 176–181. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512617>
- Paschke, A., 2009. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 959–962. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800187>
- Pasini, G., Curioni, A., Vegro, M., Pagani, M., Masi, A., Schievano, E., Antico, A., 2012. Extraction and mass spectrometry identification of a major peach allergen Pru p 1. *J. Sci. Food Agric.* 92, 570–576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4609>
- Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Folloni, S., Cianci, M., Pantano, S., Helliwell, J.R., Zanotti, G., 2006. Crystal Structure of Peach Pru p 3, the Prototypic Member of

- the Family of Plant Non-specific Lipid Transfer Protein Pan-allergens. *J. Mol. Biol.* 356, 684–694. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.063>
- Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M., Baroglio, C., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A., 1999. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 520–526. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70480-x](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70480-x)
- Pinelo, M., Zeuner, B., Meyer, A.S., 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod. Process.* 88, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.005>
- Raso, J., Heinz, V., 2006. Pulsed electric fields technology for the food industry: fundamentals and applications, Food engineering series. Springer, New York London.
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J., 1998. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 465–471. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.465-471.1998>
- Reglamento (UE) no 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión Texto pertinente a efectos del EEE, n.d. 46.
- Renard, C., Maingonnat, J.F., 2012. Thermal Processing of Fruits and Fruit Juices, in: Thermal Food Processing New Technologies and Quality Issues. CRC Press.
- Research Collaboratory for Structural Bionformatics Protein Data Bank, RCSB PDB, 2011.
- Rodriguez-Perez, R., Crespo, J.F., Rodríguez, J., Salcedo, G., 2003. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 634–639. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.74>
- Ruano-Zaragoza, M., Casas-Saucedo, R., De la Cruz Martínez, C.A., Araujo-Sanchez, G., Gelis, S., González, M.F., San Bartolomé, C., Pascal, M., Jiménez-Rodríguez, T.W., Gonzalez-Delgado, P., Fernandez-Sanchez, J., Muñoz-Cano, R., Bartra, J., 2022. Advances in the understanding of the *cofactor effect* in lipid transfer protein food allergy: From phenotype description to clinical management. *Allergy* 77, 1924–1926. <https://doi.org/10.1111/all.15291>
- Ruiz Sánchez, J.G., 2018. Una visión global de las reacciones adversas a alimentos: alergia e intolerancia alimentaria. *Nutr. Hosp.* 35. <https://doi.org/10.20960/nh.2134>
- Saito M., Onda T., Kojima M., Naganuma K., Tsuji M., Fukazawa C., 2010. Extraction of Peach Allergen Pru p3 from Peach Skin. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 57, 150–156. <https://doi.org/10.3136/nskkk.57.150>

- Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Barber, D., Díaz-Perales, A., 2007. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 781–791. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2007.01.001>
- Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Díaz-Perales, A., 2008. Plant food allergens: peach non-specific lipid transfer protein Pru p 3 as a model. A review. *Span. J. Agric. Res.* 6, 30. <https://doi.org/10.5424/sjar/200806S1-371>
- Saldaña, G., Cebrián, G., Abenoza, M., Sánchez-Gimeno, C., Álvarez, I., Raso, J., 2017. Assessing the efficacy of PEF treatments for improving polyphenol extraction during red wine vinifications. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 39, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.008>
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., Raso, J., 2010. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J. Food Eng.* 100, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.021>
- Sampson, H.A., O'Mahony, L., Burks, A.W., Plaut, M., Lack, G., Akdis, C.A., 2018. Mechanisms of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.005>
- Sancho, A.I., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K.W., van Ree, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer, M., Mills, E.N.C., 2006a. Effect of Postharvest Storage on the Expression of the Apple Allergen Mal d 1. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5917–5923. <https://doi.org/10.1021/jf060880m>
- Sancho, A.I., Foxall, R., Rigby, N.M., Browne, T., Zuidmeer, L., van Ree, R., Waldron, K.W., Mills, E.N.C., 2006b. Maturity and Storage Influence on the Apple (*Malus domestica*) Allergen Mal d 3, a Nonspecific Lipid Transfer Protein. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5098–5104. <https://doi.org/10.1021/jf0530446>
- Sancho, A.I., Rigby, N.M., Zuidmeer, L., Asero, R., Mistrello, G., Amato, S., Gonzalez-Mancebo, E., Fernandez-Rivas, M., Ree, R., Mills, E.N.C., 2005. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy* 60, 1262–1268. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00876.x>
- Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A., Carle, R., 2007. Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.005>
- Schmitz-Eiberger, M., Matthes, A., 2011. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chem.* 127, 1459–1464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.101>
- Sechi, S., Chait, B.T., 1998. Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Anal. Chem.* 70, 5150–5158. <https://doi.org/10.1021/ac9806005>
- Shriver, S.K., Yang, W.W., 2011. Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control. *Food Eng. Rev.* 3, 26–43. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9033-9>

- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2018. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Simonato, B., Marangon, M., Vincenzi, S., Vegro, M., Pasini, G., 2020. Evaluation of the phenolic profile and immunoreactivity of Mal d 3 allergen in ancient apple cultivars from Italy. *J. Sci. Food Agric.* 100, 4978–4986. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10561>
- Sinha, M., Singh, R.P., Kushwaha, G.S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T.P., 2014. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *Sci. World J.* 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/543195>
- Skic, A., Szymańska-Chargot, M., Kruk, B., Chylińska, M., Pieczywek, P., Kurenda, A., Zdunek, A., Rutkowski, K., 2016. Determination of the Optimum Harvest Window for Apples Using the Non-Destructive Biospeckle Method. *Sensors* 16, 661. <https://doi.org/10.3390/s16050661>
- Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), 2015. Alergológica 2015. [WWW Document]. Portal SEAIC. URL <https://www.seaic.org/inicio/noticias-general/alergologica-2015.html> (accessed 2.15.22).
- Szabó E.E., Takács K., 2018. Distinction of apple cultivars according to their mal D 1 allergen coding genes using PCR technique. *Acta Aliment.* 47, 395–401. <https://doi.org/10.1556/066.2018.47.4.1>
- Szamos, J., Takács, K., Szabó, E.E., Kovács, E., Gelencsér, É., 2011. Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple. *Food Res. Int.* 44, 2674–2678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.033>
- Taylor, S.B., Christensen, G., Grinter, K., Sherlock, R., Warren, L., 2018. The Allergen Bureau VITAL Program. *J. AOAC Int.* 101, 77–82. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0392>
- Thakur, B.R., Nelson, P.E., 1998. High-pressure processing and preservation of food. *Food Rev. Int.* 14, 427–447. <https://doi.org/10.1080/87559129809541171>
- Tuppo, L., Spadaccini, R., Alessandri, C., Wienk, H., Boelens, R., Giangrieco, I., Tamburrini, M., Mari, A., Picone, D., Ciardiello, M.A., 2014. Structure, stability, and IgE binding of the peach allergen Peamaclein (Pru p 7): Structure and Stability of Peamaclein. *Biopolymers* 102, 416–425. <https://doi.org/10.1002/bip.22530>
- Turner, P.J., Jerschow, E., Umasunthar, T., Lin, R., Campbell, D.E., Boyle, R.J., 2017. Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5, 1169–1178. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.06.031>
- UCFA | Utrecht Center for Food Allergy [WWW Document], n.d. . UCFA Utrecht Cent. Food Allergy. URL <https://ucfa.nl/> (accessed 2.8.22).
- van Hengel, A.J., 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 111–118. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1353-5>

