

# ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE ALÉRGENOS CAUSANTES DE LA ALERGIA ALIMENTARIA A FRUTOS SECOS

MOLECULAR ANALYSIS OF THE MAIN FAMILIES OF ALLERGENS THAT CAUSE FOOD ALLERGY TO TREENUTS

José Antonio Moreno Serrano<sup>1</sup>  
Sandra Katerine Mejía Michay<sup>2</sup>

Fecha de recepción: 13 marzo 2015  
Fecha de aceptación: 01 octubre 2015

## Resumen

*La alergia alimentaria provocada por el consumo de frutos secos, está mediada por proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y Taumatinas (TLPs) descritas como alérgenos de alimentos. El objetivo principal de este estudio fue establecer el papel de LTPs y TLPs en el desarrollo de la alergia a castaña, avellana y nuez. Para el estudio de sensibilización a proteínas alérgicas de frutos secos, se utilizaron sueros de 13 pacientes con síntomas tras la ingestión de frutos secos, y prueba cutánea positiva. Estos sueros fueron aportados por el Hospital de Basurto-Bilbao. Se realizaron inmuno detecciones específicas de IgE, se purificó por HPLC, se caracterizó la secuencia de aminoácidos por N-terminal, análisis de MALDI y ensayos de ELISA. Resultados: En este estudio se identificó y se caracterizó potenciales alérgenos miembros de las familias de LTPs y TLPs en los frutos secos.*

1 Master en Biotecnología, Unidad de Bioquímica, Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, UPM, Madrid, España, josemoreno796@mail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6241-6077>

2 Magister en Gerencia de Salud, Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana, Loja, Ecuador, sandramejia6719@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1200-3626>

*La mayoría de los pacientes están sensibilizados a LTPs, mostraron una respuesta positiva a Cor a 8 y Jug r 3 ambos alérgenos mayoritarios en pacientes con síntomas de alergia a frutos secos. Los pacientes mostraron una respuesta positiva a TLP-castaña 62% y TLP-avellana 85%, observándose a TLP como la segunda familia de alérgenos causantes de alergia a frutos secos. Conclusión: En este trabajo se demuestra que algunos miembros de las familias LTPs y TLPs tienen un papel importante en la alergia alimentaria a frutos secos en la población de estudio. La asociación de los síntomas severos después de la ingestión de frutos secos están con los altos niveles de Cor a 8, Jug r 3, Cas s 8, TLP-castaña y TLP-avellana, datos prometedores para la utilización futura de los mismos en ensayos diagnósticos in vivo de la alergia a frutos secos.*

**Palabras clave:** Allergy, IgE, LTPs, TLPs.

### **Abstract**

*Food allergy caused by the ingestion of tree nuts is mediated by lipid transfer proteins (LTP) and thaumatins (TLPs), described as food allergens. The main objective of this study was to establish the role of LTP and TLP families in the development of allergy to chestnuts, hazelnuts and walnuts. To study the sensitization to allergenic proteins of nuts, we used sera from 13 patients with symptoms after ingestion and positive skin prick test. The sera were provided by the Hospital de Basurto (Bilbao). Immunodetection assays for specific IgE were performed with protein extracts and purified allergens by HPLC. The purity of the proteins was characterized by N-terminal amino acid sequencing and molecular size analysis by MALDI and ELISA assays. Results: This study identified and characterized potential allergens of the LTP and TLP families in nuts. Most patients were sensitized to LTPs, showing a positive response to Cor a 8 and Jug r 3, both major allergens in patients with symptoms of allergy to nuts. The patients showed a high positive response to 62% TLP-chestnut and 85% hazelnut TLP, making TLP the second most important allergen family in allergy to nuts. Conclusion: The LTP and TLP families were identified as the main and secondary groups of allergens in nuts, respectively, having an important role in food allergy in the population studied. Severe symptoms after ingestion of nuts are associated with high levels of IgE to Cor a 8, Jug r 3, Cas s 8, TLP-chestnut and TLP-hazelnut, promising data for their future use in vivo diagnostic assays for allergy to nuts.*

**Keywords:** Allergy, IgE, LTPs, TLPs.

## 1. Introducción

Las alergias son enfermedades que hoy en día afectan a más del 30% de la población en los países desarrollados. Están provocadas por inhalación, ingestión o por contacto con alérgenos, antígenos capaces de inducir, en determinadas circunstancias, la síntesis de Inmuglobulinas E (IgE) que median una reacción alérgica (Ishizaka , Ishizaka , & Hornbrook , 1966).

En el caso de las alergias alimentarias, la incidencia actual se estima que se encuentra alrededor de un 3% en la población adulta y entre un 6-8% en la pediátrica (Burks & Ballmer-Weber, 2006). Los alérgenos alimentarios o de alimentos son mayoritariamente proteínas solubles con un peso molecular que oscila entre los 10-70 kDa (Taylor SL, 1987). La alergia a los frutos secos es una de las alergias alimentarias más frecuentes, aunque su prevalencia varía en función de la edad y la zona geográfica. Se presentan con más frecuencia en niños que en adultos (Ewan, 1996).

Hasta el momento sólo se han identificado y caracterizado un grupo limitado de alérgenos presentes en anacardo, avellana, cacahuete, castaña, nuez y la nuez de Brasil (tabla 1). La mayor parte de información sobre estos alérgenos procede de estudio de proteínas recombinantes. La caracterización de esos alérgenos y otros, obtenidos mediante técnicas de purificación proteica ha permitido determinar que la mayoría de los alérgenos son proteínas de reserva de las semillas, como vicilinas (globulinas 7S compuestas de subunidades de alrededor de 50 kDa), leguminas (11-13S globulinas con subunidades compuestas de péptidos ácidos de 30-40 kDa y básicos de 15-20 kDa) y albúminas 2S (15 kDa).

