



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Sensibilización a las proteínas de transferencia de lípidos: riesgo de anafilaxia y perfil molecular

Presentada por
María Ruano Zaragoza

Director de Tesis:
Francisco Javier Fernández Sánchez
Codirectora de Tesis:
M^a Purificación González Delgado

Alicante, 2022

La tesis se presenta por compendio de publicaciones.

Referencias de los artículos:

- Ruano-Zaragoza M, Somoza ML, Jiménez-Rodríguez TW, Soriano-Gomis V, González-Delgado P, Esteban-Rodríguez A, Palazón-Bru A, Blanca M, Fernández-Sánchez J. Lipid Transfer Protein Sensitization: Risk of Anaphylaxis and Molecular Sensitization Profile in Pru p 3-Sensitized Patients. *Int Arch Allergy Immunol (Impact factor 2019: 2.985; JCR: Q2)*. 2021;182(5):425-432. doi: 10.1159/000511977. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33341818. **Ver Anexo 1.**

- Ruano-Zaragoza M, Casas-Saucedo R, De la Cruz Martínez CA, Araujo-Sanchez G, Gelis S, Gonzalez MF, San Bartolomé C, Pascal M, Jiménez-Rodríguez TW, Gonzalez-Delgado P, Fernandez-Sanchez J, Muñoz-Cano R, Bartra J. Advances in the understanding of the cofactor effect in LTP food allergy: from phenotype description to clinical management. *Allergy (Impact factor 2020: 13.146; JCR: D1; Q1)*. 2022 Mar 24. doi: 10.1111/all.15291. *Epub ahead of print*. PMID: 35322440. **Ver Anexo 2.**



El Dr. Francisco Javier Fernández Sánchez y la Dra. M^a Purificación González Delgado,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado: “SENSIBILIZACIÓN A LAS PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS: RIESGO DE ANAFILAXIA Y PERFIL MOLECULAR” realizado por Dña. María Ruano Zaragoza, ha sido realizado bajo su dirección para optar al grado de Doctora en Medicina.

Lo que firman para los efectos oportunos en

Alicante, 2022

Fdo.: Francisco Javier Fernández Sánchez

Fdo.: M^a Purificación González Delgado



El Prof. Vicente Francisco Gil Guillén, Catedrático de la Universidad y Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

Que el trabajo de investigación titulado: “SENSIBILIZACIÓN A LAS PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS: RIESGO DE ANAFILAXIA Y PERFIL MOLECULAR” realizado por Dña. María Ruano Zaragoza, bajo la dirección del Dr. D. Francisco Javier Fernández Sánchez y la Dra. M^a Purificación González Delgado, sea depositado en el departamento y posteriormente defendido como Tesis Doctoral en esta Universidad ante el tribunal correspondiente.

Lo que firmo para los efectos oportunos en

Alicante, 2022

Fdo.: Prof. Vicente F. Gil Guillén

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Universidad Miguel Hernández de Elche

ÍNDICE

1. Listado de abreviaturas	Pág. 10
2. Listado de figuras y tablas	Pág. 11
3. Resumen / <i>Abstract</i> (en castellano y en inglés)	Pág. 14
4. Introducción	Pág. 22
5. Objetivos	Pág. 35
6. Materiales y métodos	Pág. 37
7. Resultados	Pág. 47
8. Discusión	Pág. 67
9. Conclusiones	Pág. 78
10. Anexo (publicaciones)	Pág. 83
11. Agradecimientos	Pág. 93
12. Referencias	Pág. 96



1. Listado de abreviaturas (por orden alfabético)

AA: alergia alimentaria.

AF: antecedentes familiares.

AINE: antiinflamatorios no esteroideos.

ARADyAL: Red Nacional de Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas.

CCD: determinante de reacción cruzada de los carbohidratos.

EAACI: Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (siglas en inglés).

G1: reacción sistémica de grado 1 (leve) según escala de Brown [6].

G2: reacción sistémica de grado 2 (moderada) según escala de Brown [6].

G3: reacción sistémica de grado 3 (grave) según escala de Brown [6].

GC: Grupo Cofactor.

gl: grados de libertad.

GNC: Grupo No Cofactor.

HCB: Hospital Clínic de Barcelona.

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante.

IC: intervalo de confianza.

IgE: inmunoglobulina E.

IgEe: inmunoglobulina E específica sérica.

IgEt: inmunoglobulina E total sérica.

ISU: *ISAC Standardized Units for specific IgE*.

LTP: proteína de transferencia de lípidos.

ns: estadísticamente no significativo.

NSAID: *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*.

OR: *odds ratio* o razón de probabilidades.

SAO: síndrome de alergia oral.

Th: linfocitos T *helper*.

TPNE: test de provocación nasal específica.

2. Listado de figuras y tablas (por orden de aparición en el texto)

- **Tabla 1.** Extractos comerciales de alérgenos (ALK-Abelló) incluidos en las pruebas intraepidérmicas.
- **Tabla 2.** Porcentaje de resultados positivos en el panel de pruebas intraepidérmicas a alimentos de origen vegetal (n = 421).
- **Tabla 3.** Porcentaje de resultados positivos en el panel de pruebas intraepidérmicas a pólenes (n = 421).
- **Tabla 4.** Prevalencia de sensibilización mediante pruebas intraepidérmicas a otros neumalérgenos habituales en el área y población de estudio (n = 421).
- **Tabla 5.** Prevalencia de sensibilización a las diferentes proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) en la muestra estudiada (n = 421) con el análisis de relaciones recíprocas entre Pru p 3 y las LTP estudiadas.
- **Tabla 6.** Análisis de las relaciones recíprocas entre las LTPs estudiadas.
- **Figura 1.** Prevalencia de cosensibilización a panalérgenos en nuestra serie.
- **Tabla 7.** Alérgenos moleculares no-LTP incluidos en la micromatriz más prevalentes en la muestra de 421 pacientes sensibilizados a Pru p 3.
- **Tabla 8.** Asociación entre variables independientes y anafilaxia.
- **Tabla 9.** Incidencia de anafilaxia según el número de sensibilizaciones a LTP, incluyendo Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Pla a 3, Cor a 8 y/o Art v 3.
- **Figura 2.** Número de sensibilizaciones a LTP en el grupo de pacientes con anafilaxia, incluyendo Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Pla a 3, Cor a 8 y/o Art v 3.
- **Figura 3.** Prevalencia de reactividad a LTPs en la muestra total de pacientes. Recordar que todos los participantes estaban sensibilizados a Pru p 3 (9,3 % monoreactivos).

- **Figura 4.** Prevalencia de anafilaxia inducida por alimentos con contenido en LTP, estratificada según la edad, en nuestro grupo de pacientes sensibilizados a Pru p 3.
- **Tabla 10.** Características clínicas.
- **Figura 5.** Alimentos implicados en las reacciones sistémicas en el Grupo Cofactor y el Grupo No Cofactor.
- **Tabla 11.** Alimentos implicados en las reacciones sistémicas en el Grupo Cofactor y el Grupo No Cofactor y media de reacciones sistémicas por paciente por cada alimento.
- **Tabla 12.** Datos demográficos que comparan pacientes del “Grupo Cofactor Puro” con pacientes del “Grupo Cofactor Mixto”.
- **Figura 6.** Reacciones sistémicas inducidas por cofactor dentro del Grupo Cofactor en pacientes sensibilizados a Pru p 3.





3. RESUMEN

Antecedentes:

La alergia a las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP) representa actualmente una importante causa de reacciones de alergia alimentaria (AA). Se trata de una enfermedad que incluye un fenotipo complejo de pacientes, algunos de ellos pudiendo presentar reacciones muy graves, afectando claramente a su calidad de vida. El diagnóstico molecular o por componentes revela la respuesta de la IgE específica frente a múltiples alérgenos inhalados y alimentarios, lo que mejora la comprensión y el diagnóstico de las enfermedades alérgicas. Pero, a día de hoy, no disponemos de biomarcadores fiables de gravedad para la AA por LTP.

Las reacciones por alergia alimentaria pueden estar inducidas por un cofactor [1-4]. Asimismo, la influencia de los cofactores en las reacciones inducidas por AA ha sido extensamente estudiada en algún tipo de alergia, como es la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente del trigo, la cual aparece cuando está asociada a cofactores como el ejercicio, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o el alcohol [5]. Sin embargo, la relación entre los distintos cofactores y la gravedad de las reacciones clínicas aún no se ha estudiado en profundidad en la alergia a LTP.

Objetivo:

Los objetivos del primer estudio, fueron estudiar el reconocimiento de diferentes proteínas de transferencia de lípidos (LTP) y otras familias de alérgenos en un gran grupo de personas sensibilizadas a Pru p 3 y analizar la relación entre las entidades clínicas y los alérgenos, así como estudiar el grupo de pacientes con fenotipo grave.

El objetivo del segundo estudio se basó en analizar la epidemiología y los rasgos fenotípicos de los pacientes con alergia a LTP inducida por cofactores, y cómo estos podían influir en la gravedad de las reacciones sistémicas inducidas por alimentos en pacientes sensibilizados a LTP.

Métodos:

Ambos estudios incluyeron una gran muestra de pacientes que fueron seleccionados en función de la sensibilización a LTP de melocotón (Pru p 3).

El primer estudio incluyó 421 pacientes sensibilizados a LTP seleccionados de forma consecutiva, de los cuales se recogieron los síntomas respiratorios y de alergia alimentaria, y se realizaron pruebas cutáneas a neumoalérgenos habituales y alimentos vegetales. Se incluyeron pacientes con prueba cutánea positiva a melocotón y anticuerpos IgE específicos a Pru p 3 positivos, a todos los pacientes se les realizó estudio con ImmunoCAP ISAC® (Uppsala, Suecia).

Para el segundo estudio, se seleccionaron consecutivamente 528 sujetos con sensibilización a LTP y se agruparon según la presencia o no de cofactores en las reacciones de alergia alimentaria inducidas por LTP. El Grupo Cofactor incluyó pacientes con alguna reacción inducida por cofactor (ejercicio físico, AINE, alcohol, menstruación, privación de sueño, o la combinación de 2 o más de ellos). El Grupo No Cofactor incluyó pacientes con reacciones en las cuales nunca se había asociado un cofactor. Se analizaron datos demográficos, características de las reacciones y gravedad (escala de Brown [6]), además de la IgE total y específica a Pru p 3.

Resultados:

La primera muestra estuvo formada por 421 pacientes con una edad media de 33,25 años (rango 16-68); El 54,6 % eran mujeres. Las entidades clínicas incluyeron anafilaxia (37,1 %), urticaria (67,9 %) y síndrome de alergia oral (59,1 %). Se diagnosticaron rinitis, rinoconjuntivitis y / o asma en el 71,8 % de los sujetos. La correlación más marcada fue entre Pru p 3 y a la sensibilización a Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9 y Cor a 8. Encontramos una mayor incidencia de anafilaxia en personas con reconocimiento de 5 o más LTP. No se observó asociación entre alergia respiratoria y alergia alimentaria de fenotipo grave.

De los 528 sujetos sensibilizados a Pru p 3 del segundo estudio, se incluyeron 194 (36,7 %) en el Grupo Cofactor y 302 (57 %) en el Grupo No-cofactor. Treinta y dos (6 %) pacientes eran asintomáticos, por lo que no se incluyeron en ninguno de los dos grupos. En el Grupo Cofactor había más mujeres (66,5 % vs 57,6 %; $p = 0,04$), la enfermedad debutaba a una edad más tardía (27 vs 16,1 años; $p = 0,001$) y presentaban una relación IgEe Pru p 3/IgE total mayor (0,08 vs 0,05; $p < 0,001$). Los cofactores más prevalentes fueron el ejercicio físico (41,7 %) y los AINE (37,8 %). Considerando sólo los pacientes con reacciones sistémicas (194 Grupo Cofactor, 197 Grupo No Cofactor), el Grupo Cofactor presentaba un riesgo mayor de reacciones sistémicas graves Grado 2-Grado 3 [6] (OR 1,97; $p < 0,05$).

Conclusión:

La mayoría de los pacientes sensibilizados a Pru p 3 reconocían más alérgenos de la misma familia y, en menor medida, otros alérgenos, principalmente de las familias de

proteínas profilina y PR-10. La anafilaxia ocurrió en más de un tercio de los casos evaluados y casi tres cuartos de ellos presentaban síntomas respiratorios. Las alergias alimentarias de fenotipo grave y alergia respiratoria no parecían estar asociadas.

El cofactor está presente en más del 35% de los pacientes con sensibilización a LTP. El hecho de que los cofactores estén presentes frecuentemente en situaciones de la vida diaria y se comporten como un factor de riesgo para el desarrollo de reacciones sistémicas graves en la alergia a LTP, hace que deban contemplarse específicamente en las recomendaciones dietéticas y condicionen la prescripción de adrenalina autoinyectable.

Palabras clave: Anafilaxia; Diagnóstico por componentes; Proteínas de transferencia de lípidos; Pru p 3; Factores de riesgo; Cofactor.



ABSTRACT

Background:

Allergy to non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) currently represents an important cause of food allergy (FA). It is a disease that includes a complex phenotype of patients, some of whom may present very severe reactions, clearly affecting their quality of life. Component-resolved diagnosis reveals the IgE response to many inhaled, food, and other allergens, improving the understanding and diagnosis of allergic diseases. But, to date, we do not have reliable biomarkers of severity for LTP FA. Food allergy induced reactions can show up stimulated by a cofactor [1-4]. The aforementioned, has been deeply studied in a well-known type of allergy; wheat-dependent exercise induced anaphylaxis, which might only appear when linked to cofactors such as exercise, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) or alcohol [5]. However, the relationship between distinct cofactors and the severity of the reactions hasn't yet been deeply studied in LTP allergy. We consider cofactors could play an important role concerning risk stratification, being able to present a food-induced severe systemic reaction in LTP-sensitized patients. Our aim was to analyze the phenotypic traits of patients with cofactor-induced LTP allergy.

Objective:

The aims of the first study were to study the recognition of different lipid transfer proteins (LTP) and other allergen families in a large group of people sensitized to Pru p 3 and to analyze the relationship between the clinical entities and the allergens.

The objective of the second study was based on analyzing the phenotypic traits of patients with cofactor-induced LTP allergy, and how these could influence the severity of food-induced systemic reactions.

Methods:

Both studies included a large sample of patients sensitized to LTP by peach LTP (Pru p 3).

The first study included 421 consecutive LTP-sensitized patients, from whom respiratory and food allergy symptoms were collected, and skin tests were performed to common pneumoallergens and plant foods. All included subjects had a positive peach peel skin tests and positive Pru p 3 specific IgE antibodies, plus the study with ImmunoCAP ISAC® (Uppsala, Sweden).

For the second study, 528 LTP-sensitized subjects were consecutively selected and grouped according to the presence of cofactor in LTP-induced food allergy reactions. The Cofactor group included patients with some cofactor-induced reaction (physical exercise, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), alcohol, menstruation, sleep deprivation, or the combination of 2 or more of them). The Non-cofactor group included patients with reactions in which a cofactor had never been associated. Demographic data, reaction characteristics and severity (Brown scale [6]), total and specific IgE to Pru p 3 were analyzed.

Results:

The first sample consisted of 421 patients with a mean age of 33.25 years (range 16-68); 54.6 % were women. Clinical entities included anaphylaxis (37.1 %), urticaria (67.9 %), and oral allergy syndrome (59.1 %). Rhinitis, rhinoconjunctivitis, and/or asthma were diagnosed in 71.8 % of the participants. The most pronounced correlation existed between sensitization to Pru p 3 and to Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9 and Cor a 8. We found a higher incidence of anaphylaxis in people with 5 or more recognized LTPs. No association was observed between inhaled and severe food allergy.