- van Ree, R., Poulsen, L.K., Wong, G.W., Ballmer-Weber, B.K., Gao, Z., Jia, X., 2015. [Food allergy: definitions, prevalence, diagnosis and therapy]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 49, 87–92.
- Vanga, S.K., Jain, M., Raghavan, V., 2018. Significance of fruit and vegetable allergens: Possibilities of its reduction through processing. *Food Rev. Int.* 34, 103–125. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1239208>
- Vanga, S.K., Singh, A., Raghavan, V., 2017. Review of conventional and novel food processing methods on food allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 2077–2094. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1045965>
- Vasantha Rupasinghe, H.P., Juan, L., 2012. Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages, in: El-Samragy, Y. (Ed.), *Food Additive*. InTech. <https://doi.org/10.5772/32148>
- Vassilopoulou, E., Rigby, N., Moreno, F.J., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Tassios, I., Papadopoulos, N.G., Saxoni-Papageorgiou, P., van Ree, R., Mills, C., 2006. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.04.057>
- Vazquez-Ortiz, M., Turner, P.J., 2016. Improving the safety of oral immunotherapy for food allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 27, 117–125. <https://doi.org/10.1111/pai.12510>
- Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B., 2002. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 964, 47–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04132.x>
- Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Kerkhof, M., Arens, P., Heijerman-Pepelman, G., Dubois, A.E.J., 2011. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges: Identification of low allergenic apple cultivars. *Allergy* 66, 491–498. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02499.x>
- Vohlonen, I., Terho, E.O., Koivikko, A., Vanto, T., Holmén, A., Heinonen, O.P., 1989. Reproducibility of the skin prick test. *Allergy* 44, 525–531. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1989.tb04196.x>
- Wang, J., Vanga, S.K., Raghavan, V., 2019. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions on the fruit allergenicity: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1027–1043. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1389691>
- Wehbi, Z., Pérez, M.-D., Sánchez, L., Pocoví, C., Barbana, C., Calvo, M., 2005. Effect of Heat Treatment on Denaturation of Bovine α -Lactalbumin: Determination of Kinetic and Thermodynamic Parameters. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9730–9736. <https://doi.org/10.1021/jf050825y>
- Wen, J., Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Breiteneder, H., 1997. The Potential of Betv1 Homologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8, 317–333. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0447>
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page [WWW Document], n.d. URL <http://www.allergen.org/> (accessed 10.11.21).

- Wijesinha-Bettoni, R., Alexeev, Y., Johnson, P., Marsh, J., Sancho, A.I., U. Abdullah, S., Mackie, A.R., Shewry, P.R., Smith, L.J., Mills, E.N.C., 2010. The Structural Characteristics of Nonspecific Lipid Transfer Proteins Explain Their Resistance to Gastroduodenal Proteolysis. *Biochemistry* 49, 2130–2139. <https://doi.org/10.1021/bi901939z>
- Wood, R., 2017. Oral Immunotherapy for Food Allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 27, 151–159. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0143>
- Wüthrich, B., 2000. Lethal or life-threatening allergic reactions to food. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 10, 59–65.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C., 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* 17, 191–198. <https://doi.org/10.1110/ps.073300108>
- Zubeldia, J.M., Baeza, M.^a L., Jáuregui, I., Senent, C.J., 2012. Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. Nerea S.A.

Anexos

8. ANEXOS

Anexo I. Lista de sustancias o productos que causan alergias o intolerancias alimentarias que incluye el Anexo II del Reglamento UE 1169/2011.

1. Cereales que contengan gluten, a saber: trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas y productos derivados, salvo:
 - a. Jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa.
 - b. Maltodextrinas a base de trigo.
 - c. Jarabes de glucosa a base de cebada.
 - d. Cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevos.
4. Pescado y productos a base de pescado, salvo:
 - a. Gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados carotenoides.
 - b. Gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja, salvo:
 - a. Aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinada.
 - b. Tocoferoles naturales mezclados (E306), D-alfa-tocoferol natural, acetato de D-alfa-tocoferol natural y succinato de D-alfa-tocoferol natural derivados de la soja.
 - c. Fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
 - d. Ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), excepto:
 - a. Lactosuero utilizado para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
 - b. Lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir: almendras (*Amygdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), pistachos (*Pistacia vera*), nueces macadamia o nueces Australia (*Macadamia ternifolia*) y

productos derivados, salvo los frutos de cáscaras utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.

9. Apio y productos derivados.

10. Mostaza y productos derivados.

11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.

12. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/L en términos SO₂ total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.

13. Altramuces y productos a base de altramuces.

14. Moluscos y productos a base de moluscos.

Anexo II. Cuestionario recabado de pacientes en el estudio de alergenidad de la proteína Pru p 3

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Aeroalérgenos	Años	Clínica	Adrenalina	Cofactores
1	Mujer	25	Frutas rosáceas, acelgas, calabacín, berenjena, mostaza, nuez, pistacho	Gramíneas, salsola, alternaria, ciprés, chopo, gato, perro	7	Cólico abdominal, SAO	No	Ejercicio, Estrés
2	Mujer	35	Cereza, melón, manzana	Pólenes	30	Angiodema, Urticaria, SAO	No	No
3	Mujer	42	Melocotón, melón y frutos secos	Polen, hongos, animales	3	Angiodema, Urticaria, SAO	No	No
4	Mujer	42	Cereza, uva, melón y manzana	No	5	Angiodema, Urticaria, SAO	Si (2 veces)	Ejercicio
5	Mujer	35	Manzana y melón	Pólenes	5	Angiodema, Urticaria, SAO	No	AINEs
6	Mujer	32	Melocotón, almendra, nuez moscada	No	7	Angiodema, Urticaria, SAO	No	No
7	Mujer	26	Melocotón, manzana, melón, cereza, cereales	Pólenes, ácaros	20	Angiodema, Urticaria, SAO	Si (1 vez)	No
8	Mujer	41	Frutos secos, miel, brócoli, uva, tomate, manzanilla, pepinillo	Pólenes	20	Angiodema, Urticaria, SAO, Shock anafiláctico	No	Ejercicio, alcohol, menstruación
9	Mujer	35	Berenjena, lechuga, escarola, cacahuete, ajo	No	16	SAO, Angiodema, rinitis	No	No
10	Mujer	42	Melocotón, plátano, frutos secos, mostaza	Epitelios, pólenes	20	Shock anafiláctico, urticaria, SAO	No	No
11	Mujer	27	Tomate, pimiento, frutos secos, manzana, ciruela	No	10	SAO, angiodema, cólico abdominal, shock anafiláctico	No	Ejercicio