**Tabla 1.**  
*Alérgenos de frutos secos*

Fruto	Alérgeno	Función/tipo	Peso molecular (kDa)
Anacardo	Ana o 1	Vicilina (7S)	59
	Ana o 2	Legumina (11S)	
Avellana	Cor a 1	PR-10 (Homólogo: Bet v 1)	17
	Cor a 2	Profilina	14
	Cor a 8	PR-14 (LPT)	9
	Cor a 9	Globulina (11S)	40
	Cor a 11	Vicilina (7S)	48
Cacahuete	Ara h 1	Vicilina	63,5
	Ara h 2	Conglutina	17
	Ara h 3	Glicinina	60
	Ara h 4	Glicinina	37
	Ara h 5	Profilina	15
	Ara h 6	Homólogo: conglutina	15
	Ara h 7	Homólogo: conglutina	17
	Ara h 8	PR-10	17
Castaña	Cas s 5	Quitinasalb	
	Cas s 8	PR-14 (LTP)	9,7
Nuez de Brasil	Ver e 1	Albúmina (2S)	9

Es frecuente constatar la existencia de anticuerpos IgE específicos frente a varios frutos secos (sensibilización o reactividad inmunológica); por ejemplo, de 142 pacientes alérgicos al cacahuete, el 50% presentaba pruebas cutáneas a la almendra, el 40% al anacardo, el 30% al pistacho, el 26 % a la nuez de Brasil y el 21% a la avellana (Moneret-Vautin, Rance, & Kanny, 1998).

La posible homología existente entre alérgenos como albúminas 2S, vicilinas, leguminas, profilinas o LTP, podría teóricamente justificar una amplia reactividad cruzada inmunológica. Sin embargo, es necesario considerar que un cambio en un solo aminoácido puede modificar la capacidad de fijar anticuerpos IgE o la avidéz de la unión, por lo que algunas proteínas altamente homólogas carecen de reactividad cruzada inmunológica.

La familia de proteínas denominada LTPs (non-specificlipid transfer proteins), han sido identificadas como importantes alérgenos vegetales, debe su nombre a su capacidad de unir lípidos in vitro y transferirlos entre distintos sistemas de membranas (Kader, 1996).

Están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, con alrededor de 100 miembros potenciales en más de 50 especies diferentes. Se han identificado un gran número de alérgenos de esta familia en alimentos vegetales sobre todo en frutos de rosáceas, así como en otras frutas, verduras, frutos secos y cereales, y en látex, siendo el alérgeno del melocotón (*Prunuspersica*), Pru p 3, el miembro modelo de la familia para el estudio en alergia.

Por otra parte, se ha descrito la presencia de LTPs alérgicas en algunos pólenes, lo que sugiere que las LTPs pueden tener un papel adicional como aeroalergenos (Salcedo, Sánchez-Monge, Díaz-Perales, García-Casado, & Barber, 2007). Las LTPs encontradas en el polen de *Artemisavulgaris* (Art v 3) y *Platanusacerifolia* (Pla a 3) (Kader, 1996), tienen una identidad de secuencia de 40% con Pru p 3, por lo que pueden ser responsables de la sensibilización cruzada entre polen y alimentos vegetales (Palancín, Tordesillas, Gamboa, Sánchez-Monge, & Cuesta-Herranz, 2010). La importancia de las LTPs como alérgenos puede deberse, en gran medida, a su resistencia a tratamientos térmicos y a la degradación por enzimas digestivos (Asero, y otros, 2000). Como consecuencia de esta integridad, las LTPs están asociadas con síntomas sistémicos y severos (Fernández-Rivas, y otros, 2003).

Son un grupo de proteínas de unos 9 kDa (92-94 residuos), con identidades de secuencia de aminoácidos que varían entre el 25-95%. A pesar de la gran heterogeneidad en la conservación de su estructura primaria, todas ellas poseen 8 residuos de cisteína conservados, que forman 4 puentes disulfuro, responsables de su elevada estabilidad (Kader, 1996). De igual modo, la estructura tridimensional de los miembros de esta familia está muy conservada, formando un dominio compacto constituido por 4  $\alpha$ -hélices separadas por giros cortos, y una cola C-terminal no estructurada (Douliez, Michon, Elmorjani, & Marion, 2000).

Sin embargo, y siendo compatible con algunas de estas posibles funciones, la evidencia más sólida apunta a una implicación de las LTPs en los mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (García-Casado, y otros, 2003). Esto ha llevado a clasificarlas como proteínas PR, incluyéndolas en la familia PR-14 (Van Loon & Van Strien, 1999).

La familia de proteínas denominada TLPs (Taumatin-like proteins), es otro grupo identificadas como importantes alérgenos vegetales, durante décadas las TLPs se han estudiado ampliamente en las plantas por sus propiedades antifúngicas. Los estudios moleculares de la expresión TLP, la localización y la actividad apoyan el papel de la TLP en la defensa del huésped durante la infección por patógenos tales como bacterias, hongos y oomicetos.

Varios modos de acción antifúngica se han descrito como permeabilización de la membrana, inhibición de enzimas tales como xilasas,  $\alpha$ -amilasas o tripsina, así como un mecanismo de inducción da apoptosis, otras propiedades funcionales has sido reportadas, incluyendo actividad anticongelante, protección frente a estrés abiótico y la unión a proteínas como la actina, glicoproteínas, y proteínas-G, o hormonas tales como las citoquinas.

Las TLPs más típicas descritas hasta la fecha tienen un peso molecular que varía de 20 a 30 kDa con capacidad de ligar IgE específica y generalmente poseen 16 residuos conservados de cisteína que forman ocho enlaces disulfuro. Recientemente se han identificado TLPs que se caracterizan por un peso molecular alrededor de 17 kDa y solo 10 residuos conservados de cisteína que forman cinco puentes de disulfuro (Breiteneder , Thaumatin-like proteins, a new family of pollen and fruit allergens, 2004).