Of the 528 patients included in the second study, 194 (36.7 %) were included in Cofactor group and 302 (57 %) in Non-Cofactor group. Thirty-two (6 %) patients were asymptomatic; therefore, not included in any of the groups. In view of Cofactor group, women represented the majority (66.5 % vs 57.6 %; $p=0.04$), with the disease beginning at a later age (27 vs 16.1 years; $p = 0.001$) and presenting a higher Pru p 3 sIgE / total IgE ratio (0.08 vs 0.05; $p < 0.001$). Regarding cofactor-induced systemic reactions, exercise (41.7 %) and NSAIDs (37.8 %) were the two most observed variables. Taking into account patients who suffered systemic reactions (194 in Cofactor group; 197 in Non-Cofactor group), Cofactor group showed a higher risk of presenting a G2-G3 systemic reaction (OR 1.97; $p < 0.05$)

Conclusion:

Most Pru p 3-sensitized participants were sensitized to additional allergens from the same family and, to a lesser extent, to other allergens, mainly in the profilin and PR-10 protein families. Anaphylaxis occurred in more than a third of the cases evaluated, and almost three-quarters of them had respiratory symptoms. Inhaled and severe food allergy

involving LTPs do not seem to be associated. It was noticed that cofactors are present in more than 35 % of LTP-sensitized patients. We conclude that cofactors are frequently involved in everyday life situations, behaving as risk factors for the development of severe systemic reactions in LTP allergic patients. We reflect that all our adult LTP-allergic patients should be warned about the potential risk of cofactors and the subsequent adjustment in their diet when diagnosed. On the other hand, we consider prescription of self-injecting adrenaline should not only be based on the history of presented reactions, but also on the potential severe reactions the patient may experience in the future.

Keywords: *Anaphylaxis; Component-resolved diagnosis; Lipid transfer proteins; Pru p 3; Risk factors; Cofactors.*



4. INTRODUCCIÓN

La alergia alimentaria (AA) es una patología que puede llegar a ser potencialmente mortal. Se define como una reacción inmune con intervención de linfocitos Th₂ específicos en sangre periférica y mucosa intestinal (con expresión de IL-4, IL-5 e IL-13, entre otras, que desempeñan un papel importante en la estimulación de las células B y la producción de inmunoglobulina E (IgE)), mientras que en no alérgicos (o tolerantes innatos) existe un predominio de la respuesta Th₁ [7-8]. Dicha reacción está producida por antígenos de proteínas de alimentos que normalmente son inocuos. En este sentido, las células epiteliales intestinales juegan un papel importante en la inducción de tolerancia a los alimentos. En el caso de las células dendríticas, la tolerancia se logra en una etapa en la que estas células presentan antígeno soluble, pero CD80 y CD86 mínimos, que son necesarios para desencadenar la respuesta alérgica [9-10]. Asimismo, los individuos que pierden la tolerancia a ciertos alimentos se vuelven alérgicos.

La AA se considera actualmente una epidemia, siendo un grave problema de salud pública que afecta tanto a niños como a adultos. La prevalencia de la alergia alimentaria en el mundo desarrollado está aumentando de forma progresiva (hasta un 50 % de crecimiento durante las últimas décadas) [11-13]. Actualmente, de acuerdo con los estudios epidemiológicos realizados, se estima que la alergia alimentaria tiene una prevalencia del 2 % al 5 % de la población general [14-15] representando entre un tercio y la mitad de los casos de anafilaxia [16-17]. Se han identificado algunos factores de riesgo genéticos y ambientales, aunque las razones de dicho aumento no terminan de quedar del todo claras [12-13].

Las manifestaciones clínicas de la alergia a los alimentos engloban una gran diversidad de síntomas, los cuales pueden implicar únicamente reacciones a nivel local, o llegar a

producir reacciones sistémicas que progresen a anafilaxia, pudiendo provocar incluso la muerte por shock anafiláctico. Se define la anafilaxia como una reacción alérgica sistémica grave de instauración rápida y potencialmente mortal [18-19].

Además, se ha observado que las condiciones utilizadas en el procesamiento de ciertos alimentos pueden afectar a su potencial alergénico y el de algunos de sus alérgenos moleculares. Esto está en parte mediado por el procesamiento térmico (calentado, hervido, tostado o frito) que modifica la estructura de la proteína y, por lo tanto, su inmunorreactividad y alergenidad. Uno de los cambios más importantes relacionados con la cocción y aplicación de calor a los alimentos es la *reacción de Maillard* [20-22], que conduce a la formación de productos finales de glicación avanzada estables a través de la reacción de azúcares reductores con grupos amino libres en las proteínas.

La forma de liberación y accesibilidad de los alérgenos de los alimentos en el tracto gastrointestinal también es capaz de afectar a su potencial alergénico. Esto puede, a su vez, ayudar a explicar la observación clínica de que la tolerancia a los alimentos preparados, por ejemplo, en matrices horneadas complejas, parece promover la inducción de tolerancia más eficazmente que en otras matrices [23-24]. Por ello, cabe tener en cuenta que los procedimientos de procesamiento y el tipo de matriz alimentaria pueden afectar también al rendimiento de los métodos analíticos, que buscan cuantificar los alérgenos en los alimentos.

Entre los alimentos más frecuentemente implicados en la AA, en adultos y adolescentes del área Mediterránea, se encuentran los alimentos vegetales; tales como las frutas y los frutos secos, pertenecientes a la familia de las Rosáceas [25-26]. Dichos alimentos incluyen en su estructura proteínas de transferencia de lípidos no específicas (del inglés *non-specific lipid transfer proteins* (nsLTP)), que comúnmente actúan como

sensibilizantes primarios [27-29]. Se las nombró nsLTP por haber demostrado unirse en concentraciones micromolares mediante uno o dos sitios de unión a lípidos como glicerolípidos, ácidos grasos y acil-CoA [30].

Las nsLTP (a partir de ahora, LTP) fueron descubiertas hace unos 40 años. Son una familia de proteínas muy ubicuas, consideradas panalérgenos, por asociarse a sensibilización a múltiples alimentos vegetales y alérgenos inhalados [31-36]. Forman parte de la estructura de muchas especies de plantas y están involucradas en la defensa y protección de las plantas frente a factores estresantes bióticos y abióticos; como pueden ser la sequía o el calor, o frente a hongos y bacterias. En las últimas dos décadas, las reacciones a los alimentos vegetales debidas a la sensibilización a esta proteína han ido en aumento, convirtiéndose en una preocupación cada vez más creciente e importante.

La primera molécula de LTP en la que se descubrió su capacidad de unión a la IgE fue la del melocotón (Pru p 3) y la del polen de parietaria (Par j 2). Posteriormente, se fueron descubriendo otras, como la del albaricoque, la ciruela y la cereza [37]. Por ello, las LTP no sólo se han identificado en alimentos vegetales [31-32, 38-39], sino también en múltiples pólenes (como en la *Ambrosia artemisiifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Platanus acerifolia*, o *Cannabis sativa*, entre otros) [40-43]. Debido a su similitud estructural, existe una gran reactividad cruzada entre ellas, con un alto nivel de variabilidad entre pacientes [31, 40-42, 44].

La concentración de LTP depende de algunos factores, entre ellos de la madurez, o las condiciones de almacenamiento y de cultivo de las frutas. Para la manzana, por ejemplo, la más alta concentración de LTP se encuentra entre las más maduras, y se ha objetivado que los niveles de LTP disminuyen durante el almacenamiento [45]. El nivel de expresión de LTP puede variar mucho según la variedad del alimento. En el caso de la manzana, la

concentración de LTP puede oscilar entre 2 y 17,3 microgramos por gramo de piel y entre 0,5 y 1,8 microgramos por gramo de pulpa [46]. En lo que al melocotón se refiere, según Borges y cols. la cantidad de Pru p 3 es de 8,4 microgramos por gramo de piel y de 3,4 microgramos por gramo de pulpa [46].

Estas proteínas se acumulan, principalmente, en la superficie de las partes aéreas de la planta (hojas, frutos y tallos), particularmente en las Rosáceas, lo que explica la mayor concentración de alérgenos en la piel respecto a la pulpa [47-48]. De hecho, se ha observado a través de microscopía de láser confocal que Pru p 3 se encuentra muy abundantemente en las paredes gruesas de los pelos suaves que cubren la capa de células epidérmicas de la piel del melocotón [46]. En este estudio se mostró que el citoplasma de las células epidérmicas también es rico en esta LTP, en donde la mayor concentración se encuentra en la parte interna de la pared celular. En este sentido, los frutos de hueso que incluyen el melocotón, albaricoque, cerezas, ciruela y frutos secos, entre otros, son, principalmente, los que tienen mayor interés desde el punto de vista alergológico en el área Mediterránea [25-26].

La primera secuenciación completa de Pru p 3, la LTP del melocotón (*Prunus persica*), se llevó a cabo al mismo tiempo en dos países mediterráneos como España e Italia, en el año 1999 [32, 40]. Pru p 3 es la LTP alergénica mejor caracterizada. En aquella época, se identificó una molécula altamente conservada de peso molecular bajo (9 kDa), hidrofóbica, con una estructura estable (parcialmente resistente a la proteólisis gastrointestinal, cambios de pH y procesos térmicos) y una longitud de entre 91-93 aminoácidos. Dichos residuos de aminoácidos están organizados en 4 hélices conectadas por 4 puentes o enlaces disulfuro intramoleculares, que son los responsables de conferirles una alta resistencia a la proteólisis y a las duras condiciones de procesamiento y cocinado de los alimentos, sobreviviendo a la desnaturalización por calor [49-51]. Por

ello, generalmente las LTP son capaces de subsistir a la digestión péptica gástrica y llegar al duodeno sin ser digeridas, o en fragmentos grandes y estables, manteniendo así su estructura tridimensional y conservando sus epítomos secuenciales y conformacionales [52]. De esta manera, siguen permitiendo la interacción con el sistema inmune intestinal con la unión de la IgE a dichos epítomos y, consecuentemente, desencadenando una reacción alérgica tras la exposición y la digestión. Sin embargo, algunos estudios in vitro que han utilizado un modelo de digestión simulada de fase duodenal, han observado que las LTP pueden mostrar un comportamiento variable dependiendo de su secuencia primaria. Por ejemplo, la LTP de la uva y la del melocotón, se digieren lentamente [49, 53], mientras que la de la cebada y la del trigo siguen siendo resistentes a la digestión [53-54].

A pesar de la hipótesis que se gestó en un inicio, la cual aseguraba que su importancia se restringía a las zonas del Sur de Europa y el área Mediterránea [55-57], numerosos estudios posteriormente han ido demostrando la expansión de la relevancia de las LTP en el resto de Europa y otras zonas del mundo, incluidas Europa del norte, China y Japón, entre otras [58-61]. Estas publicaciones reflejan una heterogeneidad sustancial entre las distintas áreas geográficas, por lo que se necesitan más estudios de investigación para poder evaluar y filiar mejor dicha variabilidad, tanto a nivel local como regional.

Sin embargo, dicha patología continúa siendo un reto para la comunidad científica actual, debido a la alta complejidad de manejo de los pacientes afectados. Esta dificultad se complica con el descubrimiento progresivo de nuevas LTPs en diferentes alimentos y sus mecanismos de sensibilización, así como la gran variabilidad entre pacientes. Esta heterogeneidad entre pacientes, se puede observar tanto en su perfil de sensibilización,

como en la gravedad de los síntomas que presentan. Por un lado, existen pacientes alérgicos a una LTP de una única fuente alergénica (frecuentemente Pru p 3), otros sensibilizados a diferentes LTP sólo de rosáceas y otros, a múltiples LTP de fuentes alergénicas que no están relacionadas taxonómicamente y no siguen un patrón definido [32, 34, 38, 40, 62]. Estos dos últimos grupos, que son los más frecuentes, se incluyen bajo la denominación de “síndrome LTP” [31, 62]. Con todo lo anteriormente descrito, hoy en día, el llamado “síndrome LTP”, dispone de evidencia científica suficiente para ser reconocido como entidad clínica a nivel internacional.

Es relevante enfatizar que estas reacciones alimentarias pueden llegar a ser graves como la anafilaxia o incluso el shock anafiláctico [28-29, 35, 39, 63-67], pero incluso en sus formas clínicas leves y moderadas, dichas reacciones tienen un alto impacto en la calidad de vida de los pacientes, debido fundamentalmente al gran número de vegetales implicados, que en muchos de los casos obliga a dietas alimentarias muy restrictivas [67]. En este sentido, hay que tener en cuenta que la alergia a alimentos vegetales por sensibilización a LTP se asocia frecuentemente a polisensibilización, como consecuencia de la gran reactividad cruzada que presenta. Este hecho conduce a su vez a problemas de sobrediagnóstico y manejo, ya que los pacientes evitan ingerir múltiples alimentos de origen vegetal, lo que provoca una disminución aún mayor en su calidad de vida.

Además de todo ello, la alergia a la LTP se asocia a reacciones graves que pueden poner en riesgo la vida del paciente, tanto en su vida diaria como durante su diagnóstico, por la necesidad de realizar pruebas de provocación con múltiples alimentos.

Aspectos importantes todavía sin resolver de la alergia a la LTP

La alergia a LTP tiene algunas particularidades que afectan a su diagnóstico y complican el manejo de los pacientes, como son: una expresión clínica extremadamente variable: desde sensibilización asintomática a anafilaxia grave, sin disponer a día de hoy de marcadores fiables predictores de gravedad clínica; y el hecho de haberse asociado la presencia de alergias a pólenes, como profilinas, con una disminución de la gravedad de los síntomas [68].

Además, existen aspectos relevantes que a día de hoy no están del todo resueltos, como: (1) la relación entre las LTP de pólenes y alimentos vegetales; (2) la influencia de la vía de sensibilización; (3) la relación entre los diferentes patrones de sensibilización a una o varias LTP con la gravedad de los síntomas; (4) el valor diagnóstico relativo de los niveles de IgE específica (IgEe) frente a las diferentes LTP; y (5) la epidemiología y relevancia de los cofactores en este modelo de alergia alimentaria.

Se denominan cofactores aquellas sustancias o actividades que, al unirse con la fuente alérgica, son capaces de desencadenar una reacción de alergia alimentaria. Se han descrito diversos cofactores, como el ejercicio físico, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), el alcohol, estrés, el periodo menstrual o la privación de sueño [69]. Se trata de pacientes que habitualmente pueden tolerar los alimentos si los consumen sin la presencia de cofactor, pero reaccionan cuando coexisten ambos factores [4]. La presencia de cofactores puede agravar las reacciones de alergia alimentaria y/o disminuir el umbral de cantidad de alérgeno necesaria para inducir la reacción [3]. La prevalencia de alergia alimentaria inducida por cofactor ha ido en aumento en lo que llevamos de siglo XXI. El primer modelo descrito fue la anafilaxia por trigo dependiente de ejercicio, en la mayoría de casos con la proteína omega-5-gliadina como principal alérgeno causante [70-71].