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Aeroalérgenos	Años	Clínica	Adrenalina	Cofactores
12	Hombre	43	Melocotón, ciruela	Epitelios, pólenes	4	SAO, angiodema, rinitis	No	Ejercicio
13	Mujer	42	Melocotón	Pólenes	28	SAO, asma	No	No
14	Mujer	38	Manzana, mandarina, plátano, melocotón, frutos secos, verdura	Pólenes	20	SAO, urticaria	No	AINEs
15	Mujer	52	Nuez, melocotón	No	15	Angiodema, Cólico abdominal, hipotensión, urticaria	No	No
16	Mujer	33	Melocotón, frutos secos	Ácaros, pólenes	5	Angiodema, rinitis, urticaria	No	AiNEs, estrés
17	Hombre	25	Melocotón, rosáceas	Pólenes, epitelio	5	Urticaria, edema glotis	No	No
18	Hombre	10	Manzana, plátano, melocotón, melón, sandía, uvas, tomate, frutos secos, lechuga, cebolla	Pólenes, ácaros	10	SAO, angiodema, edema glotis	No	Alcohol
19	Mujer	42	Frutos secos, cereza, manzana, albaricoque, alberge, melocotón	Platanero	20	SAO, cólico abdominal	No	No
20	Hombre	51	melocotón, piel de patata	No	30	cólico abdominal	No	No
21	Mujer	35	Melocotón, fresas, arándanos, plátanos, cereza	Pólenes, epitelio	30	SAO, urticaria	No	No
22	Mujer	23	Melocotón, plátano, frutos secos	Ciprés, platanero, gramíneas, animales, ácaros, alternaria	10	SAO, urticaria, angiodema, asma	No	No
23	Mujer	30	Frutas rosáceas	Platanero, gramíneas, olivo y salsola	1	Urticaria, angiodema, rinitis, asma	No	AINEs

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Aeroalérgenos	Años	Clínica	Adrenalina	Cofactores
24	Hombre	32	Cacahuete, nuez, melocotón, mostaza	gramíneas, platanero	15	SAO, urticaria, angiodema, rinitis, asma, hipotensión	No	AINEs
25	Mujer	40	Frutos secos, melocotón	No	30	SAO, urticaria, angiodema, asma	No	No
26	Hombre	20	Frutas rosáceas, calabacín, calabaza, berenjena	Gramíneas, salsola	3	SAO, urticaria, angiodema, asma, hipotensión	No	No
27	Mujer	27	Frutos secos, uva, cereza, melocotón	Gramíneas, ciprés	8	Shock anafiláctico, SAO, urticaria, angiodema, asma, hipotensión	Si	AINEs

Anexo III. Cuestionario recabado de pacientes en el estudio de alergenicidad de la proteína Mal d 3.

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Años	Clínica	Adrenalina	Cofactores
1	Mujer	20	Cereza	5	Shock anafiláctico	No	No
2	Mujer	27	Frutas rosáceas, acelgas, calabacín, berenjena, mostaza, nuez, pistacho	9	Cólico abdominal, SAO	No	Ejercicio, Estrés
3	Mujer	32	Frutas rosáceas	15	Cólico abdominal, SAO	No	No
4	Hombre	57	Melocotón, nueces, endrinas	14	SAO, urticaria	No	AINEs
5	Mujer	44	Melocotón, sandía	4	Shock anafiláctico, SAO	No	AINEs
6	Hombre	20	Nueces, cacahuets, kiwi	1	Shock anafiláctico	No	Ejercicio
7	Hombre	28	Cereza, fresa	20	Cólico abdominal, urticaria	No	No
8	Hombre	47	Frutos secos, frutas rosáceas y verduras	7	Angiodema, urticaria, asma	Si	AINEs, ejercicio
9	Mujer	23	Melocotón, manzana, melón	3	SAO, urticaria	No	Ejercicio
10	Mujer	47	Pavía	37	Shock anafiláctico	No	AINEs, ejercicio
11	Mujer	30	Frutas rosáceas, cucurbitáceas, tropicales	27	Cólico abdominal, SAO, angiodema	No	Ejercicio
12	Mujer	37	Melocotón, pavías, cerezas	15	Cólico abdominal, SAO, urticaria	No	No
13	Mujer	28	Melocotón, granada	18	Urticaria, angiodema, asma	No	Alcohol
14	Mujer	32	Melocotón, manzana	16	urticaria	No	Ejercicio
15	Mujer	34	Frutas rosáceas y frutos secos	20	Shock anafiláctico, SAO, angiodema	No	AINEs, ejercicio
16	Mujer	35	Prunáceas	20	Urticaria, angiodema	No	No

Paciente	Género	Edad	Alergia alimentaria	Años	Clínica	Adrenalina	Cofactores
17	Hombre	32	Melón, sandía, melocotón, tomate, plátano, frutos secos	15	SAO, urticaria, angiodema, rinitis-conjuntivitis	No	Alcohol
18	Mujer	29	Melocotón, manzana, cereza, ciruela, nuez	25	SAO, urticaria, angiodema	No	Ejercicio