Pertenecen al grupo de proteínas de defensa (PR-5) implicadas en alergias (Van Loon & Van Strien, 1999). Se han descritos como alérgenos de manzana (Mal d 2), Kiwi (Act c 2) (Menu-Bouaouiche, Vriet, Peumans , Barre, & Van Damme, 2003) y cereza (Pruav 2) (Fuchs, Bohle, Dall'Antonia, Radauer, & Hoffmann-Sommergruber, 2006), con porcentajes de IgE específica del 90% al 30% en sueros de diferentes pacientes alérgicos a estos frutos. El objetivo principal de este estudio fue establecer el papel de LTPs y TLPs en el desarrollo de la alergia a castaña, avellana y nuez. 2

## **2. Material y Métodos**

### **2.1 Sueros de Pacientes**

Los sueros de los 13 pacientes con alergia a frutos secos, fueron aportados por el Hospital de Basurto-(Bilbao). Todos los pacientes tuvieron una historia clínica de reacciones alérgicas después de la ingestión de frutos secos (urticaria/angiodema o síntomas anafilácticos); y mostraron positivos a pruebas de punción cutáneas a frutos secos frescos. Los datos clínicos están resumidas en la tabla 2. Los informes escritos de consentimiento fueron obtenidos de todos los pacientes y la aprobación del estudio por el comité de ética (Hospital de Basurto, Bilbao, España). Los pool de sueros de los pacientes fueron usados para Ensayos de Inmunodetecciones (IgE), y los sueros individuales fueron utilizados en la determinación de IgE específica por ensayos de ELISA.

**Tabla 2**

*Sueros de pacientes alérgicos a frutos secos, seleccionados según sus síntomas: SAO (Síndrome de Alergia Oral) y SIS (pacientes con reacción sistémica) Bilbao-España. 2012.*

PACIENTES	HISTORIA CLINICA		SÍNTOMAS	
	Alimentos	Pólenes	SAO	SIS
1	+	+	+	-
2	+	+	-	Urticaria contacto
3	+	+	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	-	Anafilaxia
6	+	+	-	Urticaria, Angiodema
7	+	+	-	Urticaria, Angiodema
8	+	-	-	Anafilaxia
9	+	+	-	Anafilaxia
10	+	+	-	Anafilaxia, Urticaria, Angiodema
11	+	-	-	Urticaria, Angiodema
12	+	+	-	Urticaria, Angiodema
13	+	+	-	Angiodema, Prurito

### **2.2 Obtención de extractos crudos de proteínas solubles (PBS)**

Castaña (*Castanea sativa*), avellana (*Corylus avellana*) y nuez (*Juglans regia*), se pelaron y cortaron en pequeñas piezas, se deslipidó con acetona fría [2x 1:5 (w/v) por 1 hora a 4 °C en agitación]. Después se secó al ambiente y se extrajo con tampón PBS [fosfato sódico 0.1 M fosfato sodico; pH 7; y 0.15 M NaCl; 1x1:5 (w/v), 1h a 4 °C en agitación], se centrifugó (14000 rpm x 30 min., 4 °C), el sobrenadante se dializó frente a agua destilada durante 48 h a 4 °C con membrana de 3500 Da de diámetro de poro y liofilizadas. Los extractos brutos de proteínas se cuantificaron según el modelo de Bradford (Bradford, 1976).

### **2.3 Aislamiento y caracterización de alérgenos**

Los extractos de los frutos secos fueron fraccionados por cromatografía de intercambio-catiónico, se utilizaron cartuchos de intercambio catiónico Sep-PakAccell Plus CM de 500mg (Waters, Mildford, MA, Estados Unidos). Se pasaron los extractos PBS por columna, resuspendidas en tampón ácido fórmico 20mM, pH 4. La muestra se eluyó con el mismo tampón conteniendo NaCl 0,75M, con un flujo de 1 ml/min.

Las fracciones fueron dializadas frente a agua destilada durante 48 h a 4 °C con membrana de 3500 Da de diámetro de poro. Las fracciones retenidas que contenían los diferentes alérgenos de frutos secos fueron identificados por fraccionamiento en SDS-PAGE e inmunodetectadas con pool de sueros de pacientes sensibilizados a frutos secos o usando anticuerpos policlonales frente a Pru p 3 (anti-LTP), frente a Pru p 2.0201 (anti-LTP), frente a Cas s 5, Chitinasa clase I, considerado con el mayor alérgeno en castaña (anti-Chitinasa), y frente a Bet v 1 perteneciente a PR10 mayor alérgeno de polen abedul (anti-Bet v 1).

Se separó por medio de HPLC en fase reversa, las fracciones enriquecidas en proteínas básicas, haciendo gradiente de acetonitrilo en 0.1 % de ácido trifluoroacético, nucleosil 300 C4 (250 x 8 mm, 5 µm; ScharlauScience, Barcelona, España) de 0-10% por 15 minutos y 10%-100% en 150 min, λ= 280 nm, flujo 1 mL/min).

Las proteínas putativas de Transferencia de Lípidos (LTPs) y Thaumatin-Like(LTPs), fueron inmunodetectadas con anticuerpos anti-LTP y anti-TLP. Los alérgenos aislados fueron cuantificados usando el test comercial del ácido bicinonínico (BCA; Pierce, Cheshire, UK) (Smith, 1985). El SDS-PAGE se realizó en el sistema de minigeles de Bio-Rad (Bio-Rad Miniprotean IIIsystem) durante 1h a 20 mA/gel, utilizando como tampón de electroforesis Tris 0,25M, glicina 1,29M, SDS 1% (p/v), pH 8,3 (Laemmli, 1970).

La tinción de proteínas se realizó con CoomasieeBrillant Blue R-250 (CoomasieR-250 0,25% en Metanol: Acético (50:9) (v/v)).

La secuencia amino N-terminal se realizó en un secuenciador de fase-gaseosa AppliedBiosystems477A (Foster City, Calif) y Matriz asistida por láser de desorción ionización tiempo de vuelo espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) espectrometro Bi-flex III (Bruker-FranzaenAnalytik, Bremen, Germany), acorde al método estándar (Gültekin & Heermann, 1988).