Dado que la mayoría de los estudios de AA por LTP inicialmente provenían de países del área mediterránea como España, Italia, Portugal o Grecia [57, 64, 72-73], se ha planteado la hipótesis de que algunos factores ambientales locales, como la dieta y la exposición a determinados pólenes, podían influir en la vía de sensibilización, sugiriéndose dos posibilidades [41, 73]: (1) sensibilización a través de la vía oral, mediante la ingesta de los alimentos (la más aceptada en la mayoría de casos), donde Pru p 3 se ha considerado tradicionalmente como el principal y más frecuente responsable [25-26, 62] y (2) sensibilización vía respiratoria por pólenes, donde Pla a 3 y Art v 3, que comparten un 46-51 % de homología con Pru p 3 [74], se han considerado los principalmente implicados [35, 75, 42, 44, 76-77]. Además, se están descubriendo nuevos alérgenos inhalantes que podrían ser relevantes en la sensibilización a LTP. De hecho, recientemente, un grupo español ha publicado la relevancia de un nuevo alérgeno descubierto en el polen de melocotonero (Pru p 9), en un grupo de pacientes sensibilizados al mismo [78], capaz de inducir síntomas respiratorios mediante test de provocación nasal específica (TPNE) [79]. En este último estudio, de los 39 pacientes sensibilizados a Pru p 3 demostrado por la presencia de IgE específica, 22 (el 56,4 %) se encontraban asintomáticos y toleraban el melocotón. Además, la mayoría de estos pacientes tolerantes (el 91 %) curiosamente presentaban cosensibilización a extracto de polen de melocotonero, y el 41 % a Pru p 9 (ambas sensibilizaciones objetivadas mediante prueba intraepidérmica), con una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo de pacientes que presentaban síntomas con melocotón (65 % cosensibilizados a polen de melocotonero y 6 % a Pru p 9).

El tema de la relación de la alergia a LTP con los alérgenos inhalantes ha generado controversia en las comunidades científicas, ya que mientras algunos autores han puesto de manifiesto que la reactividad a Art v 3 en pacientes alérgicos a melocotón es un

hallazgo *in vitro* sin implicaciones clínicas [31, 73], otros han demostrado mediante TPNE que Art v 3 puede inducir síntomas respiratorios como rinitis en pacientes con aparente sensibilización primaria a Pru p 3 [42]. En estos casos, la sensibilización primaria podría ocurrir a través de la vía respiratoria.

Como sucede con otras familias de panalérgenos, en la sensibilización a LTP no siempre un mayor o menor grado de homología de aminoácidos conlleva una traducción clínica equiparable a la misma. Esto se observa por ejemplo con la sensibilización a la LTP del olivo. A pesar de que esta LTP (Ole e 7) presenta un grado de homología estructural con Pru p 3 de menos del 30 % [31, 44, 76], se ha visto involucrada en hasta un 80 % de los pacientes alérgicos a vegetales por sensibilización a LTP, principalmente melocotón y cacahuete [12], aunque esta relación no ha sido observada en otros estudios [34, 44, 73, 76].

Estudios realizados en diferentes áreas geográficas han demostrado diferencias en los patrones de sensibilización a las LTP de pólenes de olivo, plátano de sombra y artemisa (Ole e 7, Pla a 3 y Art v 3, respectivamente) [76-77]. Así, mientras que Pla a 3 es reconocido por un porcentaje similar de pacientes en Málaga y Barcelona, otros como Ole e 7 y Art v 3 muestran un patrón diferencial de reconocimiento, siendo Ole e 7 relevante en Málaga, hasta en un 24 % de pacientes con rinitis [76] y Art v 3 en Barcelona, hasta en un 50 % de pacientes con alergia a vegetales por LTP [77, 80].

Las diferencias encontradas en los estudios sobre la posible relación de la sensibilización a LTP de pólenes y su influencia con la alergia a vegetales, hace plantear la necesidad de una evaluación en detalle del perfil de sensibilización a pólenes en pacientes con alergia a LTP en las diferentes zonas geográficas.

En la actualidad, se desconocen los factores que influyen en la gravedad de la reacción en los pacientes con alergia a LTP. De hecho, no se puede predecir cuál será la ingesta mínima capaz de inducir una reacción alérgica, ni la respuesta a otros alimentos vegetales, además del melocotón, en estos pacientes [29, 39, 44, 81-82].

Hasta ahora, algunos de los aspectos que se han estudiado han sido la cosensibilización a pólenes y la polisensibilización a múltiples alimentos de origen vegetal. En lo que respecta al papel de la cosensibilización a pólenes, se ha objetivado en algunos estudios que las proteínas de los pólenes de la familia PR-10 y/o profilinas, ejercen un efecto protector en la gravedad de las reacciones alimentarias por alergia a LTP [31, 39, 73]. Por el contrario, en otras poblaciones no se ha objetivado dicha asociación [83]. Por otro lado, en lo que a la polisensibilización se refiere, otros autores han demostrado que la sensibilización a múltiples LTP se asocia con reacciones graves [31].

Otro factor que se ha analizado en relación a una posible asociación con la gravedad de los síntomas han sido los niveles de IgE específica frente a LTP, no habiéndose podido, por el momento, demostrar una relación clara [31, 62, 84-85].

El diagnóstico por componentes mide la IgE específica frente a moléculas de fuentes alergénicas individuales (purificadas nativas o recombinantes), lo que permite la identificación del perfil de reconocimiento del paciente y sus posibles reactividades cruzadas. El *microarray* ImmunoCAP ISAC® (Uppsala, Suecia) implica un formato *multiplex*, midiendo múltiples alérgenos a la vez [86]. Esta característica lo convierte en una herramienta de alta capacidad para diagnosticar reactividades a diferentes alérgenos, como pólenes (gramíneas, ciprés, olivo, platanero y parietaria) [80, 87] y alérgenos alimentarios, incluidos melocotón y frutos secos [85, 88].

Los cofactores podrían explicar el por qué, en algunos casos, la ingesta de alimentos en personas con alergia alimentaria desencadena una anafilaxia mientras que en otras provoca una reacción más leve o incluso tolerancia, definiendo un fenotipo específico de alergia alimentaria [1-4]. La AA inducida por cofactor se ha estudiado a fondo en un modelo de alergia al trigo, la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente del trigo. Esta entidad sólo aparece cuando se vincula a cofactores como el ejercicio o los AINE, al disminuir el umbral y aumentar la gravedad de la reacción alérgica [5]. La alergia alimentaria por LTP incluye un manejo y fenotipo complejo de pacientes, con hasta un 30% de los mismos que reportan reacciones con presencia de cofactor [62], aunque su perfil clínico aún no se ha estudiado por completo.

Del análisis de todos estos estudios surge la necesidad de identificar cuáles son las variables que nos pueden ayudar a caracterizar los pacientes sensibilizados a LTP, especialmente aquellos con un fenotipo grave, analizando el papel de la monosensibilización frente a la polisensibilización a LTP de pólenes y alimentos vegetales y el de la IgE específica, mediante el uso de herramientas *in vitro* adecuadas, así como de la epidemiología, descripción fenotípica y manejo clínico del *efecto cofactor* en estos pacientes.

En este Proyecto, se ha analizado el perfil molecular de sensibilización y las entidades clínicas en un gran grupo de pacientes sensibilizados a Pru p 3, que fueron referidos al Servicio de Alergología del Hospital General Universitario de Alicante, así como también la epidemiología y descripción fenotípica en una gran cohorte de pacientes sensibilizados a Pru p 3 que fueron referidos al Servicio de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona. El propósito principal consistió en intentar establecer una relación entre la sensibilización

a LTP y anafilaxia, con el fin de poder identificar mejor a los pacientes con alergia a LTP de fenotipo grave, así como también investigar y analizar los rasgos fenotípicos de los pacientes con alergia alimentaria a LTP inducida por cofactor.

El conocimiento adquirido a partir de una mayor comprensión de este tema ayudará a orientar los enfoques de gestión de riesgo de la alergia a esta proteína basados en la evidencia, en la práctica clínica habitual. Por ello, la finalidad de este estudio despliega gran relevancia desde el punto de vista clínico y traslacional, puesto que aborda la falta actual que tenemos los especialistas en Alergología de disponer de biomarcadores fiables en nuestra consulta (tanto clínicos como biológicos), para manejar esta patología tan prevalente en nuestro día a día laboral. De tal manera, los resultados obtenidos podrán tener traslación a nuestra práctica clínica habitual, junto a una mejora del manejo y consecuentemente en la calidad de vida de nuestros pacientes con alergia a LTP.

Otro punto importante ya mencionado con anterioridad, es la gran heterogeneidad de esta patología en las distintas poblaciones y áreas geográficas estudiadas hasta la fecha, incluso dentro de nuestro país, motivo por el cual resulta de gran importancia plantear proyectos de estudio y análisis de esta patología en otras poblaciones geográficas diferentes a las ya publicadas en la literatura hasta el día de hoy.

Por otro lado, sabemos que la alergia alimentaria (incluida la AA por LTP) es actualmente una patología huérfana de tratamientos eficaces y seguros, lo que enfatiza la importancia de un mayor entendimiento y mejor manejo de los pacientes con AA de fenotipo grave, con el fin de poder mejorar la calidad de vida actual de nuestros pacientes con este tipo de patología.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos principales

1. Identificar **biomarcadores** de utilidad diagnóstica en pacientes con alergia a LTP de fenotipo grave que puedan aplicarse en la práctica clínica habitual para mejorar la precisión del diagnóstico y el manejo de estos pacientes, construyendo un patrón que permita predecir la gravedad de la reacción y el riesgo de aparición de la misma.
2. Analizar la epidemiología, descripción fenotípica y manejo clínico del *efecto cofactor* en los pacientes con alergia alimentaria por LTP.

5.2. Objetivos secundarios

3. Conocer las **características clínicas** de los pacientes con alergia a LTP.
4. Conocer los alérgenos implicados y analizar el **perfil de sensibilización molecular** en los pacientes con sensibilización a LTP.
5. Describir el papel de la **cosensibilización** a otros panalérgenos en los pacientes sensibilizados a LTP.
6. Estudiar la relación que existe entre los alérgenos de la familia de las LTP de los alimentos con las familias de **LTP de fuentes inhaladas**.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

Primer estudio realizado:

Diseño:

Estudio transversal en el que se pretende estimar la proporción de sujetos con fenotipo grave de alergia a LTP, identificar biomarcadores y construir un modelo predictivo de alto riesgo de presentar una reacción.

Lugar:

Servicio de Alergología del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA).

Sujetos:

La muestra se extrajo de un total de 2.100 pacientes, de entre 16 y 90 años de edad, con una historia de alergia a alimentos u otros alérgenos, derivados a nuestro centro entre inicios del año 2015 y finales del 2019. Los criterios de inclusión fueron:

- (1) Sensibilización a piel de melocotón mediante prueba intraepidérmica positiva, utilizando extracto comercializado con un contenido de Pru p 3 de 30 µg/mL [89] (ALK-Abelló®).
- (2) IgE específica positiva frente a Pru p 3.

Los criterios de exclusión incluyeron no haber firmado el consentimiento informado, ser menor a 16 años y/o tener una enfermedad psiquiátrica que dificultara un diagnóstico clínico fiable.

Cálculo del tamaño muestral:

Se calculó el tamaño muestral para estimar una prevalencia de enfermedad (anafilaxia). Para ello se asumieron los siguientes parámetros: error tipo I del 5 %, proporción esperada de la enfermedad 30 % (anafilaxia) y una precisión del 4,5 %. El valor esperado se obtuvo del peor de los escenarios en la literatura [28-29, 35-36, 39, 63-65, 67]. Con estos datos se obtuvo un tamaño muestral de 399 pacientes.

Recogida de variables:

A todos los pacientes se les realizaron pruebas intraepidérmicas a pólenes, alimentos de origen vegetal y otros neuroalérgenos habituales en nuestra zona (**ver Tabla 1**), y se les extrajo un mínimo de 10mL de sangre periférica para los ensayos *in vitro*.

Tabla 1. Extractos comerciales de alérgenos (ALK-Abello®) incluidos en las pruebas intraepidérmicas.

Pólenes	Gramíneas (mezcla), <i>Artemisa vulgaris</i> , <i>Parietaria judaica</i> , <i>Cupressus arizonica</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Platanus acerifolia</i> , <i>Chenopodium album</i> , <i>Salsola kali</i> , <i>Betula verrucosa</i>
Alimentos de origen vegetal	Almendra, avellana, cacahuete, castaña, nuez, piñón, semilla de girasol, pistacho, piel de melocotón
Otros alérgenos	<i>Alternaria alternata</i> , epitelio de gato, epitelio de perro, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> , profilina

La determinación de IgE específica se analizó mediante *microarray* [77], utilizando la plataforma ISAC ImmunoCAP 112[®] (Phadia; Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). Técnica realizada en el área de Alergología del laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Alicante, cuyo responsable es el Dr. Ángel Esteban. Se consideraron positivas las determinaciones mayores o iguales a 0,3 ISU (*ISAC Standardized Units for specific IgE*). Además de la LTP del melocotón (Pru p 3), otras LTP incluidas en la micromatriz fueron Ara h 9, Art v 3, Cor a 8, Jug r 3, Pla a 3, y Tri a 14. La composición completa más detallada del *array* se describe en el **Anexo 3**.

Se recopilaron y clasificaron los síntomas compatibles con alergia alimentaria o respiratoria mediados por IgE de todos los pacientes, siguiendo las guías y protocolos validados [1, 19, 90]. En cuanto a los síntomas de alergia alimentaria, destacar que se consideró como anafilaxia la aparición rápida de dos o más síntomas que afectaran a la piel, el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio y/o el sistema cardiovascular [18-19]. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado, y se obtuvo la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética e Investigación Clínica del HGUA (ver **Anexo 4**).

Prueba intraepidérmica (*prick test*)

Se utilizó una lanceta de punción de un solo uso con punta de 1 mm (ALK-Abelló[®]) para realizar las pruebas intraepidérmicas con extractos completos comerciales (ALK-Abelló[®]) de alérgenos inhalantes comunes (polen de gramíneas, artemisia, parietaria, salsola, olivo, ciprés, plátano de sombra, cenizo, abedul, ácaros del polvo doméstico, *Alternaria alternata*, epitelios de perro y gato y profilina), y alérgenos de alimentos

vegetales, que además de la piel del melocotón (extracto enriquecido en LTP), incluyeron frutos secos habituales (nuez, avellana, almendra, castaña, semilla de girasol, piñón y pistacho) y cacahuete, siguiendo protocolos estándar [93].

Determinación de IgE específica

Los sueros de todos los pacientes reclutados se analizaron con un inmunoensayo de micromatriz (ImmunoCAP ISAC[®]), siguiendo el protocolo del fabricante [94].

Análisis de datos:

Se realizó un análisis descriptivo y bivalente intermedio para variables cuantitativas mediante T de Student o U de Mann-Whitney en función de los criterios de normalidad (test de Shapiro-Wilk). En condiciones de no normalidad se aplicó el test de Kruskal Wallis o la U de Mann Whitney (corrección de Bonferroni). El análisis de asociación entre variables cualitativas se realizó mediante Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher. Se trabajó con un nivel de confianza del 95 % considerándose valores de $p < 0.05$ estadísticamente significativos. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 24.

Medios dispuestos para la realización del proyecto.

- **Sección de Alergología del HGUA.** Dicho servicio cuenta con una Unidad de Alimentos que dispone de personal médico y de enfermería para el estudio de la hipersensibilidad a alimentos. La unidad cuenta con áreas específicas para realizar el estudio alergológico completo con los test específicos necesarios para este estudio.

- **Laboratorio de Investigación del HGUA** está totalmente equipado y también consta de diferentes áreas: biología molecular, citometría de flujo, cultivos celulares, inmunohistoquímica, inmunoanálisis y bioquímica.

Segundo estudio realizado:

Diseño:

Estudio ambispectivo en el que se pretende estimar la proporción de sujetos con alergia alimentaria por LTP que desarrollan reacciones inducidas por cofactor, así como analizar el fenotipo, gravedad y manejo clínico de este subgrupo de pacientes.

Lugar:

Servicio de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona (HCB).