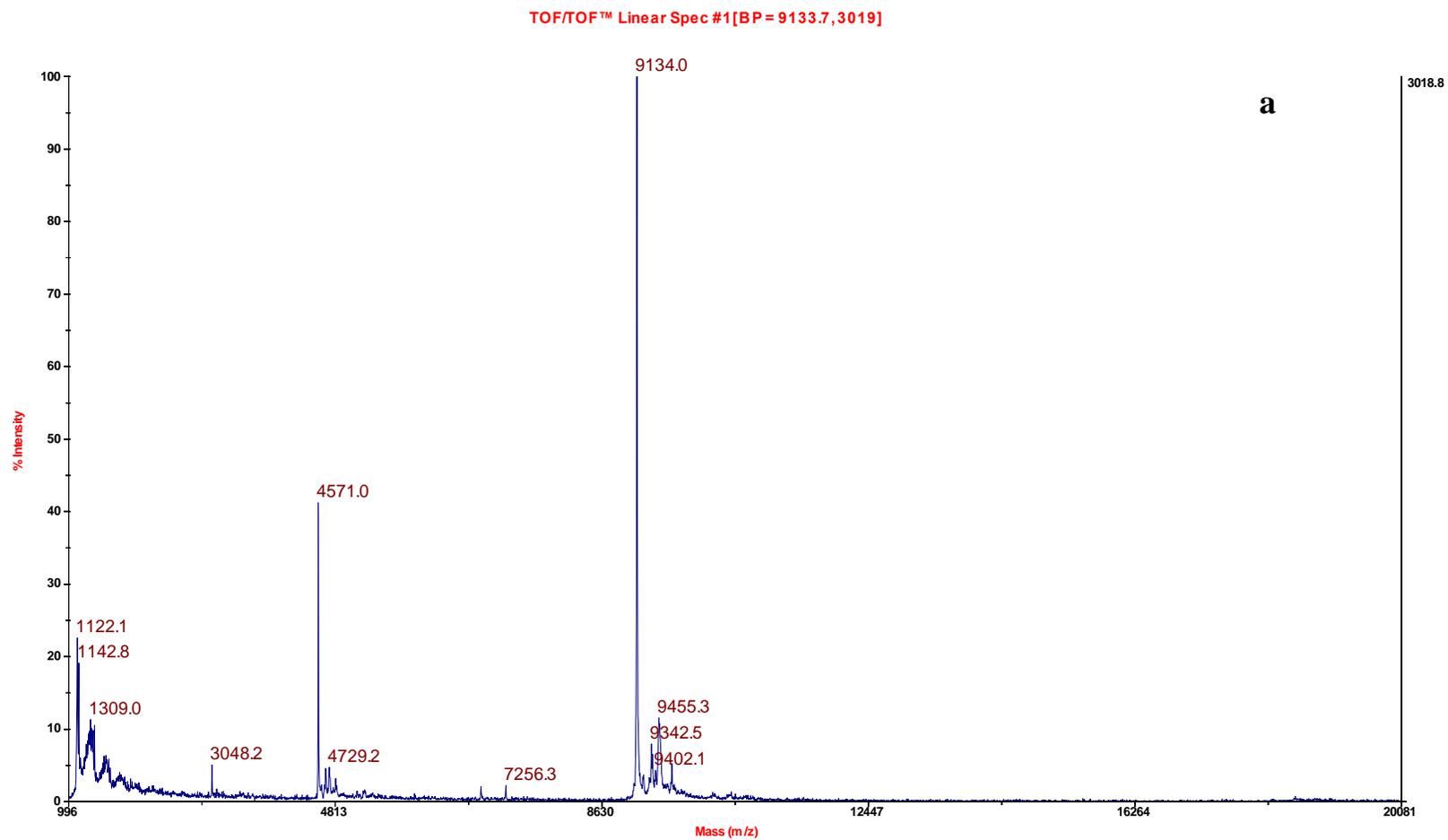
Anexo IV: Sintomatología, niveles de IgE sérica y diámetro longitudinal ($\varnothing L$), transversal ($\varnothing T$) y su producto ($\varnothing L \times \varnothing T$) obtenidos en la prueba del prick test en los pacientes alérgicos incluidos en el estudio de alergia al melocotón. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Paciente	Sintomatología	IgE Pru p 3 (kU/L)	Prick test		
			$\varnothing L$	$\varnothing T$	$\varnothing L \times \varnothing T$
LTP001	UCS	1,09	10	8	80
LTP002	UCS	0,03	6	6	36
LTP003	UCS	15,1	10	8	80
LTP004	UCS	2,56	10	8	80
LTP005	UCS	0,35	14	12	168
LTP006	SAO	9,98	20	13	260
LTP007	UCS	-	-	-	-
LTP008	SA	1,57	20	12	240
LTP009	SAO	2,59	14	8	112
LTP0010	SA	0,92	9	7	63
LTP0011	SA	2,03	18	10	180
LTP0012	UCS	-	-	-	-
LTP0013	UCS	-	-	-	-
LTP0014	SAO	6,83	31	30	930
LTP0015	SA	0,75	14	12	168
LTP0016	UCS	0,12	9	7	63
LTP0017	UCS	-	-	-	-
LTP0018	UCS	0,6	16	9	144
LTP0019	SAO	4,22	18	10	180
LTP0020	UCS	-	-	-	-
LTP0021	SAO	3,51	10	6	60
LTP0022	UCS	6,21	8	7	56
LTP0023	UCS	9,01	6	5	30
LTP0024	SA	4,99	10	6	60
LTP0025	UCS	1,34	16	12	192
LTP0026	SA	13,8	16	12	192
LTP0027	SA	18,6	14	9	126

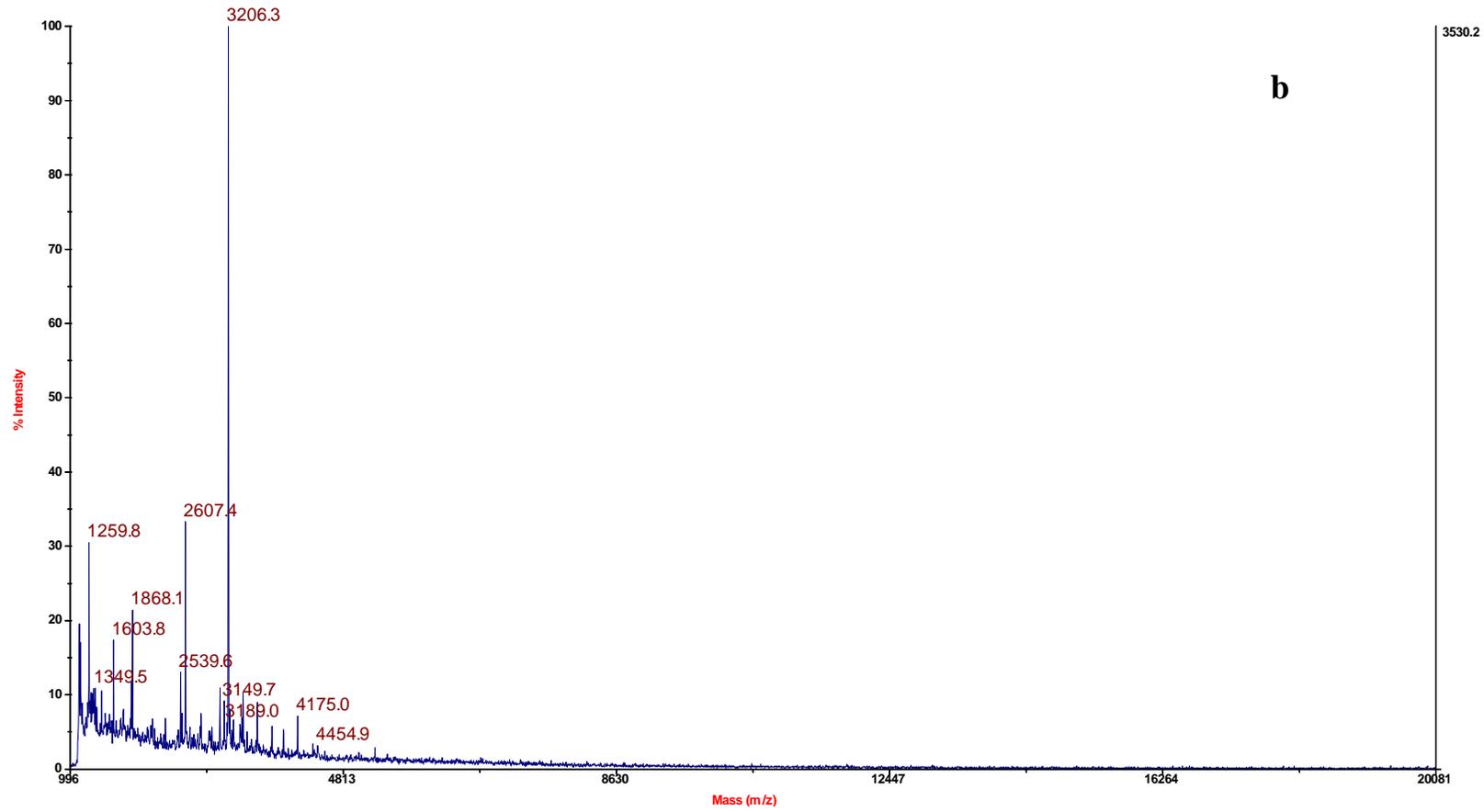
Anexo V: Sintomatología, niveles de IgE sérica y diámetro longitudinal ($\varnothing L$), transversal ($\varnothing T$) y su producto ($\varnothing L \times \varnothing T$) obtenidos en la prueba del prick test en los pacientes alérgicos incluidos en el estudio de alergia a la manzana. Los pacientes indicados con un guion no dieron respuesta en la prueba.