#### **2.4 Ensayos de Inmuno detecciones**

Las muestras (10 µg de extracto crudo de proteína de frutos secos y 5 µg de alérgenos purificados) fueron fraccionados por SDS-PAGE y fueron transferidas a membranas de PVDF (polivinyldifluoride, tamaño de poro 0,45 µm, Inmobilon, MilliporeCorporation) (Cuesta-Herranz, Barber, Blanco, Cistero-Bahima, & Crespo, 2010). Las membranas se activaron previamente en metanol, en agitación seguido por tres lavados de 20 seg., con agua destilada, para finalmente equilibrarlas en tampón de transferencia (Tris 50mM, Bórico



50mM, pH 8,3). La electrotransferencia se llevó a cabo aplicando 70 V durante 1 hora, en frío.

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon 1h a temperatura ambiente y agitación con bloqueante comercial (Sigma, st. Louis, USA) 1X, 1h en agitación. Posteriormente se incubaron con el pool de sueros diluidos en PBS-bloqueante 1/10 (dilución 1/2 v/v) toda la noche a temperatura 4 °C y agitación. Se lavó (4x10 min.) en agitación y solución de lavados 1X. Se incubaron posteriormente con el anticuerpo secundario,  $\alpha$ -IgE-HRP diluido en tampón PBS-bloqueante 1/4 a (dilución 1:3000), 1h a temperatura ambiente y agitación. Para termina se realizaron lavados (4x10 min.), con solución de lavados 1X, y se incubaron con el sustrato HRP de quimioluminiscencia, durante 5 minutos y se revelaron por autorradiografía (hyperfilm-ECL de Amersham), haciendo exposiciones a distintos tiempos.

Adicionalmente las membranas se bloquearon 1h a temperatura ambiente y agitación utilizando como bloqueante leche desnatada al 5%. Posteriormente se incubaron con diferentes anticuerpos monoespecíficos  $\alpha$ -Pru p3 dilución (1:500),  $\alpha$ -TLP castaña (1:10000),  $\alpha$ -quitinasa (1:5000) y con el monoclonal  $\alpha$ -Bet v 1 (1:50), para detectar la presencia de LTPs, TLPs, quitinasas y homologosBet v 1, en PBS-0,05% leche, 1h a temperatura ambiente y agitación. Después de lavar 4 x 10 min., con solución de lavados, las membranas se incubaron con un anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, excepto Bet v 1 que se encubó con un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa-alcalina, todos a una (dilución 1:5000), en PBS-0,5% leche, durante 1h a temperatura ambiente y agitación. Finalmente las membranas se volvieron a lavar 4 x 10 min., con solución de lavado. El revelado se realizó mediante la adición de sustrato para fosfatasa-alcalina, la reacción se detiene con agua.

### **2.5 Determinación de IgE específica por ensayos de ELISA**

Sobre placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar 3590, Corning, NY, USA), se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de la solución con la que se tapizó la fase sólida (1 h, 37 °C). Como fase sólida se emplearon diluciones de 30  $\mu$ g/ml de extractos PBS y 3  $\mu$ g/ml de alérgenos purificados. Posteriormente se añadió bloqueante comercial (Sigma, St. Louis, USA IX), durante 1h a temperatura ambiente.

Tras lavar con tampón PBS, Tween 20 0,05%, se añadían 50 $\mu$ l/pocillo de los sueros diluidos en PBS-bloqueante (4:1 v/v) (a la dilución adecuada en cada caso) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras lavar, se añadieron 50 $\mu$ l/pocillo de anti-IgE humana conjugado con peroxidasa

(Invitrogen) diluidos en tampón PBS-bloqueante (4:1 v/v) dejándolo 1h a temperatura ambiente.

Tras lavar 4 veces, se añadieron 50 µl/pocillo de la solución sustrato (3 ml de agua con 1,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 pastilla OPD, DAKO A/S; 30 min., en oscuridad). La reacción se paró añadiendo 50 µl/pocillo de HCl2N. Por último, se midió la absorbancia de las placas de 490 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado. Como control negativo se utilizó bloqueante comercial en los pocillos (no se fijó proteína). Los Niveles de IgE específica > 0.22 unidades de OD fueron considerados como positivos para extractos [media (OD)+3 SD del control de negativo], y niveles de IgE específica > 0.11 para alérgenos purificados.

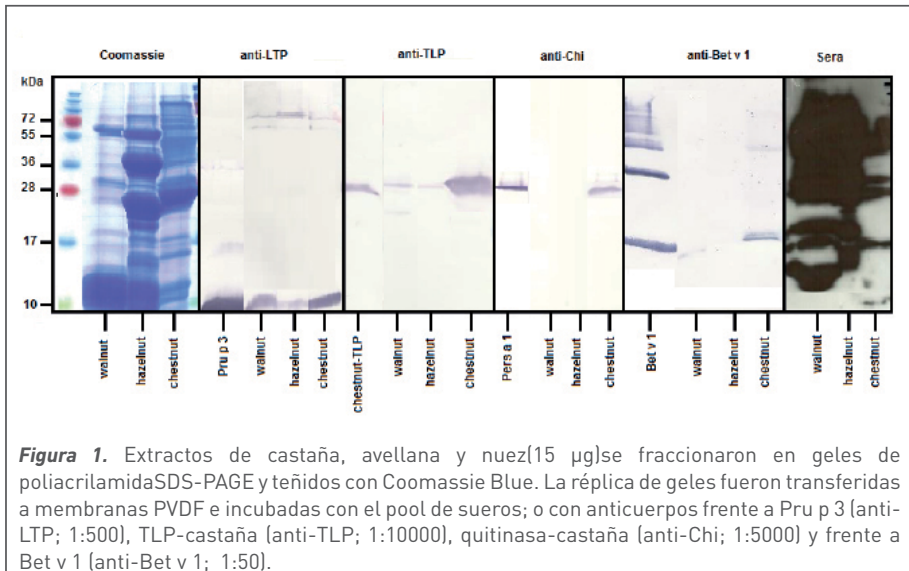
### 3. Resultados

#### 3.1 Características generales

Los 13 sueros de pacientes con alergia a frutos secos fueron incluidos en el estudio, Las características clínicas son resumidas en la Tabla 2. Las manifestaciones clínicas hacia frutos secos reportadas por los pacientes fueron: síndrome de alergia oral (OAS) en 2 casos (15.4%), síntomas sistémicos 10 casos (76.9%). La mayoría de los pacientes mostraron SIS urticaria/ angioedema 6 casos (46%) and anafilaxia sistémica 4 casos (31%).