Sujetos:

La muestra incluyó pacientes sensibilizados a Pru p 3, de entre 18 y 76 años, derivados al Servicio de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona, entre junio de 2013 y enero de 2021, por sospecha de síntomas compatibles con alergia alimentaria u otras enfermedades alérgicas. Los pacientes se reclutaron de forma consecutiva en base a la confirmación de sensibilización a la LTP de melocotón (Pru p 3), mediante IgE sérica específica (ImmunoCAP[®], *ThermoFisher Scientific*, Uppsala, Suecia). Se consideró positiva una IgE sérica frente a Pru p 3 $\geq 0,10$ kU/L [95]. La IgE total (IgEt) se determinó mediante ImmunoCAP[®] (*Thermofisher Scientific*).

Se descartó que la presencia de sensibilización a determinantes de reacción cruzada de los carbohidratos (CCD) tuviera relevancia en nuestra muestra y fuera capaz de invalidar

los datos de los pacientes con niveles de IgEe a Pru p 3 entre 0,1 y 0,35 kU/L [96]. Esta confirmación se basó en un análisis previo basado en esta serie de pacientes que comparó las características de los pacientes con niveles bajos de IgEe a Pru p 3 (0,1-0,35 kU/L) y niveles altos (>0,35 kU/L). Dicho estudio es un artículo recientemente aceptado para su publicación [97]. En resumen, los datos de sensibilización a CCD estaban disponibles en 306 de los 528 pacientes. Ochenta pacientes presentaban niveles de IgEe a Pru p 3 entre 0,1 y 0,35 kU/L (Grupo bajo) y 226 pacientes >0,35 kU/L (Grupo alto). El porcentaje de pacientes sensibilizados a CCD (CCD+) fue similar en ambos grupos (Grupo bajo: 7 de 80 pacientes (8,7 %), Grupo alto: 19 de 226 pacientes (8,4 %)). Los síntomas en pacientes CCD+ y CCD- también fueron similares ($p >0,05$), sin diferencias en cuanto a los síntomas sistémicos o reacciones locales, incluso dentro de cada grupo. Por otro lado, la prueba intraepidérmica también es otra solución para el problema de la sensibilización a CCD [97]. Cabe destacar que, en nuestra cohorte, todos los pacientes tuvieron una prueba intraepidérmica a Pru p 3 positiva (ROXALL Group®, Hamburg, Germany).

Los criterios de exclusión incluyeron no haber firmado el consentimiento informado, ser menor a 16 años y/o tener una enfermedad psiquiátrica que dificultara un diagnóstico clínico fiable.

La información clínica proporcionada por los pacientes se cotejó con los registros electrónicos de la Sección de Alergia. Para disminuir la variabilidad en el diagnóstico, todos los pacientes fueron evaluados por dos médicos siguiendo el mismo protocolo, el cual fue consensuado en la Red Nacional de Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas (ARADyAL).

Se analizaron los datos demográficos, los síntomas de alergia respiratoria y alimentaria y las características de las reacciones de alergia alimentaria de todos los pacientes, incluida

la puntuación de gravedad de reacciones sistémicas según la escala de Brown [6], IgE total e IgEe a Pru p 3. Se estudió la sensibilización a PR-10 y profilina mediante la IgEe a Pru p 1 (proteína *Bet v 1-like*) y Pru p 4 (profilina), considerando positivo un resultado mayor o igual a 0,10 kU/L.

También se realizaron pruebas intraepidérmicas con pólenes (incluidos pólenes de gramíneas, parietaria, artemisa, olivo, ciprés y plátano de sombra) y otros alérgenos (como ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*), hongos de la humedad (*Alternaria alternata* y *Aspergillus fumigatus*) y caspa de perro y gato).

Los pacientes se agruparon en dos fenotipos clínicos, según la presencia o no de algún cofactor (ejercicio físico, AINE, alcohol, menstruación, privación de sueño, o la combinación de dos o más de ellos) identificado por historia clínica en las reacciones de AA inducidas por LTP. El Grupo Cofactor (GC) incluía pacientes con reacciones inducidas por cofactores; y el Grupo No Cofactor (GNC), se compuso de pacientes con reacciones inducidas por LTP en los cuales nunca se había asociado un cofactor.

Se consideró a un paciente asintomático cuando habían reportado haber tolerado melocotón (y cualquier otro alimento de origen vegetal con contenido en LTP) en los seis meses previos.

Se definió como “mezcla de alimentos vegetales” aquellas reacciones en las que intervinieron varios alimentos vegetales que contenían LTP, pero no se identificó un alimento en particular como un desencadenante único. Estos casos podían comprender cualquier alimento de origen vegetal, incluidas verduras, cereales, legumbres, frutas y frutos secos. Esta observación está en consonancia con los hábitos cotidianos de nuestra población que culturalmente sigue una dieta mediterránea, donde es habitual mezclar

verduras, frutas, legumbres y cereales, todos ellos con contenido en LTP, en una misma comida.

La puntuación de gravedad de las reacciones sistémicas se calificó según la escala de Brown [6], que clasifica las reacciones sistémicas en tres grados. El Grado 1 (G1) comprende reacciones limitadas a la piel (urticaria, eritema y/o angioedema), y se considera leve. El Grado 2 (G2) incluye reacciones que además asocian diaforesis, vómitos, náuseas, presíncope, disnea, estridor, sibilancias, opresión en el pecho/garganta y/o dolor abdominal, y se consideran reacciones moderadas. Finalmente, las reacciones de Grado 3 (G3) incluyen la presencia de inestabilidad hemodinámica, como hipotensión y/o hipoxia, y se consideran reacciones graves.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos participantes. El estudio fue aprobado por el comité de ética local del HCB (HCB/2022/0246) (**ver Anexo 5**).

Análisis de datos:

Las variables cuantitativas se expresaron a través de la media \pm desviación estándar y rango, y las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes.

Las variables cuantitativas se analizaron mediante la prueba t de Student y/o la prueba U de Mann-Whitney, según correspondiera. Las asociaciones entre las variables explicativas y de resultado se estimaron calculando la razón de posibilidades (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95 % para las variables cuantitativas, y aplicando la prueba de χ^2 o exacta de Fisher a las variables cualitativas. Se consideró significativo un valor de p por debajo de 0,05. El software estadístico utilizado fue SPSS v.24.

Medios dispuestos para la realización del proyecto.

- **Sección de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona.** Dicho servicio cuenta con una Unidad de Alimentos que dispone de personal médico y de enfermería para el estudio de la hipersensibilidad a alimentos. La unidad cuenta con áreas específicas para realizar el estudio alergológico completo con los test específicos necesarios para este estudio.

- **Laboratorio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona** está totalmente equipado y también consta de diferentes áreas: biología molecular, citometría de flujo, cultivos celulares, inmunohistoquímica, inmunoanálisis y bioquímica.





7. RESULTADOS

Primer estudio realizado:

De los 2.100 pacientes evaluados, se incluyeron 421 sujetos que estaban sensibilizados a Pru p 3, siguiendo los criterios de inclusión. De ellos, el 93 % referían presentar síntomas de alergia alimentaria y el 71,5 % además presentaban síntomas respiratorios (rinitis, rinoconjuntivitis y/o asma bronquial). El 6,9 % del total de la muestra presentaba sensibilización asintomática a Pru p 3 (definición equivalente a una tolerancia a la ingesta de melocotón en los 6 meses previos sin presentar clínica con ningún alimento).

De acuerdo con los criterios de inclusión, todos los participantes tenían una prueba intraepidérmica positiva a extracto de piel de melocotón y una IgEe frente a Pru p3 positiva.

La media de edad de la muestra fue de 33,25 años (rango entre 16-68 años; con una mediana de 32 años). El 54,6 % eran mujeres. No se encontraron diferencias significativas en el perfil de sensibilización a LTP entre sexos: ni en cuanto a la positividad a pruebas cutáneas, ni en los valores de IgEe o su perfil de reconocimiento. El 71 % de los casos reportaban antecedentes familiares de atopia. No observamos asociación significativa entre el tamaño de la pápula en la prueba intraepidérmica a extracto de piel de melocotón enriquecido en LTP y la presencia de anafilaxia.

Perfil de sensibilización en pruebas intraepidérmicas (prick test)

A todos los participantes reclutados se les realizaron pruebas intraepidérmicas con alérgenos alimentarios de origen vegetal, incluyendo los frutos secos más relevantes de nuestra área geográfica. El más prevalente fue el cacahuete (positivo en el

81% de los casos), seguido de la nuez y la avellana. El menos prevalente fue el piñón, el cual resultó positivo en solo el 14 % de los casos (ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje de resultados positivos en el panel de pruebas intraepidérmicas a alimentos de origen vegetal (n = 421).

Alérgeno	Resultados positivos (n = 421)
Cacahuete	81,3 %
Nuez	77,3 %
Avellana	77,3 %
Semilla de girasol	49,0 %
Castaña	45,3 %
Almendra	44,2 %
Pistacho	36,0 %
Piñón	14,4 %

Respecto a las pruebas intraepidérmicas con la batería de pólenes, el más prevalente fue el polen de olivo, seguido del polen de artemisia, gramíneas y amarantáceas (*chenopodium album* y *salsola kali*). Tres de cada cuatro pacientes (el 74 %) estaban sensibilizados a dos o más tipos de pólenes, y solo el 10,5 % estaban monosensibilizados (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Porcentaje de resultados positivos en el panel de pruebas intraepidérmicas a pólenes (n = 421).

Extracto alérgico (polen)	Resultados positivos (n = 421)
Olivo (<i>Olea europea</i>)	61,0 %
Artemisia (<i>Artemisa vulgaris</i>)	44,0 %
Gramíneas (mezcla)	43,0 %
Cenizo (<i>Chenopodium álbum</i>)	42,5 %
Salsola (<i>Salsola kali</i>)	40,0 %
Plátano de sombra (<i>Platanus acerifolia</i>)	31,0 %
Ciprés (<i>Cupressus arizonica</i>)	28,3 %
Parietaria (<i>Parietaria judaica</i>)	18,5 %
Abedul (<i>Betula verrucosa</i>)	6,7 %

En cuanto al resto de neumoalérgenos habituales analizados mediante prueba intraepidérmica, los más prevalentes fueron los ácaros del polvo doméstico y la *Alternaria alternata* (ver **Tabla 4**).

Tabla 4. Prevalencia de sensibilización mediante pruebas intraepidérmicas a otros neumoalérgenos habituales en el área y población de estudio (n = 421).

Extracto alérgico	Resultados positivos (n = 421)
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	56,1 %
<i>Dermatophagoides farinae</i>	54,5 %
<i>Alternaria alternata</i>	20,4 %
Epitelio de gato	13,3 %
Epitelio de perro	12,1 %
Profilina	9,5 %

Perfil de sensibilización a alérgenos moleculares

Se analizó el perfil de sensibilización de cada paciente a las diferentes LTP incluidas en la micromatriz. Se objetivó que la más prevalente fue Jug r 3 (LTP de la nuez), la cual resultó positiva en el 83 % de los casos. Seguida de Pla a 3 (73 %) y Ara h 9 (71 %). La LTP analizada con menor reactividad objetivada fue Par j 2 (LTP del polen de parietaria), con tan sólo un 6,2 % de positividad (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Prevalencia de sensibilización a las diferentes proteínas de transferencia de lípidos (LTP) en la muestra estudiada (n = 421) con el análisis de relaciones recíprocas entre Pru p 3 y las LTP estudiadas.

Fuente alergénica	LTP	Prevalencia de sensibilización (n)	Correlación con Pru p 3 (valor de p)
<i>Prunus persica</i>	Pru p 3	100 % (421)	
<i>Juglans regia</i>	Jug r 3	83,1 % (350)	0,849** (< 0,01)
<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 3	73,0 % (307)	0,761** (< 0,01)
<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 9	71,5 % (301)	0,718** (< 0,01)
<i>Corylus avellana</i>	Cor a 8	64,4 % (271)	0,625** (< 0,01)
<i>Artemisa vulgaris</i>	Art v 3	62,0 % (261)	0,501** (< 0,01)
<i>Olea europaea</i>	Ole e 7	25,0 % (105)	0,166** (< 0,01)
<i>Triticum aestivum</i>	Tri a 14	13,5 % (57)	0,364** (< 0,01)
<i>Parietaria judaica</i>	Par j 2	6,2 % (26)	0,057** (< 0,01)

Notas: Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Pearson por parejas de alérgenos moleculares. Un coeficiente de correlación entre 0,7 y 1 indica una asociación positiva fuerte (**negrita**), y entre 0,3 y 0,7 una asociación positiva moderada. **: La correlación es significativa al nivel 0,01 (dos colas).

Se observó una correlación fuertemente positiva entre Pru p 3 y las LTP de nuez (Jug r 3), plátano de sombra (Pla a 3) y cacahuete (Ara h 9). Por el contrario, no hubo correlación positiva con las LTP de polen de olivo (Ole e 7), parietaria (Par j 2) o trigo (Tri a 14) (**ver Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis de las relaciones recíprocas entre las LTP estudiadas.

	Ara h 9	Art v 3	Cor a 8	Jug r 3	Ole e 7	Par j 2	Pla a 3	Pru p 3	Tri a 14
Ara h 9	1	.666** p = 0.000	.745** 0.000	.713** 0.000	.263** 0.000	.198** 0.000	.726** 0.000	.718** 0.000	.606** 0.000
Art v 3		1	.651** p = 0.000	.540** 0.000	.366** 0.000	.096* 0.049	.612** 0.000	.501** 0.000	.545** 0.000
Cor a 8			1	.654** p = 0.000	.197** 0.000	.118* 0.015	.735** 0.000	.625** 0.000	.568** 0.000
Jug r 3				1	.146** p = 0.003	0.073 0.134	.842** 0.000	.849** 0.000	.430** 0.000
Ole e 7					1	0.021 p = 0.664	.248** 0.000	.166** 0.001	.170** 0.000
Par j 2						1	0.063 p = 0.196	0.057 0.244	.109* 0.026
Pla a 3							1	.761** p = 0.000	.530** 0.000
Pru p 3								1	.364** p = 0.000

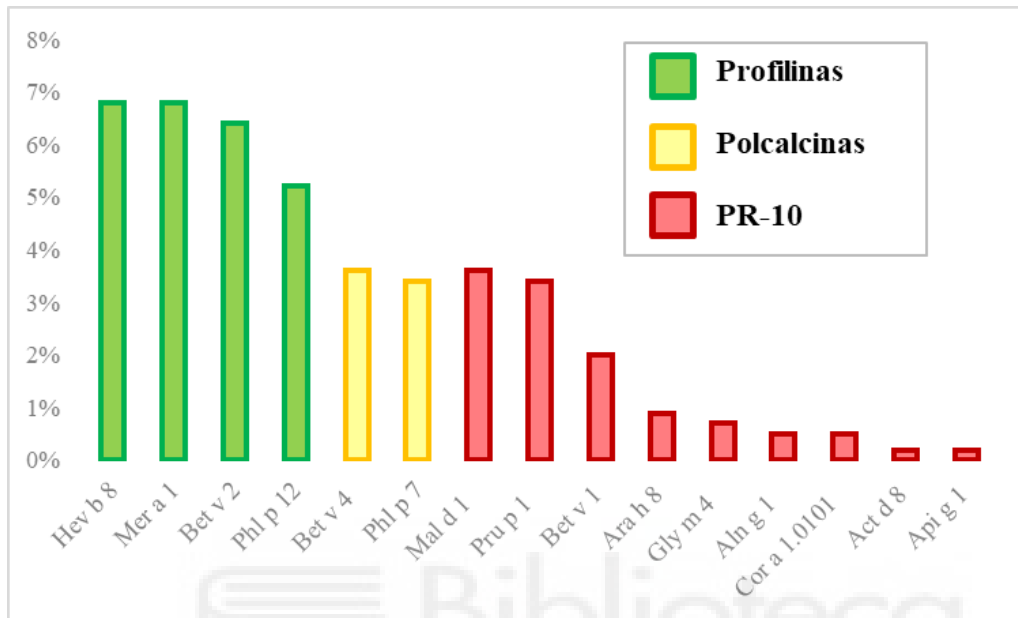
Notas: Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Pearson por parejas de alérgenos moleculares. Un coeficiente de correlación entre 0,7 y 1 indica una asociación positiva fuerte (**negrita**), y entre 0,3 y 0,7 una asociación positiva moderada. *: La correlación es significativa al nivel 0,05 (dos colas). **: La correlación es significativa al nivel 0,01 (dos colas).