Prick test					
Paciente	Sintomatología	IgE Mal d 3 (kU/L)	$\varnothing L$	$\varnothing T$	$\varnothing L \times \varnothing T$
2101	SA	-	-	-	-
2102	UCS	0,56	12	6	72
2103	UCS	0,47	14	5	70
2104	SAO	0,71	3	3	9
2105	SA	1,36	12	11	132
2106	SA	33,6	11	12	132
2107	UCS	10,7	17	7	119
2108	UCS	39,9	7	9	63
2109	SAO	5,65	6	5	30
2110	SA	-	-	-	-
2111	UCS	4,6	8	9	72
2112	UCS	-	-	-	-
2113	UCS	0,7	10	9	90
2114	UCS	0,31	7	6	42
2115	SA	6,37	11	6	66
2116	UCS	0,02	4	3	12
2117	UCS	0,34	11	9	99
2118	UCS	-	-	-	-

Anexo VI. Espectro de masas de MALDITOF de las muestras de Pru p 3 nativa (a) e incubada con la proteasa ácida 2 a 50°C/2h (b) y a 25°C/24h y con la proteasa de Rhizopus (d).

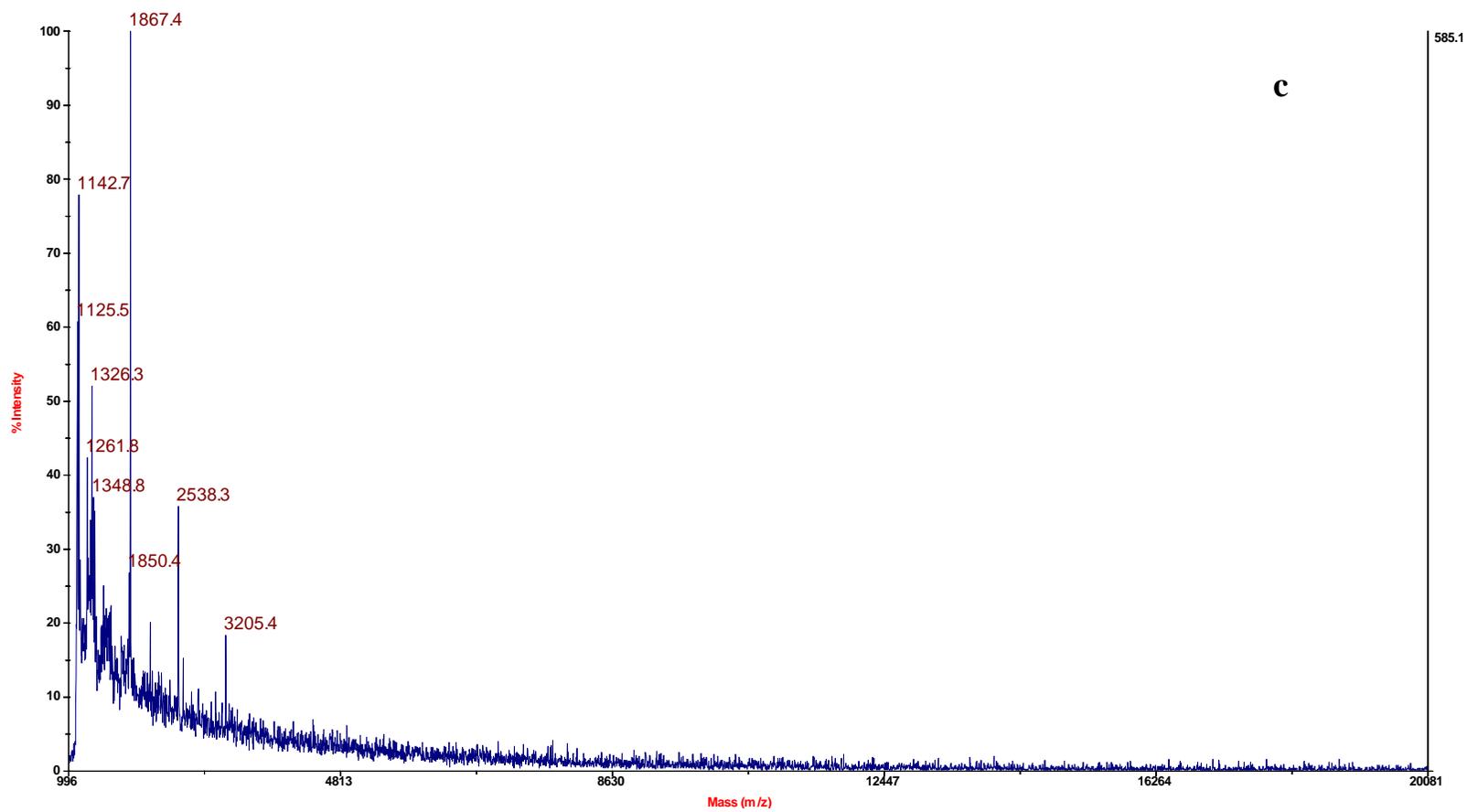


TOF/TOF™ Linear Spec #1 [BP = 3206.2, 3530]