#### 3.2 Análisis de la presencia de potenciales alérgenos en avellana, castaña y nuez

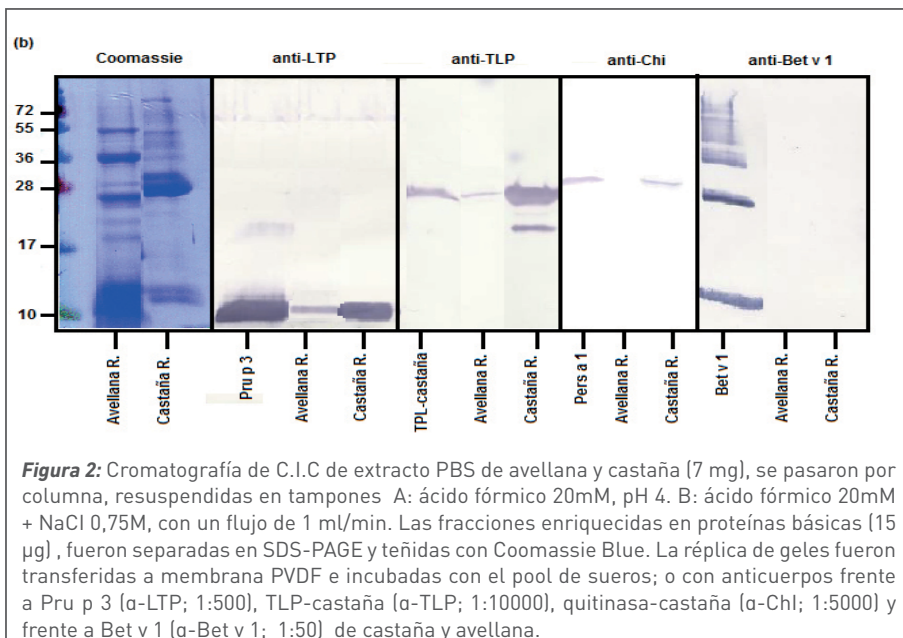
Con el objetivo de analizar la presencia de potenciales alérgenos en avellana, castaña y nuez, se realizaron extractos en tampón PBS (NaCl 0,5M). Estos extractos se fraccionaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, mostrando un patrón complejo de bandas entre 9 y 200 kDa (Fig. 1). Para analizar la presencia de IgE específica frente a los extractos de avellana, castaña y nuez, una réplica del gel anterior se transfirió a membrana PVDF y se realizó una inmunodetección con el pool de los 13 sueros de pacientes alérgicos a frutos secos. Los sueros utilizados reaccionaron con los extractos de avellana, castaña y nuez, reconociendo bandas que aproximadamente de 10 a 95 kDa (Fig. 1). Entre las bandas mayoritarias, se detectaron proteínas con pesos moleculares aparentes de 10, 17 y 24 kDa, que fueron reconocidos por anticuerpos policlonales y monoclonales: anti-Pru p 3, anti-TLP castaña, anti-Bet v 1(Fig. 1).



FUENTE: Elaboración propia.

### 3.3 Purificación y caracterización de los alérgenos de avellana y castaña

El reconocimiento por sueros de los pacientes alérgicos a los extractos (Fig. 1a) sugirió que algunas proteínas de avellana, castaña y nuez podrían ser alérgenos importantes en estas especies, y en función de estos datos, se pasó a intentar purificar las correspondientes proteínas por medio de Cromatografía de Intercambio Catiónico (C.I.C), para obtener fracciones enriquecidas en proteínas básicas por precipitación selectiva a pH 4 de los extractos. Los extractos fueron sometidos a un sistema Cromatográfico de Intercambio Catiónico, separando en proteínas ácidas (NR) y básicas (R) (Fig. 2).



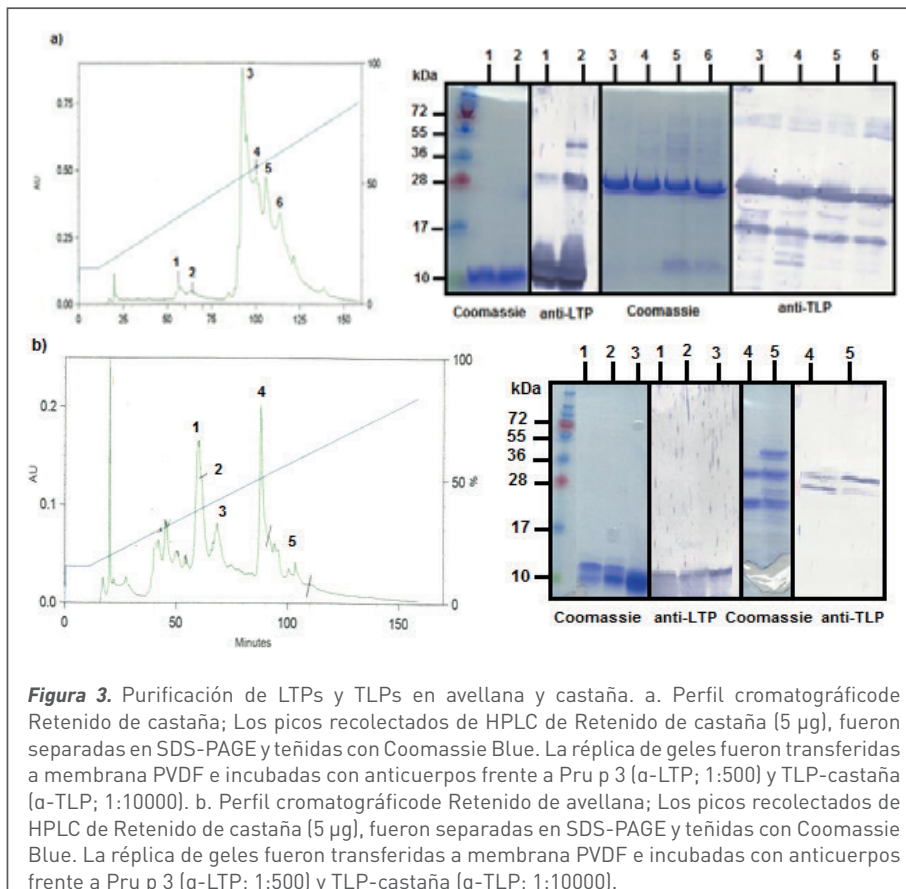
FUENTE: Elaboración propia.