Con respecto a la sensibilización a otras familias de alérgenos moleculares representadas en la micromatriz (**ver Figura 1**), el 7,6 % de los pacientes estaban sensibilizados frente a, al menos, una de las profilinas incluidas en la plataforma: Hev b 8 (*Hevea brasiliensis*), Mer a 1 (*Mercurialis annua*), Bet v 2 (*Betula verrucosa*), y/o Phl p 12 (*Phleum pratense*). De este grupo, el 70 % reconocían las cuatro profilinas.

Asimismo, el 4,8 % del total de pacientes de la muestra estaban sensibilizados frente a, al menos, una de las proteínas PR-10 incluidas en la micromatriz: Mal d 1 (*Malus domestica*), Pru p 1 (*Prunus persica*), Bet v 1 (*Betula verrucosa*), Aln g 1 (*Alnus glutinosa*), Act d 8 (*Actinidia deliciosa*), Ara h 8 (*Arachis hypogaea*), Gly m 4 (*Glycine max*), Api g 1 (*Apium graveolens*) y/o Cor a 1.0101 (*Corylus avellana*). De forma similar a las profilinas, el 70% de estos pacientes reconocían 4 o más proteínas de tipo PR-10. La familia de las proteínas polcalcinas mostró la menor prevalencia, con una sensibilización del 4 % en la muestra; incluyendo Bet v 4 (*Betula verrucosa*) y Phl p

7 (*Phleum pratense*). De este grupo, el 82 % (14 de 17 pacientes) estaban sensibilizados a ambas polcalcinas.

Figura 1. Prevalencia de cosensibilización a los diferentes panalérgenos en nuestra serie.



Relación entre alergia alimentaria y síntomas respiratorios

Se categorizó a los participantes según las entidades clínicas que habían presentado asociadas a la ingesta de alimentos de origen vegetal con contenido enLTP: (1) pacientes con antecedente de anafilaxia [19,92]; ocurrida en el 37,1 % de los casos; (2) pacientes con antecedente de urticaria con o sin angioedema; 67,9 % de los casos; (3) síndrome de alergia oral (SAO); 59,1 % de los casos y (4) pacientes sensibilizados asintomáticos; 6,9 % de los casos.

Por otro lado, puesto que un mismo paciente podía haber presentado tanto episodios graves de anafilaxia como varios cuadros de urticaria o SAO, también se clasificó a los pacientes teniendo en cuenta únicamente la reacción de alergia alimentaria asociada a la

ingesta de alimentos con contenido en LTP de máxima gravedad presentada. De esta manera, los pacientes se dividieron en 4 grupos de la siguiente forma:

- Grupo A (anafilaxia): 37,1 % (156 pacientes).
- Grupo B (urticaria con o sin angioedema): 46,6 % (196 pacientes).
- Grupo C (síndrome de alergia oral): 9,4 % (40 pacientes).
- Grupo D (sensibilizados asintomáticos): 6,9 % (29 pacientes).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IgEe a Pru p 3 entre los diferentes grupos clínicos ($p > 0,05$ en todos los casos).

De los 421 pacientes incluidos, el 71,5 % presentaban rinitis o rinoconjuntivitis, y el 29,7 %, asma bronquial. No hubo asociación entre la gravedad de las entidades clínicas presentadas y una mayor o menor prevalencia de rinitis, rinoconjuntivitis y/o asma bronquial.

Una pequeña proporción de pacientes, presentaban diagnóstico de esofagitis eosinofílica asociado (2,1 %), o únicamente síntomas gastrointestinales sin otra afectación clínica (1,9 %).

En cuanto al polen de artemisa, el 62 % del total de pacientes incluidos estaban sensibilizados a Art v 3, mientras que sólo el 11 % de ellos reconocían de forma concomitante Art v 1, el alérgeno principal. Respecto al polen de *platanus acerifolia*, el 73 % de los pacientes (307 de 421) reconocían Pla a 3. De estos 307 pacientes, únicamente el 21 % estaban también sensibilizados a Pla a 1 o Pla a 2.

Los alérgenos moleculares no-LTP incluidos en la micromatriz más prevalentes en la población analizada fueron Ole e 1 (proteína *Ole e 1-like*), Sal k 1 (proteína pectina metilesterasa, alérgeno mayor del polen de *salsola kali*) y Cup a 1 (proteína pectato liasa de la familia *Cupressaceae*, grupo 1) (ver **Tabla 7**).

Tabla 7. Alérgenos moleculares no-LTP incluidos en la micromatriz más prevalentes en la muestra de 421 pacientes sensibilizados a Pru p 3.

Alérgeno	Especie	Prevalencia (%)
Ole e 1	<i>Olea europaea</i>	51,1
Sal k 1	<i>Salsola kali</i>	37,5
Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>	36,8
Phl p 1	<i>Phleum pratense</i>	33,0
Der p 2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	32,8
Der f 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>	32,0
Cyn d 1	<i>Cynodon dactylon</i>	29,2
Cry j 1	<i>Cryptomeria japonica</i>	26,1
Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	23,8

Riesgo de anafilaxia

Los pacientes cosensibilizados a Ara h 9 o Pla a 3 presentaron mayor prevalencia de anafilaxia (ver **Tabla 8**), con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$ y $p = 0,01$; respectivamente). El resto de los alérgenos moleculares estudiados, incluidas el resto de las LTP analizadas, no se asociaron con un mayor riesgo de anafilaxia. El riesgo de presentar anafilaxia se incrementaba en aquellos pacientes sensibilizados a 5 o más LTP de las estudiadas ($p < 0,001$; OR 2,19; IC del 95% 1,43-3,37). La frecuencia de anafilaxia fue significativamente menor en aquellos que presentaban reactividad frente a 2 o menos LTP ($p = 0,04$; OR 0,39; IC del 95% 0,16-0,98) (ver **Tabla 9 y Figura 2**). De manera interesante, casi la mitad de los pacientes tenían positivas seis LTP (incluyendo,

además de Pru p 3: Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9, Cor a 8 y Art v 3) (**ver Figura 3**). No se incluyó en este contaje de LTP la sensibilización a Tri a 14, Ole e 7 y/o Par j 2 ya que ninguno de los perfiles de sensibilización en los que estaban incluidas alguna de ellas se asoció con un mayor riesgo de anafilaxia (**ver Anexo 6**).

Tabla 8. Asociación entre variables independientes y anafilaxia.

Variable	B	Err. estándar	Test Wald	gl	Valor P	OR	IC del 95%	
Mujeres	-0,033	0,338	0,009	1	0,92	0,97	0,50	1,88
AF de atopia	0,081	0,361	0,051	1	0,82	1,09	0,54	2,20
Edad	0,014	0,015	0,823	1	0,36	1,01	0,98	1,05
Rinitis	0,278	0,395	0,495	1	0,48	1,32	0,61	2,87
Asma	0,316	0,382	0,687	1	0,41	1,37	0,65	2,90
Cacahuete*	0,103	0,062	2,794	1	0,095	1,11	0,98	1,25
Nuez*	0,085	0,065	1,698	1	0,19	1,09	0,96	1,24
Semilla girasol*	0,023	0,052	0,198	1	0,66	1,02	0,92	1,13
Avellana*	-0,011	0,060	0,035	1	0,85	0,99	0,88	1,11
Almendra*	-0,019	0,060	0,100	1	0,75	0,98	0,87	1,10
Ara h 2	0,242	0,323	0,558	1	0,46	1,27	0,68	2,40
Ara h 9	0,227	0,077	8,580	1	0,003	1,26	1,08	1,46
Pla a 3	0,140	0,054	6,658	1	0,010	1,15	1,03	1,28
Tri a 14	0,128	0,150	0,723	1	0,40	1,14	0,85	1,53
Ole e 7	-0,073	0,043	2,907	1	0,088	0,93	0,86	1,01
Art v 3	-0,085	0,061	1,950	1	0,16	0,92	0,82	1,04
Phl p 12	-0,135	0,230	0,345	1	0,56	0,87	0,56	1,37
Pru p 1	-2,256	1,457	2,398	1	0,12	0,11	0,01	1,82

Notas: AF, antecedentes familiares; gl, grados de libertad; IC: intervalo de confianza; OR, razón de probabilidades (*odds ratio*). *Las sensibilizaciones a cacahuete, nuez, semilla de girasol, avellana y almendra están medidas mediante prueba intraepidérmica positiva a extracto comercial. Los modelos estadísticos utilizados, la prueba de Hosmer y Lemeshow y el área bajo la curva ROC, se consideran adecuados si $p > 0,05$ y $p < 0,05$, respectivamente, como ocurrió en nuestros resultados. El riesgo de anafilaxia es mayor cuando $OR > 1$ (**negrita**).

Tabla 9. Incidencia de anafilaxia según el número de sensibilizaciones a LTP, incluyendo Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Pla a 3, Cor a 8 y/o Art v 3.

Núm. LTPs	Pacientes	Pacientes con anafilaxia (%)
1	39	9 (23,1)
2	30	6 (20,0)
3	41	11 (27,5)
4	50	16 (32,0)
≥ 5	261	115 (44,1)
TOTAL	421	157

Figura 2. Número de sensibilizaciones a LTP en el subgrupo de pacientes con anafilaxia, incluyendo Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Pla a 3, Cor a 8 y/o Art v 3.

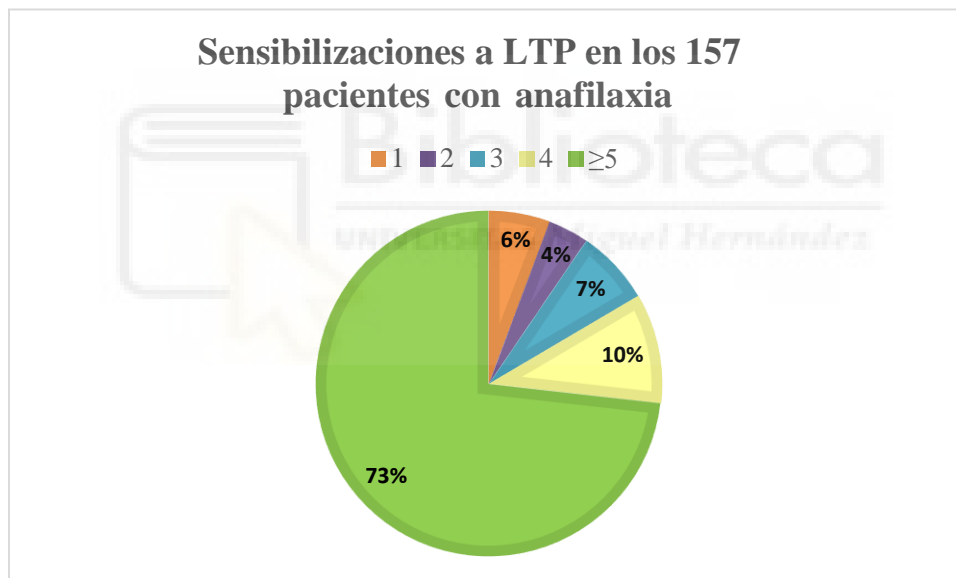
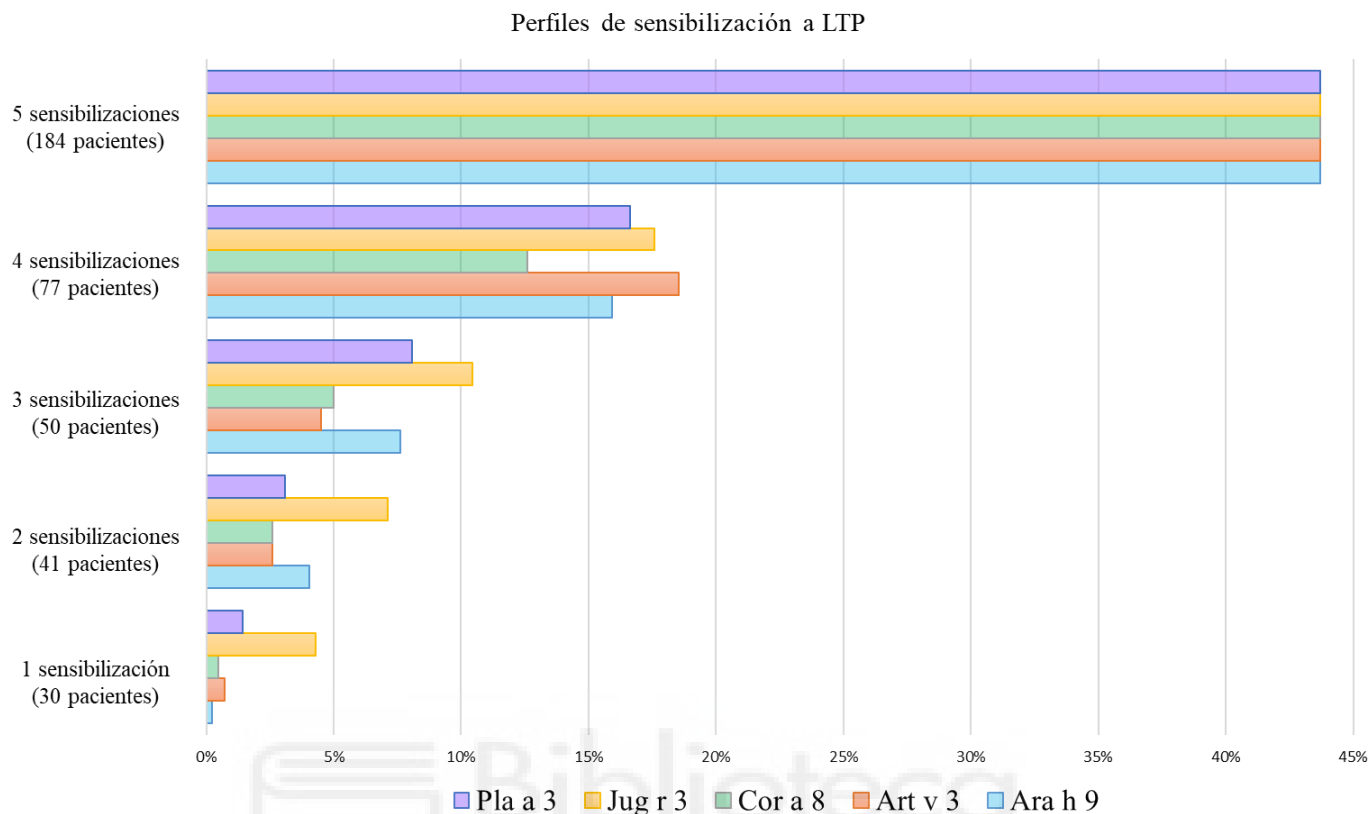


Figura 3. Prevalencia de reactividades a LTP en la muestra total de pacientes.