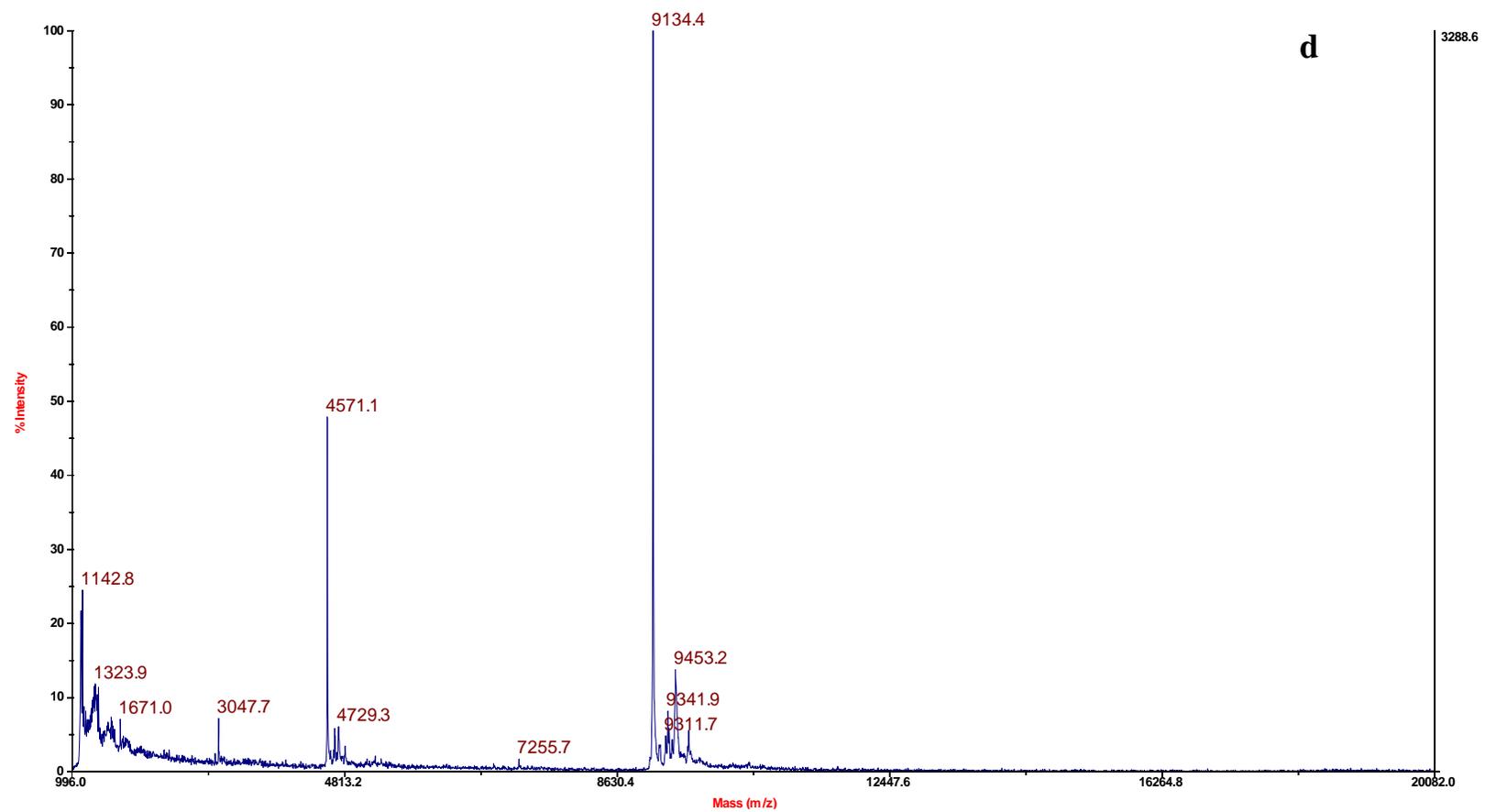
b

TOF/TOF™ Linear Spec #1[BP= 1866.8, 585]