Se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos a las fracciones enriquecidas de la C.I.C. (Fig. 1b), así como el reconocimiento por sueros de los pacientes alérgicos, sugirió que algunas proteínas podrían ser miembros pertenecientes a la familia de las LTPs y TLPs, se procedió a intentar obtener fracciones con las correspondientes proteínas puras, se Cas s 8 y Cor a 8 (LTPs de castaña y avellana respectivamente) y TLP-castaña y TLP-avellana. Para ello se utilizó el método de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

En la Fig. 3a y 3b se muestra el perfil cromatográfico de castaña y avellana respectivamente. Los picos representativos se recolectaron de forma individual, se liofilizaron y se cuantificaron 5 µg de cada uno de ellos se fraccionaron mediante electroforesis y se transfirió a membrana PVDF para ser incubadas con anticuerpos frente a Pru p 3 ( $\alpha$ -LTP; 1:500), TLP-castaña ( $\alpha$ -TLP; 1:10000). Se puede apreciar en el gel bandas con proteínas puras con un peso molecular aproximado de 10 y 28 kDa, pudiendo tratarse de Cas s 8 y TLP-castaña en el caso de castaña y Cor a 8 y TLP-avellana en avellana, fueron sometidos a una segunda re-purificación por cromatografía de HPLC (RP-HPLC) y una tercera purificación con Isopropanol, para intentar la proteína pura. En el caso de castaña, se caracterizó el alérgeno correspondiente lo que permite su identificación como proteína de transferencia de lípidos Cas

s 8, con una masa molecular de 9718,6 d y la secuencia de aminoácidos N-terminal: SITXTQVSKLMPXL.

Debido a que no se consiguió purificar el resto de proteínas, el laboratorio de la Dra. Araceli Díaz-Perales, donó las proteínas Cor a 8, TLP-avellana, TLP-castaña y Jug r 3 para realizar los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA directo) correspondientes.



**Figura 3.** Purificación de LTPs y TLPs en avellana y castaña. a. Perfil cromatográfico de Retenido de castaña; Los picos recolectados de HPLC de Retenido de castaña (5 µg), fueron separadas en SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue. La réplica de geles fueron transferidas a membrana PVDF e incubadas con anticuerpos frente a Pru p 3 (α-LTP; 1:500) y TLP-castaña (α-TLP; 1:10000). b. Perfil cromatográfico de Retenido de avellana; Los picos recolectados de HPLC de Retenido de castaña (5 µg), fueron separadas en SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue. La réplica de geles fueron transferidas a membrana PVDF e incubadas con anticuerpos frente a Pru p 3 (α-LTP; 1:500) y TLP-castaña (α-TLP; 1:10000).

FUENTE: Elaboración propia.

### 3.4 Determinación de la IgE específica frente alérgenos de castaña, avellana y nuez en pacientes alérgicos a frutos secos

Para determinar la IgE específica en pacientes alérgicos a frutos secos se realizaron ensayos de ELISA directo en extractos de avellana, castaña y

nuez, así como proteínas puras, usando 13 sueros de pacientes alérgicos a frutos secos, más un pool de los mismos, como control negativo se utilizó blocking 1X Elisa (50 µl/pocillo), para establecer los valores positivos se consideró la media del control negativo C(-), más tres veces la desviación estándar (SD) se consideró a los sueros como positivos aquellos que estén por encima del punto de corte del control negativo.

En la Fig. 4 lectura de absorbancia a 492 nm., con un filtro de 650 nm., mediante la técnica de ELISA directo; se empleó como fase sólida diluciones de 30 µg/mL de extracto de avellana a una concentración de 0,352 µg/µl, castaña 0,246 µg/µl y nuez 2,463 µg/µl cuantificados por método de Bradford, y para proteínas puras 3 µg/mL Cor a 8 a una concentración de 0,18 µg/µl, TLP-avellana 0,5 µg/µl, Cas s 8 0,538 µg/µl, TLP-castaña 1,1 µg/µl y Jug r 3 a concentración 0,25 µg/µl, cuantificados por método de BCA, se incubaron con 13 sueros de los pacientes alérgicos a frutos secos, más el pool de los mismos.