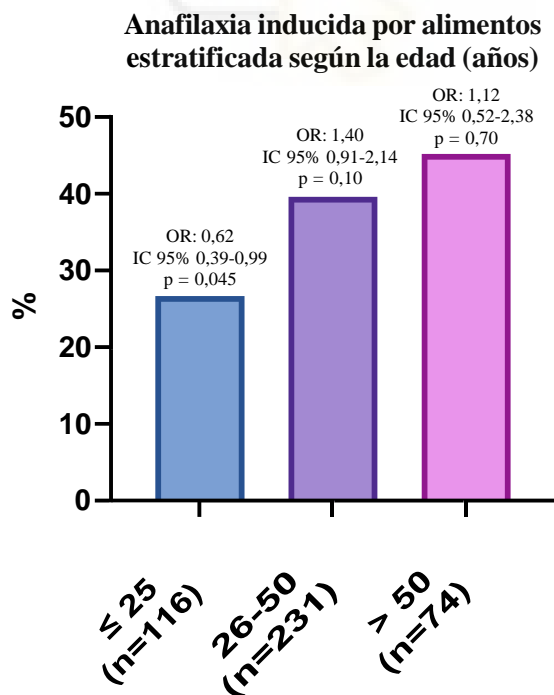
Notas: recordar que todos los participantes estaban sensibilizados a Pru p 3 (9,3 % monosensibilizados). Por lo tanto, hay que tener en cuenta una sensibilización más (Pru p 3) en cada uno de los cinco grupos representados en la figura. No se ha incluido este dato en la figura para obtener una visualización más clara del resto de LTP, ya que en todos los casos la columna referente a Pru p 3 sería equivalente al 100 % del total de todos los grupos.

Al analizar la relación entre la sensibilización a pólenes mediante pruebas intraepidérmicas y las diferentes entidades clínicas, se observó que la proporción de anafilaxia fue del 37 % en los sujetos sensibilizados a pólenes, similar a la encontrada en los casos con pruebas intraepidérmicas negativas a pólenes (36 %).

A pesar de observarse una menor prevalencia de anafilaxia en los pacientes sensibilizados a profilina y/o PR-10 (28 % y 25 %, respectivamente), la diferencia no resultó estadísticamente significativa. El hecho de presentar sensibilización a polcalcina Bet v 4 se asoció de forma significativa con un menor riesgo de anafilaxia ($p < 0,05$).

También se quiso estudiar si existían diferencias asociadas a la edad en cuanto a presentar mayor riesgo de anafilaxia. Para ello, se categorizó a los pacientes en 3 grupos: ≤ 25 años (116 pacientes), 25-50 años (231 pacientes) y >50 años (74 pacientes). Se observó una menor incidencia de anafilaxia (26,7 %) en el grupo de participantes con edad menor o igual a 25 años ($p = 0,045$) (ver **Figura 4**). Sin embargo, no se objetivaron diferencias significativas entre los valores medios de IgEe a Pru p 3 entre los grupos de edad ni entre los pacientes menores versus mayores a 25 años (4,76 vs. 4,74 ISU, respectivamente).

Figura 4. Prevalencia de anafilaxia inducida por alimentos con contenido en LTP, estratificada según la edad, en nuestro grupo de pacientes sensibilizados a Pru p 3.



Segundo estudio realizado:

Se seleccionaron un total de 528 pacientes adultos sensibilizados a Pru p 3 (IgE específica a Pru p 3 $\geq 0,10$ kU/L), siguiendo los criterios de inclusión, y se agruparon según la presencia de cofactor (*ver la sección de 'material y métodos' para una descripción más detallada*). Ciento noventa y cuatro pacientes (el 37 %) se incluyeron en el Grupo Cofactor (GC) y trescientos dos (57 %) en el Grupo No Cofactor (GNC). Treinta y dos (6 %) pacientes eran asintomáticos, por lo que no se incluyeron en ninguno de los dos grupos.

En el Grupo Cofactor hubo mayor presencia de mujeres (66,5 % vs 57,6 %; $p = 0,04$), un inicio más tardío de la enfermedad (27 vs 16,1 años; $p = 0,001$) y mayor relación IgE Pru p 3 / IgE total ($0,08 \pm 0,1$ vs $0,05 \pm 0,1$; $p < 0,001$) (**ver Tabla 10**).

Tabla 10. Características clínicas.

	GRUPO COFACTOR (194 pacientes)	GRUPO NO COFACTOR (302 pacientes)	Valor p
Mujeres n (%)	129 (66,5)	174 (57,6)	0,04
Edad (años)	40,8 \pm 11,6	41,8 \pm 11,6	<i>ns</i>
Edad de debut de alergia alimentaria (años)	27 \pm 17,6	16,1 \pm 11,7	0,001
Rinitis (%)	150 (77,3)	250 (82,8)	0,017
Asma (%)	50 (25,8)	110 (36,4)	0,002
Sensibilización:			
Pólenes* (%)	133 (68,6)	221 (73,2)	<i>ns</i>
Ácaros (%)	95 (49)	165 (54,6)	<i>ns</i>
Perro/gato (%)	57 (29,4)	101 (33,5)	<i>ns</i>
Hongos de la humedad (%)	11 (5,7)	38 (18,9)	<i>ns</i>
Pru p 3 prick test (%)	194 (100)	302 (100)	N/A
PR-10 (Pru p 1, %)**	0 (0)	0 (0)	N/A
Profilina (Pru p 4, %)**	15 (7,7)	16 (5,3)	<i>ns</i>

IgE total (kU/L)	241,5 ± 343,4	293,4 ± 483,7	<i>ns</i>
IgEe melocotón (kU/L)	7,3 ± 10	7,0 ± 9,7	<i>ns</i>
IgEe Pru p 3 (kU/L)	10,2 ± 16,2	7,7 ± 10,9	<i>ns</i>
IgEe Pru p 3/melocotón	1,3 ± 0,9	1,3 ± 1,1	<i>ns</i>
IgEe Pru p 3/IgEt	0,08 ± 0,1	0,05 ± 0,7	<0,001
Reacciones locales (%)		105 (34,8)	
SAO	N/A***	61 (20,2)	N/A
Sínt. gastrointestinales		16 (5,3)	
Urticaria de contacto		28 (9,3)	
Reacciones sistémicas:	194 pacientes	197 pacientes	
Grado 1: leve (%)	54 (36,5)	94 (63,5)	<0,001
Grado 2: moderado (%)	118 (55,1)	96 (44,9)	<0,02
Grado 3: grave (%)	22 (75,9)	7 (24,1)	0,003

Notas: Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. N/A: no aplica; *ns*: estadísticamente no significativo. Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

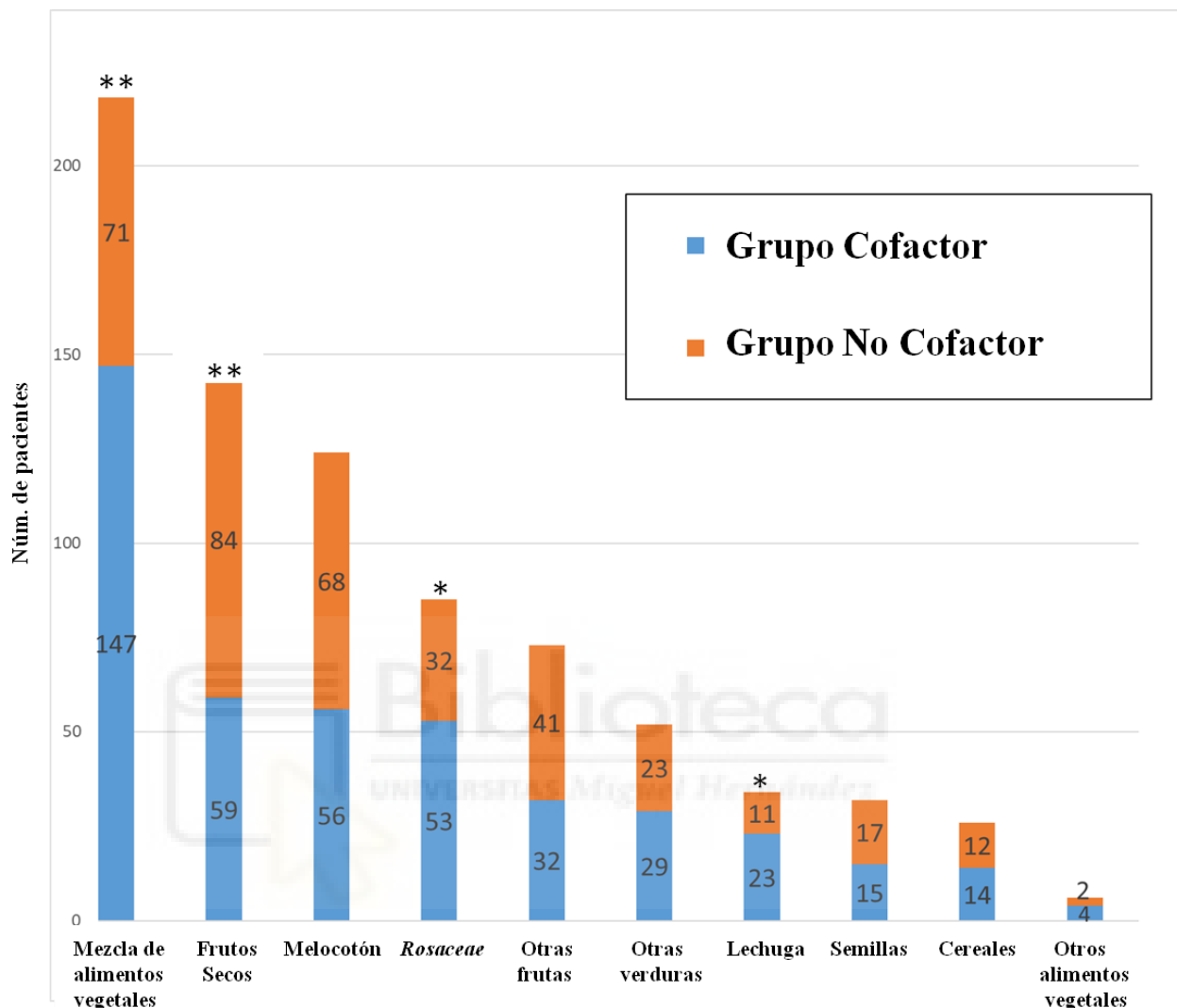
*La sensibilización a pólenes incluye: polen de plátano de sombra, gramíneas, artemisa, olivo, parietaria y ciprés. **La sensibilización a profilina se analizó a través de la IgEe a Pru p 4 y la sensibilización a PR-10 mediante la IgEe a Pru p 1. Se consideró positivo un resultado $\geq 0,10$ kU/L. ***Todos los pacientes del GC habían presentado alguna reacción sistémica.

De la muestra total, 391 pacientes presentaban antecedentes de haber sufrido, al menos, una reacción sistémica inducida por cofactor, sumando un total de 1089 reacciones sistémicas. Considerando solo la reacción más grave experimentada por cada paciente, 29 pacientes (el 5,5 %) sufrieron reacciones sistémicas de Grado 3 según la escala de gravedad de Brown [6], 214 (el 40,5 %) de Grado 2 y 148 pacientes (el 28 %) de Grado 1. Por otro lado, 105 pacientes (el 19,9 %) presentaron solo reacciones locales (el 11,5 % SAO (61 pacientes), el 3 % síntomas gastrointestinales (16 pacientes) y el 5,3 % urticaria de contacto (28 pacientes)). Teniendo en cuenta solo a los pacientes con reacciones sistémicas, el Grupo Cofactor mostró un mayor riesgo de reacciones Grado 2 o Grado 3

(OR 1,97; $p < 0,05$) y Grado 3 (OR 3,5; $p = 0,003$) en comparación con el Grupo No-Cofactor (**ver tabla 10**). La “mezcla de alimentos vegetales” (55,8 %), las nueces (36,6 %) y el melocotón (31,7 %) fueron los alimentos más frecuentemente implicados (**ver Figura 5**). Entre los frutos secos, las nueces (25 %), los cacahuetes (18 %), las avellanas (16 %) y las almendras (8 %) fueron los más frecuentes. De hecho, al comparar ambos grupos, la “mezcla de alimentos vegetales” estuvo significativamente más involucrada en el Grupo Cofactor, así como la lechuga y “otras frutas *Rosaceae* diferentes al melocotón” (**ver Figura 5 y Tabla 11**).



Figura 5. Alimentos implicados en las reacciones sistémicas en el Grupo Cofactor y el Grupo No Cofactor.



Notas: Número de reacciones para cada grupo de alimentos involucrados en reacciones sistémicas, comparando pacientes del GC y pacientes del GNC. Los alimentos se representan en orden de frecuencia de participación: “mezcla de alimentos vegetales”; frutos secos (nuez, avellana, cacahuete, almendra, anacardo, pistacho, castaña o combinación de frutos secos); melocotón; *Rosaceae* (manzana, pera, ciruela, cereza, fresa, nectarina, albaricoque); otras frutas (kiwi, plátano, uva, melón, piña, sandía, naranja); lechuga; cereales (trigo, maíz, arroz, avena); semillas (semillas de girasol, mostaza, soja); otras verduras (tomate, judía verde, lentejas, garbanzos, guisantes, calabacín, champiñón). 'Otros alimentos vegetales' incluyen: miel, cacao, pimentón, perejil, hierba luisa, pimienta y canela. Número total de pacientes que sufrieron reacciones sistémicas = 391. Número de pacientes en el Grupo Cofactor = 194. Número de pacientes en el Grupo No Cofactor = 197. “Mezcla de alimentos vegetales”: reacciones en las que intervinieron varios alimentos vegetales que contenían LTP; *Rosaceae*: otras *Rosaceae* distintas al melocotón. *Valor de $p < 0,05$. **Valor de $p < 0,01$.

Tabla 11. Alimentos implicados en las reacciones sistémicas en el Grupo Cofactor y el Grupo No Cofactor y media de reacciones sistémicas por paciente por cada alimento.

	GRUPO COFACTOR (194 pacientes)			GRUPO NO COFACTOR (197 pacientes)			Valor p*
	Núm. de pacientes (%)	Núm. de reacciones	Media de reacciones/ paciente	Núm. de pacientes (%)	Núm. de reacciones	Media de reacciones /paciente	
Mezcla de alimentos vegetales*	147 (75,8)	245	1,7	71 (36,6)	88	1,2	<,0001
Frutos secos	59 (30,4)	94	1,6	84 (43,3)	131	1,6	0,01
Melocotón	56 (28,9)	63	1,1	68 (35,1)	76	1,1	<i>ns</i>
Rosaceae**	53 (27,3)	68	1,3	32 (16,5)	44	1,4	0,008
Otras frutas	32 (16,5)	36	1,1	41 (21,1)	59	1,4	<i>ns</i>
Otros vegetales	29 (14,9)	44	1,5	23 (11,9)	31	1,3	<i>ns</i>
Lechuga	23 (11,9)	24	1,0	11 (5,7)	13	1,2	0,03
Semillas	15 (7,7)	16	1,1	17 (8,8)	17	1	<i>ns</i>
Cereales	14 (7,2)	16	1,1	12 (6,2)	17	1,4	<i>ns</i>
Otros alimentos vegetales	4 (2,1)	4	1	2 (1)	3	1,5	<i>ns</i>

Notas: Los alimentos se representan en orden de frecuencia de participación: “mezcla de alimentos vegetales”; frutos secos (nuez, avellana, cacahuete, almendra, anacardo, pistacho, castaña o combinación de frutos secos); melocotón; *Rosaceae* (manzana, pera, ciruela, cereza, fresa, nectarina, albaricoque); otras frutas (kiwi, plátano, uva, melón, piña, sandía, naranja); lechuga; cereales (trigo, maíz, arroz, avena); semillas (semillas de girasol, mostaza, soja); otras verduras (tomate, judía verde, lentejas, garbanzos, guisantes, calabacín, champiñón). 'Otros alimentos vegetales' incluyeron: miel, cacao, pimentón, perejil, hierba luisa, pimienta o canela.

*“Mezcla de alimentos vegetales”: reacciones en las que estuvieron involucrados varios alimentos vegetales que contenían LTP, pero no se identificó uno de los alimentos en particular como un desencadenante único.