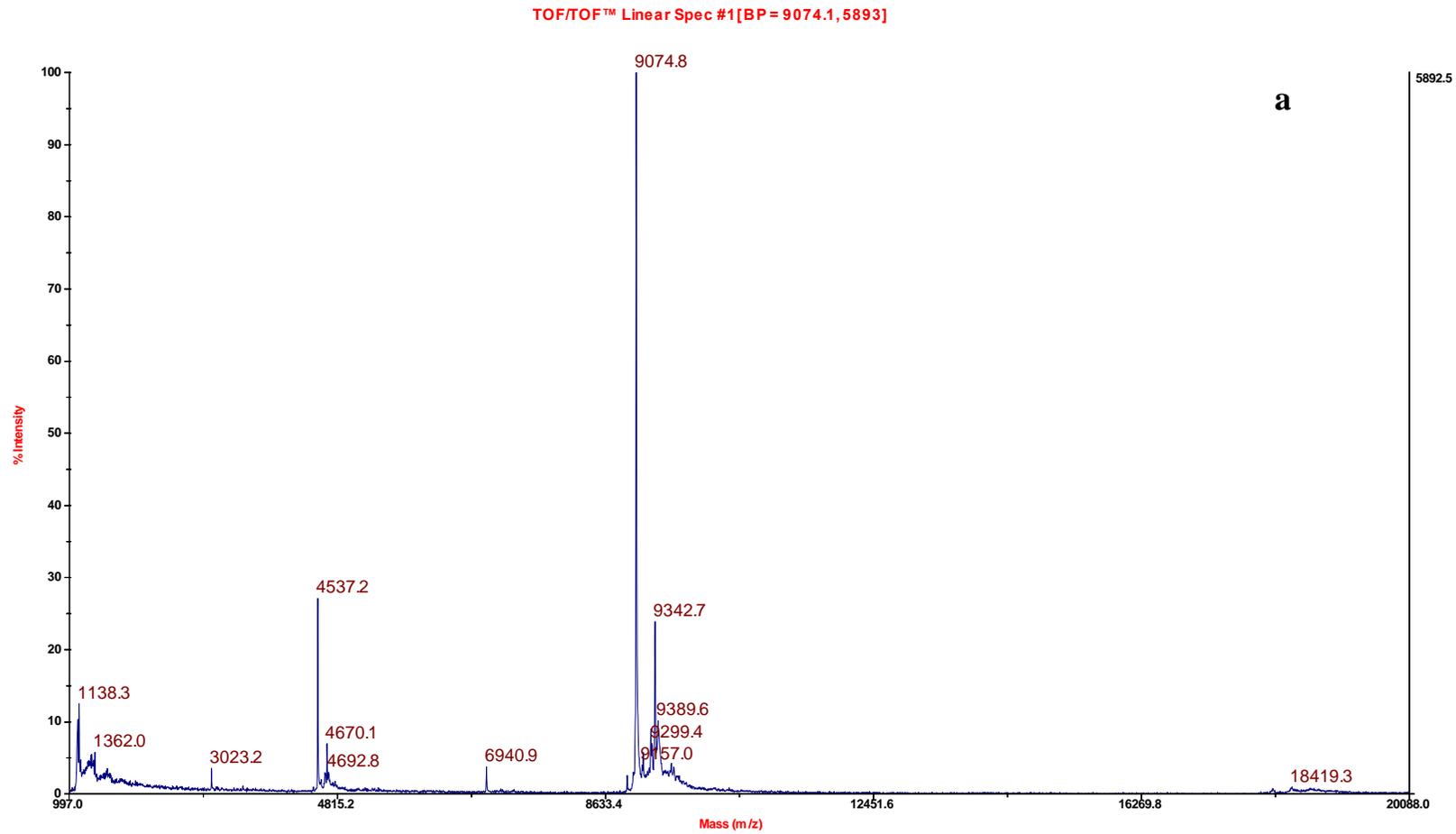


C

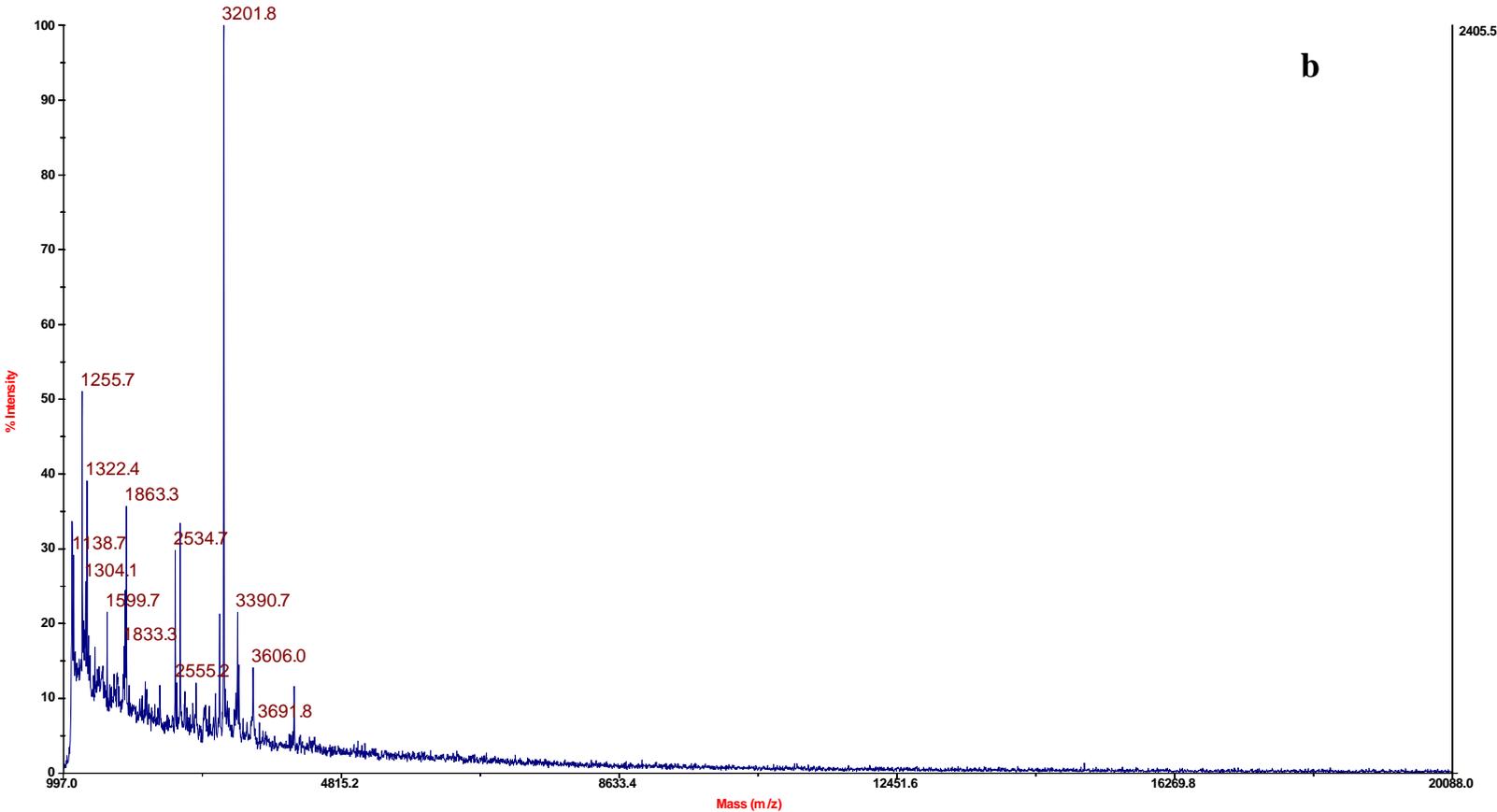
TOF/TOF™ Linear Spec #1 [BP = 9133.6, 3289]



Anexo VII. Espectro de masas MALDITOF de las muestras de Mal d 3 nativa (a) e incubada con la proteasa ácida ****2 a 50°C/2h (b) y a 25°C/24h y con la proteasa de Rhizopus (d).