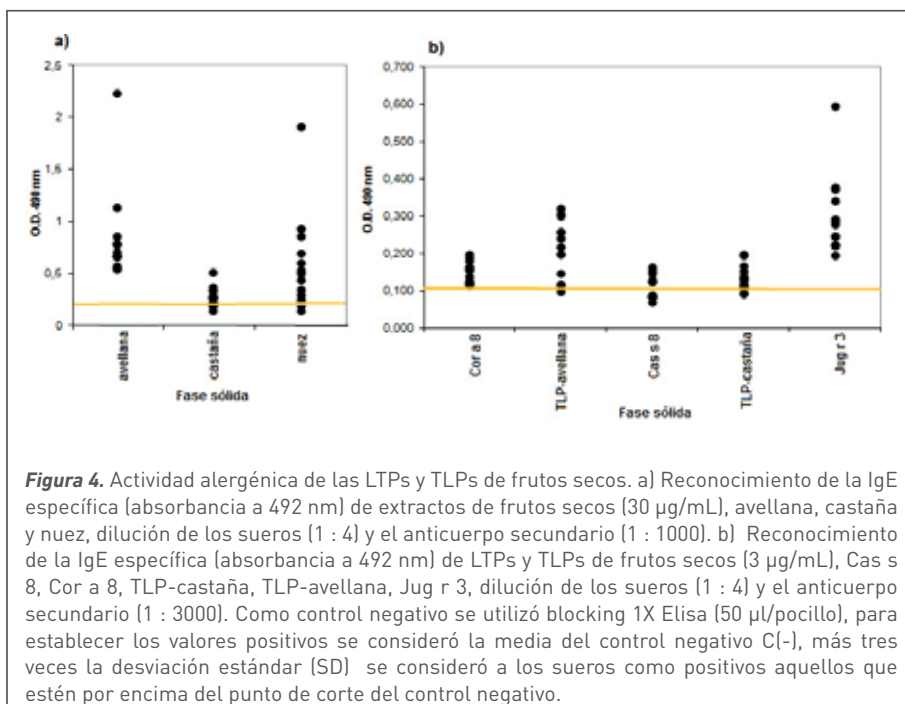
El reconocimiento de la IgE específica en extractos fué de 10 pacientes (77%) avellana, 13 pacientes (100%) castaña y 11 pacientes (85%) nuez (Tabla 3). La mayor parte de los sueros de los pacientes obtuvieron valores de absorbancia mayores al control (-), excepto los valores de absorbancia están por debajo del punto de corte del control negativo, que son los sueros de los pacientes que no reaccionaron con los extractos de frutos secos, considerándolos como pacientes negativos para reacciones alérgicas según sea el caso.

La fig. 4b lectura de absorbancia a 492 nm., utilizando un filtro de 650 nm., obtenidos de la técnica de ELISA directo, se empleó como fase sólida diluciones de 30 µg/mL. El reconocimiento de la IgE específica en el caso de Cor a 8, fue de 13 pacientes (100%), TPL-avellana fue reconocida por 11 pacientes (85%), Cas s 8 por 6 pacientes (46%), TLP-castaña en 8 pacientes (62%) y Jug r 3 reconocida por 13 pacientes (100%) (Tabla 3). La mayor parte de los sueros de los pacientes obtuvieron valores de absorbancia mayores al control (-), excepto los valores de absorbancia están por debajo del punto de corte del control negativo, que son los sueros de los pacientes que no reaccionaron con las proteínas purificadas, considerándolos como pacientes negativos para reacciones alérgicas para Cor a 8, TLP-avellana, Cas s 8, TLP-castaña y Jug r 3 a según sea el caso. Finalmente las LTPs: Cor a 8 y Jug r 3, tuvieron una alta frecuencia de reconocimiento por parte de los pacientes, responsables positivos de los casos de las reacciones alérgicas, considerándolos como los alérgenos mayoritarios en pacientes con alergia a frutos secos.

#### 4. Discusión

En España, la alergia a fruta está claramente asociado con la sensibilización de LTPs especialmente a Pru p 3 (Cuesta-Herranz, Barber, Blanco, Cistero-Bahima, & Crespo, 2010), alérgeno de melocotón. Sin embargo, existe evidencia experimental de la familia de TLPs como alérgenos vegetales (Palancín, Tordesillas, Gamboa, Sánchez-Monge, & Cuesta-Herranz, 2010).

En el presente trabajo, con el objetivo de analizar el papel de las LTPs y TLPs en la alergia alimentaria a frutos secos, se seleccionó a avellana (*Corylus avellana*), castaña (*Castanea sativa*) y nuez (*Juglans regia*), como frutos modelos por su importancia clínica en España.



**Figura 4.** Actividad alérgica de las LTPs y TLPs de frutos secos. a) Reconocimiento de la IgE específica (absorbancia a 492 nm) de extractos de frutos secos (30 µg/mL), avellana, castaña y nuez, dilución de los sueros (1 : 4) y el anticuerpo secundario (1 : 1000). b) Reconocimiento de la IgE específica (absorbancia a 492 nm) de LTPs y TLPs de frutos secos (3 µg/mL), Cas s 8, Cor a 8, TLP-castaña, TLP-avellana, Jug r 3, dilución de los sueros (1 : 4) y el anticuerpo secundario (1 : 3000). Como control negativo se utilizó blocking 1X Elisa (50 µl/pocillo), para establecer los valores positivos se consideró la media del control negativo C(-), más tres veces la desviación estándar (SD) se consideró a los sueros como positivos aquellos que estén por encima del punto de corte del control negativo.

FUENTE: Elaboración propia.

Los sueros de los pacientes alérgicos a estas frutas fueron seleccionadas en base de los síntomas clínicos y a la respuesta a pruebas de punción cutánea, se realizaron inmunodetecciones específicas de IgE, se purificó por HPLC, se caracterizó la secuencia de aminoácidos por N-terminal, análisis de MALDI y ensayos de ELISA. En este estudio se identificó y se caracterizó alérgenos miembros de las familias de LTPs y TLPs en los frutos seleccionados.

**Tabla 3**

*Porcentaje de reconocimiento de IgE específica con sueros de pacientes alérgicos a frutos secos en extractos y proteínas purificadas: Cor a 8, TLP-avellana, Cas s 8, TLP-castaña y Jug r 3.*

	Extractos			Proteínas purificadas				
	avellana	castaña	nuez	Cor a 8	TLP avellana	Cas s 8	TLP castaña	Jug r 3
Nro. pacientes	10	13	11	13	11	6	8	13
% reconocimiento	77	100	85	100	85	46	62	100

El análisis del perfil del reconocimiento de la IgE específica en extractos, mostraron un patrón de reconocimiento de proteínas con pesos moleculares aparentes que van de 10 a 95 kDa, si se contrasta con el perfil de IgG específica con un patrón predominante de reconocimiento de proteínas con pesos moleculares de 10 y 28 kDa que corresponde a proteínas pertenecientes a la familia de alérgenos de las LTPs y TLPs. Demostrado en anteriores trabajos, la implicación de las LTPs en los mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Salcedo, Sánchez-Monge, Díaz-Perales, García-Casado, & Barber, 2007). Además de su importancia en el contexto de la patología vegetal, las LTPs han adquirido una nueva área de interés, en relación a la salud humana, como una familia de panalergenos implicados en reacciones mediadas por IgE, tanto en alimentos como en pólenes (Salcedo, Sánchez-Monge, Díaz-Perales, García-Casado, & Barber, 2004).