***Rosaceae*: otras *Rosaceae* diferentes al melocotón.

*El valor de p se calculó comparando el número de pacientes que reaccionaron con cada grupo de alimentos mediante la prueba de Chi². Un valor de p <0,05 se consideró estadísticamente significativo. *ns*: estadísticamente no significativo.

Por otro lado, en el Grupo Cofactor se analizó si existían pacientes que únicamente presentaban reacciones de alergia alimentaria inducidas por LTP en presencia de algún cofactor. Dentro de este grupo, hubo 9 pacientes (el 4,6 %) que sólo experimentaron reacciones inducidas por cofactor, por lo que se incluyeron dentro del "Grupo Cofactor Puro". Cabe destacar, por lo tanto, que 185 de los 194 pacientes del Grupo Cofactor (el 95,4 %) presentaron reacciones con y sin cofactores ("Grupo Cofactor Mixto"), relacionadas con diferentes alimentos de origen vegetal. Los pacientes del "Grupo Cofactor Puro" mostraron una relación $IgEe \text{ a Pru p } 3 / IgEt$ significativamente más baja y experimentaron una tasa de prevalencia significativamente mayor de reacciones sistémicas graves de Grado 3 (OR 7,42; $p < 0,01$; IC 95 % 1,8-30,1) en comparación con el "Grupo Cofactor Mixto". No se encontraron diferencias entre las otras variables estudiadas (ver **Tabla 12**).

Curiosamente, a la hora de analizar el fenotipo clínico de mayor gravedad dentro del Grupo Cofactor, las reacciones inducidas por cofactores fueron más graves (Grado 2 y Grado 3) que las reacciones sistémicas sin presencia de cofactor (OR 3,2; $p < 0,001$) (ver **Tabla 12**). El ejercicio (41,7 %) y los AINE (37,8 %) fueron los cofactores más frecuentes y el tipo de cofactor no se correlacionó con la gravedad de la reacción (ver **Figura 6**).

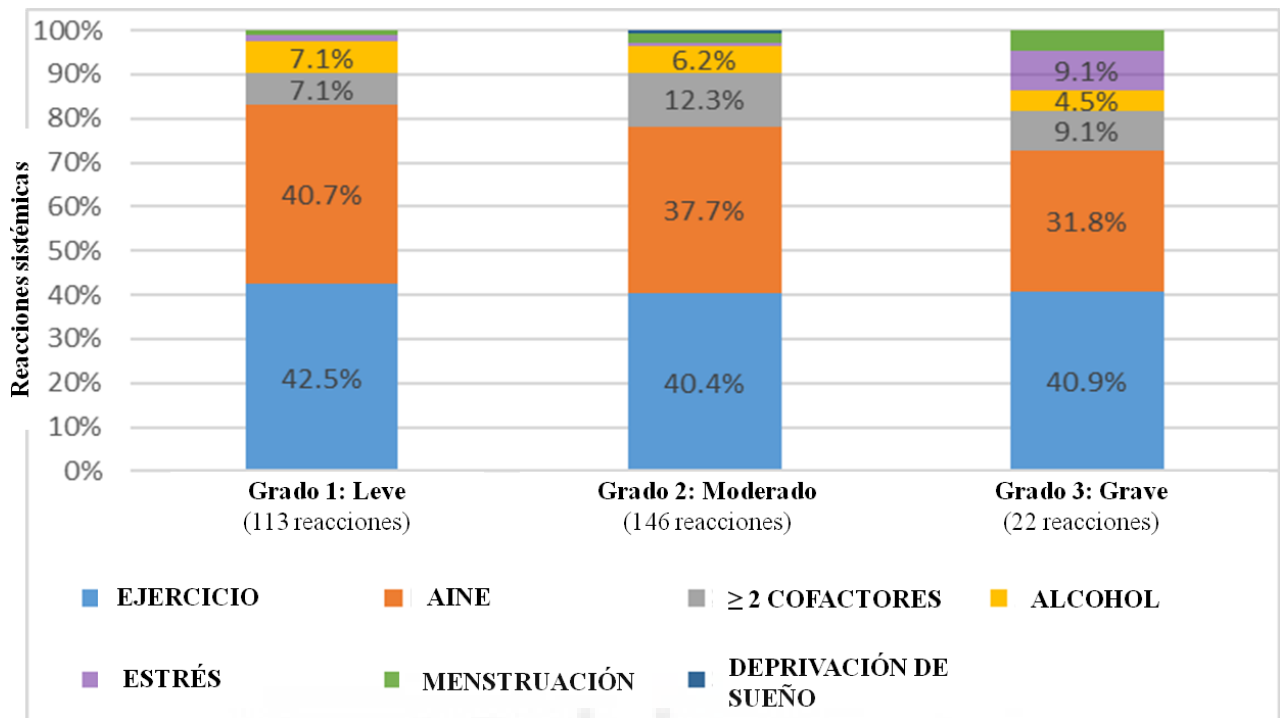
Tabla 12. Datos demográficos que comparan pacientes del “Grupo Cofactor Puro” con pacientes del “Grupo Cofactor Mixto”.

		GRUPO COFACTOR PURO (9 pacientes)	GRUPO COFACTOR MIXTO (185 pacientes)	Valor P
Media ± desviación estándar	Edad (años)	47,4 ± 15,5	40,5 ± 11	<i>ns</i>
	Edad de debut de alergia alimentaria (años)	35 ± 21,2	26,6 ± 17,6	<i>ns</i>
	IgE total (kU/L)	503 ± 784	228 ± 305	<i>ns</i>
	IgEe melocotón (kU/L)	6,3 ± 8,1	7,3 ± 10	<i>ns</i>
	IgEe Pru p 3 (kU/L)	2,4 ± 2,8	10,6 ± 16,5	<i>ns</i>
	IgEe Pru p 3 / IgEe melocotón	1,7 ± 1,3	1,3 ± 0,9	<i>ns</i>
	IgEe Pru p 3 / IgEt	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,1	< 0,01
Reacciones sistémicas (núm. de pacientes)	G1 leve (%)	3 (33,3)	115 (62,2)	<i>ns</i>
	G2 moderado (%)	2 (22,2)	52 (28,1)	<i>ns</i>
	G3 grave (%)	4 (44,4%)	18 (9,7)	< 0,01

Notas: Los pacientes del “Grupo Cofactor Puro” son aquellos individuos que experimentaron solo reacciones inducidas por cofactores; Los pacientes del “Grupo Cofactor Mixto” se definen como aquellos individuos que sufren reacciones sistémicas con y sin cofactor.

Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. *ns*: estadísticamente no significativo.

Figura 6. Reacciones sistémicas inducidas por cofactor dentro del Grupo Cofactor en pacientes sensibilizados a Pru p 3.



8. DISCUSIÓN

Primer estudio realizado:

El objetivo del estudio fue evaluar la relación entre anafilaxia y la respuesta de la IgE específica en un gran grupo de pacientes sensibilizados a Pru p 3, analizando las entidades clínicas reportadas por los mismos, la sensibilización a otros componentes moleculares incluidos en la micromatriz *112 ImmunoCAP ISAC*[®] (*Phadia; Thermo Fisher Scientific*), y la relación entre los alérgenos alimentarios e inhalantes. Los resultados objetivados en cuanto a la prevalencia de sensibilizaciones a los diferentes neumoalérgenos, muestran un patrón similar al observado en nuestra área en otros estudios nacionales [26], aunque la sensibilización a los pólenes de artemisa y plátano de sombra, mostraron mayores valores positivos de los esperados.

No se observó ninguna relación entre la respuesta cutánea en la prueba intraepidérmica a piel de melocotón u otros extractos alimentarios y anafilaxia u otros síntomas reportados por los pacientes, como también se ha visto publicado en otros estudios [98-99].

A pesar de que la entidad clínica más frecuentemente reportada en nuestro grupo fue la urticaria, presente en el 67,9% de los casos, la anafilaxia ocurrió en más de un tercio de los casos. Sólo una minoría de los participantes sensibilizados a Pru p 3 toleraban el melocotón. Los síntomas gastrointestinales están cobrando cada vez más protagonismo en la alergia alimentaria por LTP en nuestra práctica clínica habitual, aunque en la mayor parte de los casos, suelen ir asociados a otros síntomas, ya sean síntomas leves como SAO o de mayor gravedad, como una urticaria generalizada o algún episodio de anafilaxia. En la población con alergia a LTP se han llegado a describir alteraciones digestivas crónicas hasta en la mitad de los casos [62], a pesar de que todavía no se ve suficientemente reflejado en la mayoría de los estudios publicados en la literatura. Creemos que, en

nuestra muestra, la pequeña proporción de pacientes encontrada que referían únicamente presentar síntomas gastrointestinales sin afectación cutánea u otra clínica asociada, podría deberse a que se trata de un síntoma que muchas veces el paciente no le da tanta importancia como los anteriormente citados (por lo que podría estar infradiagnosticado). Es posible que, si se estudiara en la actualidad una nueva muestra de pacientes y se realizara una anamnesis minuciosa de las manifestaciones digestivas presentadas con cada alimento, el porcentaje de pacientes afectados de dicha entidad clínica fuera superior al encontrado.

No se encontraron diferencias significativas respecto a la gravedad de los síntomas de alergia alimentaria entre los pacientes con y sin alergia respiratoria (rinitis, rinoconjuntivitis y/o asma bronquial); estos hallazgos son consistentes con estudios previos [31, 73, 100]. Por consiguiente, a pesar de que la alergia alimentaria y respiratoria son entidades que suceden en pacientes atópicos y pueden estar interrelacionadas [101-102], en nuestro grupo de sensibilizados a LTP, el hecho de padecer una alergia respiratoria concomitante, parece no asociarse a mayor gravedad de los síntomas de alergia alimentaria.

En nuestro estudio, la LTP más prevalente después de Pru p 3 fue Jug r 3, seguida de Pla a 3, Ara h 9 y Cor a 8. Las menos reconocidas fueron Ole e 7, Tri a 14 y Par j 2. El perfil de reconocimiento de LTP que se observó en nuestra población fue similar al patrón reportado por otros estudios en el área Mediterránea y en otros lugares más alejados, como Europa Central o China, entre otros [31, 43, 57-61, 84, 103-105]. En nuestra región, la nuez es ampliamente consumida, y es posible que algunos de nuestros pacientes se sensibilizaran primariamente a Jug r 3 en lugar de a Pru p 3. En comparación con Ara h 9, la prevalencia de sensibilización a Ara h 1 y Ara h 3 fue baja (2%), indicando que Ara h 9 era el componente más importante involucrado en la sensibilización a cacahuete en

nuestra área, como también ha sido reportado por Vereda y colaboradores [104], en pacientes alérgicos a cacahuete. De hecho, en estos casos, el sensibilizador primario parece ser Pru p 3, seguido de una respuesta de los pacientes a Ara h 9 por reactividad cruzada [84, 104]. A pesar de que la presencia de sensibilización a polen de plátano de sombra no fue alta en nuestra población, Pla a 3 fue la tercera LTP más prevalente. Por este motivo creemos que, en nuestra muestra, Pru p 3 está actuando como alérgeno primario y las respuestas a Pla a 3 se deben a reactividad cruzada. De hecho, Pla a 3 se asoció con anafilaxia de forma significativa. También se ha relacionado con reacciones graves por alimentos y, junto a Art v 3, a síntomas respiratorios en individuos alérgicos a LTP [61, 105].

Nuestros resultados no mostraron asociación significativa entre Pru p 3 y Ole e 7 o Par j 2, por ende, confirmando las observaciones de otros estudios [31, 58, 44] y apoyando la falta de reactividad cruzada entre la LTP del melocotón y las LTP de estos pólenes. Se consideró que la alta prevalencia de sensibilización frente a Ole e 7 en nuestra población podría deberse simplemente a la sensibilización al polen de olivo, puesto que este es el alérgeno más frecuentemente reconocido después de Ole e 1 [106].

La razón por la cual la sensibilización a *cupressus arizonica* fue casi la misma que la de *phleum pratense* por *microarray*, pero la sensibilización al polen de gramíneas por prueba intraepidérmica fue casi el doble que la de ciprés, podría explicarse por el hecho de que el extracto de polen de gramíneas aplicado en la prueba intraepidérmica contiene varias especies de gramíneas (además de *phleum pratense*); o porque Cup a 1 también es un determinante de reacción cruzada de los carbohidratos (CCD) y su sensibilización aumenta debido a la reactividad cruzada con otros CCD. En España se ha descrito reactividad cruzada del polen de cupresáceas con Pru p 3, sin embargo, su relevancia clínica es desconocida [75].

La asociación entre la sensibilización a Ara h 9 o Pla a 3 y anafilaxia fue significativa. Scala y col. [31] reportaron que los pacientes que reaccionaban a más de 5 LTPs experimentaban un mayor número de reacciones sistémicas inducidas por alimentos. Este hallazgo fue replicado en nuestra cohorte. Un hallazgo interesante de nuestro estudio es que más de la mitad de los pacientes fueron positivos a 5 o más LTPs (incluyendo Pru p 3, Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9, Cor a 8 y Art v 3). Teniendo en consideración esta observación, 261 participantes de nuestro grupo de estudio fueron inmuno-reactivos a 5 o más de las moléculas de LTP estudiadas, probablemente reflejando un grado de reconocimiento de epítopo común.

La homología de secuencia de aminoácidos con Pru p 3 entre las diferentes LTPs incluidas en la micro-matriz es la siguiente: Jug r 3 (65%), Ara h 9 (62%), Cor a 8 (60%), Art v 3 (51%), Pla a 3 (46%), y Tri a 14 (47%). Las LTP de pólenes de olivo (Ole e 7) y parietaria (Par j 2) presentan <35% de identidad de secuencia con Pru p 3 [74]. A partir de nuestros datos, se planteó la hipótesis de que Ara h 9, Cor a 8 y Jug r 3, con sus correspondientes identidades de secuencia de aminoácidos se asociaban, junto a Pru p 3, con la sensibilización tanto a determinados pólenes como a alimentos vegetales [73].

La mayoría de los pacientes sensibilizados a profilina, reconocieron 2 o más profilinas, incluyendo aquellas que no era relevantes en nuestra población, reforzando el concepto de que se trata de un panalergeno que reacciona de forma cruzada con otros miembros de su familia. En este estudio, se encontró que la sensibilización a Pru p 1 (una proteína de la familia de las PR-10) o Phl p 12 (una profilina), se asociaba de forma negativa con el desarrollo de anafilaxia; sin embargo, este hallazgo no fue estadísticamente significativo. Aunque algunos estudios han encontrado que la sensibilización a Pru p 1, Pru p 4 o Phl p 12 se asociaba con una menor probabilidad de anafilaxia [42, 68], no se pudo confirmar esta observación. Sin embargo, la mayoría de estos estudios provienen de países del Norte

o Centro de Europa [73, 107], en donde la sensibilización a estos alérgenos es mucho más alta que en el Sur de Europa [72, 108]. En este sentido, la baja prevalencia de sensibilización a profilinas y/o PR-10 en nuestro medio justificaría nuestros hallazgos. En lo que respecta a la cosensibilización a otros panalérgenos, como profilina o PR-10, como posible factor protector de anafilaxia inducida por alimentos, recientemente se ha publicado otro estudio español comparando dos poblaciones de Málaga y Barcelona, en el cual se objetivó asociación significativa sólo con profilina (no se analizó PR-10 u otros panalérgenos) en el grupo de Málaga, pero no en el de Barcelona [109]. Cabe destacar que el primer grupo incluía 49 de 177 (28 %) pacientes cosensibilizados a profilina, y el segundo sólo 7 de 75 (9 %), por lo que de nuevo podríamos pensar que la prevalencia de cosensibilizados a esta proteína podría ser un factor muy relevante.