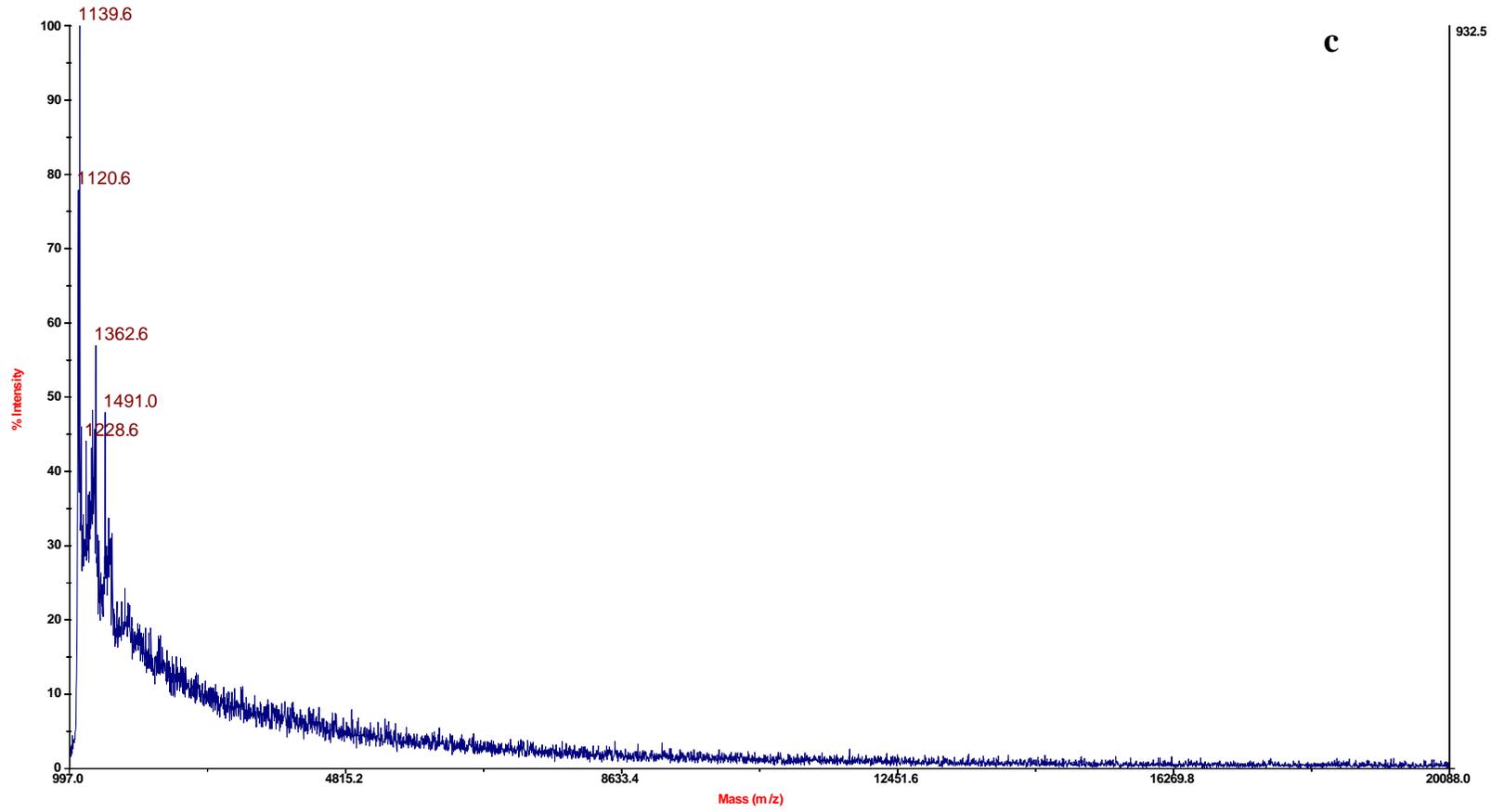


TOF/TOF™ Linear Spec #1 [BP = 3201.6, 2405]



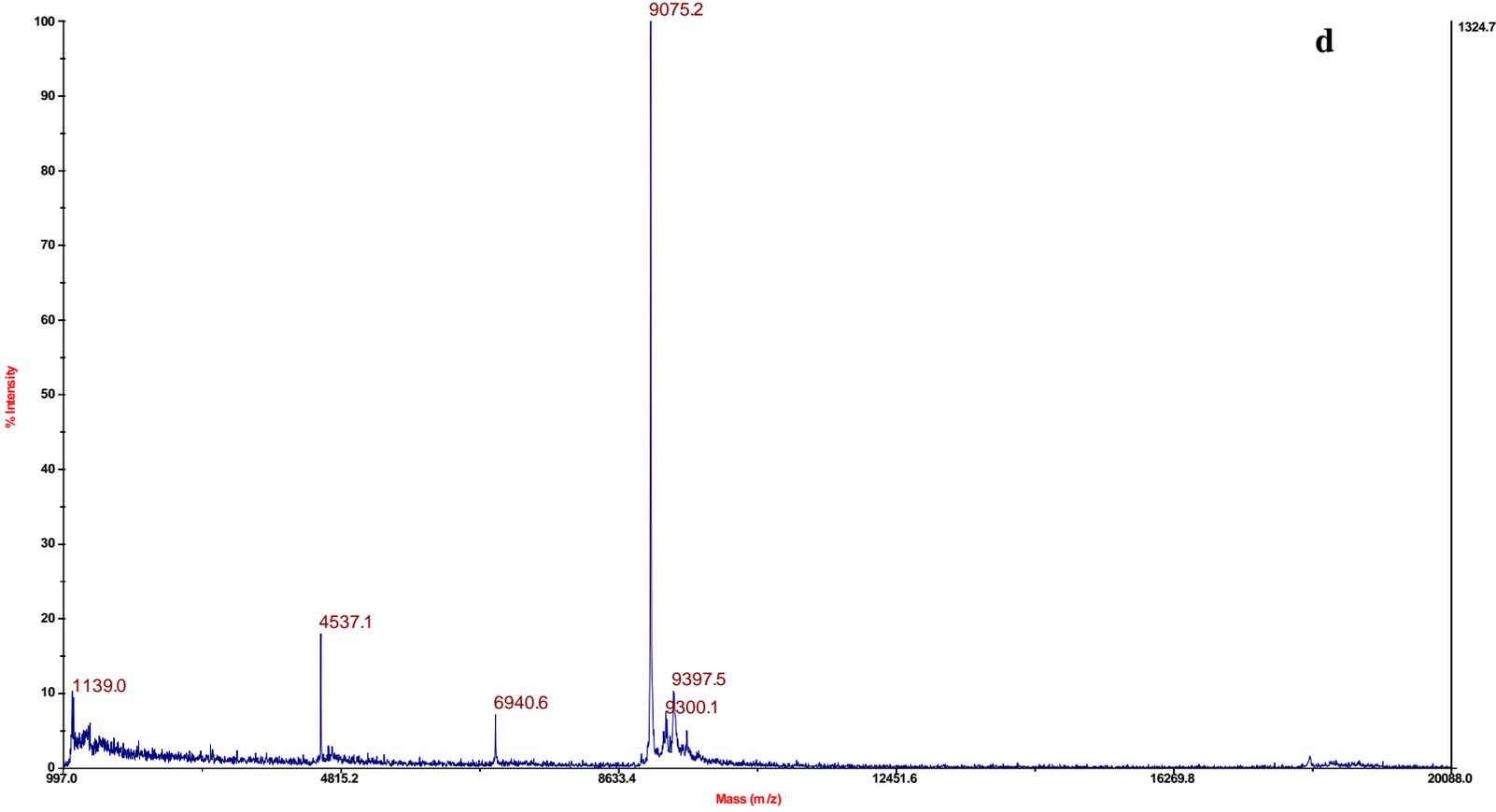
b

TOF/TOF™ Linear Spec #1[BP= 1139.7,933]



C

TOF/TOF™ Linear Spec #1[BP = 9075.0,1325]



d