Se analizaron los extractos por ensayos de ELISA, los resultados mostraron un reconocimiento por parte de los pacientes con una fuerte respuesta positiva con el 77 % en avellana, el 85 % nuez y el 100 % castaña, el nivel de respuesta positiva demuestra la importancia de la alergia a frutos secos en España.



Las fracciones enriquecidas en proteínas básicas, se purificaron para obtener las diferentes proteínas representativas de las familias de las LTPs y TLPs descritas actualmente: Cor a 8, TLP-avellana, Cas s 8, TLP-castaña y Jugr r 3 (Breiteneder , Thaumatin-like proteins, a new family of pollen and fruit allergens, 2004). La capacidad alérgica de las proteínas purificadas fue confirmada por ensayos de ELISA, Cor a 8 y Jugr r 3 dieron frecuencias de reconocimiento del 100%, TLP-avellana el 85%, TLP-castaña el 62% y Cas s 8 con un número significativamente menor de pacientes con reconocimiento 46% esta baja respuesta de los pacientes con síntomas de alergia a castaña, puede estar relacionada a que los pacientes están sensibilizados principalmente a TLP-castaña, demostrando la importancia actual de las TLPs en el contexto de la alergia a frutos secos en España (Breiteneder & Ebner, Atropic allergens of plant food, 2001).

## 5. Conclusiones

- La mayoría de los pacientes están sensibilizados a LTPs, mostraron una respuesta positiva a Cor a 8 y Jugr r 3 ambos alérgenos vinculados con la máxima sensibilización compartiendo el 100%, con la excepción de Cas s 8 este alérgeno tenía una baja frecuencia de respuestas positivas 46% pero no menos importante. Constituyéndose como los alérgenos mayoritarios en pacientes con síntomas de alergia a frutos secos.

- Los pacientes sensibilizados a TLPs, mostraron una respuesta positiva a TLP-castaña 62% y TLP-avellana 85%, observándose una respuesta alta en nuestra población de pacientes constituyéndola como la segunda familia de alérgenos causantes de alergia a frutos secos.

- En este trabajo se demuestra que algunos miembros de las familias LTPs y TLPs tienen un papel importante en la alergia alimentaria a frutos secos en la población de estudio; datos prometedores para la utilización futura de los mismos en ensayos diagnósticos in vivo de la alergia a frutos secos.

## 6. Referencias

Asero, R., Mistrello , G., Roncarolo , D., Vrie, S. C., Gautier, M. F., Ciurana , C., VAn Ree, R. (2000). Lipid transfer protein: A pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol*, 122: 20-32.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Breiteneder, H. (2004). Thaumatin-like proteins, a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, 59: 479-481.
- Breiteneder, H., & Ebner, C. (2001). Atropic allergens of plant food. *Curr Opin Allergy Clin Immunology*, 1: 251-257.
- Burks W, B.-W. B. (2006). Food allergy. *Mol nutr Food Res* 50: 595-603.
- Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cistero-Bahima, A., & Crespo, J. F. (2010). 7. Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 153: 182-192.
- Douliez, J. P., Michon, T., Elmorjani, K., & Marion, D. (2000). Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and inulines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci*, 32: 1-20.
- Ewan, P. (1996). Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations. *British Medical Journal*, 312: 1074-1078.
- Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Alonso, M. D., Rosado, A., . . . 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.
- Fuchs, H. C., Bohle, B., Dall'Antonia, Y., Radauer, C., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2006). Natural and recombinant molecules of the cherry allergen Pru av 2 show diverse structural and B cell characteristics but similar T cell reactivity. *Clin Exp Allergy* 3, 36: 359-36.
- García-Casado, G., Palacios, L. F., Díaz-Perales, A., Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., . . . Salcedo, G. (2003). Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol*, 112: 599-605.

- Gültekin , H., & Heermann, K. H. (1988). The use of polyvinylidenofluoride membranas as a general blotting matrix. *Anal Biochem*, 172: 320-329.
- Ishizaka K, i. T. (1966). Physicochemical properties of human reagric antibody. *J Immunol*, 97: 840-845.
- Kader, J. C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 4:627-654.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, Peumans , W. J., Barre, A., & Van Damme, E. J. (2003). Molecular basis for the endo-beta 1.3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* 2003, 85: 123-131.
- Moneret-Vautin, D., Rance, F., & Kanny, G. (1998). Food allergy to peanuts in France evaluation of 142 observations. *Clin an Experimen Allergy*, 28: 1113-1119.
- Palancín, A., Tordesillas, I., Gamboa, P., Sánchez-Monge , R., & Cuesta-Herranz, J. (2010). 23. Palancín A, Tordesillas I, Gamboa P, Sánchez-MoCharacterization of peach thaumathin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy*, 40: 1422-1430.
- Salcedo , G., Sánchez-Monge, R., Díaz-Perales, A., García-Casado, G., & Barber, D. (2004). Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy*, 34: 1336-1341.
- Salcedo , G., Sanchéz-Monge, R., Díaz-Perales, A., García-Casado, G., & Barber, D. (2007). 27. Salcedo G, Sánchez-Monge R, Barber D, Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta*, 1771: 781-791.
- Smith, G. P. (1985). 28. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228: 1315-1317.
- Taylor SL, L. R. (1987). Food allergens: structure and immunologic properties. *Food allergens Ann Allergy*, 59: 93-99.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55: 85-97.