Una limitación de nuestro estudio es que los casos fueron seleccionados basados en el diagnóstico de alergia a LTP mediante la historia clínica, pruebas cutáneas y la IgE específica frente a Pru p 3 positivas, en lugar de realizar la selección a través de la provocación con alimentos. Sin embargo, no se realizaron provocaciones orales con alimentos porque, en muchos de los casos, no se identificó un único alimento vegetal específico implicado en la reacción. La elevada tasa de reactividad cruzada entre las diferentes LTP, puede dificultar la identificación de un único alimento desencadenante, o que el alimento desencadenante de la reacción sea un compuesto de alimentos vegetales, que dificulta mucho la realización de una provocación alimentaria oral estandarizada para todos los pacientes. Otros estudios que han analizado la alergia a LTP, muy frecuentemente han incluido una cohorte de pacientes que comparten una alergia alimentaria al mismo alimento vegetal, lo que facilita el uso de las pruebas de provocación oral estandarizadas. Otra limitación es que otros alérgenos alimentarios comunes podrían estar involucrados en nuestra población, como manzanas, naranjas, lechuga y mostaza,

de los cuales no están representadas las LTP correspondientes de cada uno de ellos en la micromatriz. Palacin y cols. demostraron que las LTP de estos alérgenos, así como de otros, eran relevantes en inducir sensibilización [110].



Segundo estudio realizado:

Las proteínas de transferencia de lípidos son una de las familias más implicadas en la alergia alimentaria en la región mediterránea, aunque su relevancia, como se ha descrito en los últimos años, no se limita a esta área geográfica.

El manejo actual de la alergia a la LTP es muy complejo por (1) el amplio espectro de alimentos que potencialmente inducen una reacción, (2) se asocia con frecuencia a cofactores que pueden aumentar la gravedad de las reacciones y (3) no disponemos de herramientas en la actualidad que nos ayuden a identificar a aquellos pacientes con riesgo de presentar reacciones graves. Por lo tanto, los pacientes alérgicos a la LTP evitan con asiduidad múltiples alimentos, lo que conlleva un alto impacto en su calidad de vida.

En este estudio se ha analizado el papel de los cofactores y el fenotipo de los pacientes con alergia alimentaria inducida por cofactor en un amplio grupo de 528 pacientes sensibilizados a la LTP del melocotón, sensibilizador primario en nuestro medio y el alérgeno alimentario más frecuente.

En nuestra serie no se obtuvo ningún resultado positivo para IgEe a Pru p 1 (PR-10) y sólo 31 pacientes (5,9 %) fueron positivos frente a Pru p 4 (profilina). Los pacientes de esta área geográfica (Barcelona, área mediterránea) tienen una exposición particular a pólenes (principalmente plátano de sombra y parietaria) que hace que la sensibilización a PR-10 y profilina sea poco frecuente, por ello la ausencia de sensibilización a PR-10 y el bajo porcentaje de sensibilización a profilina. Al comparar los pacientes cosensibilizados a profilina con monosensibilizados a LTP, no se encontraron diferencias en la gravedad de los síntomas de alergia alimentaria. Estos resultados están en consonancia con publicaciones previas de nuestro grupo; en una serie similar de 75 pacientes alérgicos a LTP solo se encontraron 7 sujetos (9,3 %) sensibilizados a profilina, y tampoco se

encontraron diferencias en la gravedad de los síntomas entre la sensibilización a profilina y la monosensibilización a LTP [110].

Los hallazgos principales de nuestro estudio han sido que (1) las reacciones relacionadas con cofactores en pacientes alérgicos a LTP son significativamente más graves que las reacciones independientes de cofactor; (2) el desencadenante más frecuente de las reacciones sistémicas inducidas por LTP es la combinación de diferentes alimentos vegetales (verduras, frutas, cereales, legumbres); (3) las mujeres tienen significativamente más reacciones dependientes de cofactor que los hombres y (4) los pacientes alérgicos a la LTP pueden tener reacciones tanto dependientes como independientes del cofactor.

El predominio del sexo femenino en el GC podría estar relacionado con factores hormonales; de hecho, los niveles de estrógenos se han relacionado con un mayor riesgo de anafilaxia [3]. Realmente, la ingesta de AINE para controlar el dolor menstrual es una práctica habitual que podría explicar la frecuente implicación de estos fármacos en nuestra serie. También se observó que los pacientes con reacciones inducidas por cofactor presentaban un inicio más tardío de la enfermedad y una relación $IgE_e \text{ Pru p 3} / IgE_t$ más alta. Hasta la fecha, los niveles de IgE_e en la alergia a LTP no se han correlacionado con la gravedad [111] y no hay datos sobre la relevancia de las ratios [112]. El momento del diagnóstico juega un papel fundamental, ya que el tiempo desde la primera reacción hasta el diagnóstico es muy variable y puede afectar al número de reacciones que puede tener un paciente, así como al riesgo de presentar reacciones inducidas por cofactor. Sin embargo, el número de alimentos que contienen LTP y pueden estar involucrados en estas reacciones, al menos en nuestra área, es muy alto, incluyendo frutas, verduras, cereales, frutos secos, legumbres... tal como se muestra en la **Tabla 11** y la **Figura 5**. Por lo tanto,

aunque un paciente pueda evitar un alimento en particular después de sufrir una reacción, todavía hay una gran variedad de otros alimentos que pueden inducir una nueva reacción.

Se ha mostrado en este estudio que un mismo paciente puede tener una reacción sistémica tanto con, como sin cofactor. Por lo tanto, el *efecto cofactor* podría no depender de las características intrínsecas del individuo y podría considerarse un efecto universal potencial, como también se muestra en el modelo de alergia al trigo [5]. En nuestro estudio, las reacciones inducidas por cofactor también fueron más graves y, hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de este hallazgo en una gran serie de pacientes con alergia alimentaria por LTP.

La mezcla de alimentos vegetales fue el grupo más frecuentemente involucrado en las reacciones sistémicas, lo que significa que se consumieron una combinación de diferentes alimentos vegetales en una misma comida, la mayoría de los cuales contenían LTP [62]. Por lo tanto, no fue posible identificar si el desencadenante era solo uno de los alimentos vegetales o la dosis acumulada de LTP de las diferentes fuentes alimentarias. Este concepto está en consonancia con las ideas compartidas por Skypala y colaboradores en el grupo de trabajo publicado el año pasado sobre alergia alimentaria por LTP [113].

Hoy en día, la evitación de cofactores no es una práctica generalizada en todos los pacientes con alergia a LTP y, por lo general, solo se recomienda en pacientes con reacciones previas relacionadas con cofactores. De hecho, no hay ninguna recomendación específica con respecto a la evitación sistemática de cofactores en ninguno de los consensos recientes sobre alergia alimentaria, incluido el grupo de trabajo de la EAACI recientemente publicado sobre alergia a LTP [113].

En conclusión, más del 35% de los pacientes sensibilizados a LTP de esta gran cohorte presentaron reacciones inducidas por cofactor, frecuentemente graves, aunque los

alimentos culpables generalmente no se pudieron identificar de forma individual. Por este motivo, el consejo dietético es extremadamente complicado en estos pacientes, dejándoles con un alto riesgo de desarrollar anafilaxia. Esta observación puede sugerir que, de acuerdo con las recomendaciones de la actualización de anafilaxia de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) [1], nuestros resultados sugieren que cualquier paciente alérgico a LTP con una reacción alérgica previa de leve a moderada debería llevar un autoinyector de adrenalina, debido al alto riesgo de desarrollar una reacción grave. Por lo tanto, la prescripción de autoinyectores de adrenalina debería basarse no sólo en el historial de haber presentado una anafilaxia previa, sino también en el antecedente de haber presentado una reacción de leve a moderada con alimentos que se conoce que están asociados con el desarrollo de anafilaxia en la región del paciente que, en la nuestra, es cualquier alimento que contenga LTP.

Se necesitan más estudios para validar la relevancia de los cofactores en la alergia alimentaria por LTP. El mayor reto recae en que dichas recomendaciones a los pacientes se conviertan en una práctica universalmente aceptada, con el fin de poder comparar los diferentes resultados obtenidos, incluyendo un mayor número y diversidad de pacientes, para que avalen los resultados obtenidos en nuestro estudio.



9. CONCLUSIONES

Se concluye que, en nuestro grupo de estudio:

1. Un tercio de los pacientes sensibilizados a Pru p 3 desarrollaron anafilaxia.
2. Del registro con variables clínicas y de laboratorio de pacientes con sensibilización a LTP se concluye que la presencia de sensibilización a 5 o más LTP fue el mejor predictor (factor de riesgo) de anafilaxia.
3. Los cofactores juegan un papel importante en la estratificación del riesgo de los pacientes sensibilizados a LTP, asociándose a un mayor riesgo de presentar reacciones sistémicas moderadas y graves.
4. Más de un tercio de los pacientes adultos sensibilizados a LTP presentan reacciones de alergia alimentaria en presencia de cofactores. Además, el Grupo Cofactor asocia una edad de debut más tardía de la enfermedad y una mayor relación IgE específica a Pru p 3 / IgE total.
5. El efecto del cofactor puede ser universal, lo que significa que los cofactores pueden inducir reacciones sistémicas graves en cualquier paciente alérgico a la LTP independientemente de un historial previo de anafilaxia relacionada con la LTP, como ya se ha demostrado en la alergia al trigo.
6. Las mujeres son una población de alto riesgo de presentar reacciones sistémicas relacionadas con cofactores.
7. Las LTPs más prevalentes en nuestros pacientes sensibilizados a Pru p 3, por orden de mayor a menor correlación, y posiblemente por mayor homología, fueron Jug r 3 de la nuez, Pla a 3 del polen de plátano oriental, Ara h 9 del cacahuete, Cor a 8 de la avellana y Art v 3 del polen de artemisia.

8. La cosensibilización a otros panalérgenos como PR-10 o profilinas no se correlaciona con la gravedad clínica en nuestro grupo de pacientes sensibilizados a LTP.
9. Nuestros datos sugieren que no hay asociación entre la gravedad de las reacciones de alergia alimentaria por sensibilización a LTP y los síntomas respiratorios.
10. La cantidad de LTP acumulada por la ingesta de varios alimentos que contienen LTP en una misma comida puede ser un factor importante a considerar en la estratificación del riesgo y el consejo dietético de estos pacientes.



CONCLUSIONS

In our study group, we conclude the following observations:

- 1. One-third of Pru p 3-sensitized patients developed anaphylaxis.*
- 2. From the registry with clinical and laboratory variables of patients with LTP sensitization, it is concluded that the presence of sensitization to 5 or more LTP is the best predictor (risk factor) of anaphylaxis.*
- 3. Cofactors play an important role in the risk stratification of patients sensitized to LTP, being associated with a higher risk of presenting moderate and severe systemic reactions.*
- 4. More than a third of adult patients sensitized to LTP present food allergy reactions in the presence of cofactors. In addition, the Cofactor Group associates with a later age of disease onset and a higher specific IgE to Pru p 3 / total IgE ratio.*
- 5. The cofactor effect may be universal, meaning that cofactors can induce severe systemic reactions in any LTP-allergic patient regardless of a prior history of LTP-related anaphylaxis, as has already been shown in wheat allergy.*
- 6. Women are a high-risk population for cofactor-related systemic reactions.*
- 7. The most prevalent LTPs in our patients sensitized to Pru p 3, in order of highest to lowest correlation, and possibly due to greater homology are: Jug r 3 from walnuts, Pla a 3 from platanus acerifolia pollen, Ara h 9 from peanut, Cor a 8 from hazelnut and Art v 3 from artemisia pollen.*
- 8. Cosensitization to other panallergens such as PR-10 or profilins does not correlate with clinical severity in our group of patients sensitized to LTP.*
- 9. Our data suggest there is no association between the severity of LTP sensitization food allergy reactions and respiratory symptoms.*

10. *The amount of LTP accumulated by the intake of several LTP-containing foods in the same meal may be an important factor to consider in risk stratification and dietary advice for these patients.*





10. ANEXO

Anexo 1. Primera publicación: Ruano-Zaragoza M, Somoza ML, Jiménez-Rodríguez TW, Soriano-Gomis V, González-Delgado P, Esteban-Rodríguez A, Palazón-Bru A, Blanca M, Fernández-Sánchez J. Lipid Transfer Protein Sensitization: Risk of Anaphylaxis and Molecular Sensitization Profile in Pru p 3-Sensitized Patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2021;182(5):425-432. doi: 10.1159/000511977.



Lipid Transfer Protein Sensitization: Risk of Anaphylaxis and Molecular Sensitization Profile in Pru p 3-Sensitized Patients

Maria Ruano-Zaragoza^{a, b} Maria Luisa Somoza^c
Teodorikez Wilfox Jiménez-Rodríguez^a Victor Soriano-Gomis^{a, d}
Purificación González-Delgado^{a, d} Angel Esteban-Rodríguez^e
Antonio Palazón-Bru^d Miguel Blanca^f Javier Fernández-Sánchez^d

^aAllergy Section, ARADyAL Spanish Network, Alicante General University Hospital-ISABIAL, Alicante, Spain; ^bPhD Program in Public Health, Medical and Surgical Sciences. Miguel Hernandez University, Alicante, Spain; ^cAllergy Service, Hospital Infanta Leonor, Madrid, Spain; ^dClinical Medicine Department, Miguel Hernandez University, Alicante, Spain; ^eClinical Analysis Department, Alicante General University Hospital, Alicante, Spain; ^fSection of Allergy, Infanta Leonor University Hospital, Madrid, Spain



Keywords

Lipid transfer proteins · Pru p 3 · Component-resolved diagnosis · Anaphylaxis · Risk factors

Abstract

Background: Component-resolved diagnosis reveals the IgE response to many inhaled, food, and other allergens, improving the understanding and diagnosis of allergic diseases. **Objective:** The aims of the study are to study the recognition of different lipid transfer proteins (LTPs) and other allergen families in a large group of people sensitized to Pru p 3 and to analyze the relationship between the clinical entities and the allergens. **Methods:** This cross-sectional study included a large cohort of patients with positive skin tests to peach fruit and Pru p 3 specific IgE antibodies. Respiratory and food allergy symptoms were collected, and we performed prick tests with pollen, plant food, and other allergens plus the ImmunoCAP ISAC assay. **Results:** Our sample consisted of 421 people with a mean age of 33.25 years

(range 16–68); 54.6% were women. Clinical entities included anaphylaxis (37.1%), urticaria (67.9%), and oral allergy syndrome (59.1%). Rhinitis, rhinoconjunctivitis, and/or asthma were diagnosed in 71.8% of the participants. The most pronounced correlation existed between sensitization to Pru p 3 and to Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9, and Cor a 8. We found a higher incidence of anaphylaxis in people with 5 or more recognized LTPs. No association was observed between inhaled and food allergies. **Conclusion:** Most Pru p 3-sensitized participants were sensitized to additional allergens from the same family and, to a lesser extent, to other allergens, mainly in the profilin and PR-10 protein families. Anaphylaxis occurred in more than a third of the cases evaluated, and almost three-quarters of them had respiratory symptoms. Respiratory and food allergies involving LTPs do not seem to be associated.

© 2020 S. Karger AG, Basel

Edited by: H.-U. Simon, Bern.

Introduction

Food allergy is increasing, with fruits and tree nuts among the most common source of allergens in adults living in the Mediterranean region [1, 2]. Lipid transfer proteins (LTPs) are one of the protein families most commonly involved [3], and plant allergy due to LTP sensitization is frequently associated with polysensitization, with a variable degree of cross-reactivity between different fruits, plant foods, and pollen. This poses challenges for managing allergies, potentially affecting the quality of life of people who avoid eating several foods.

LTPs are a class of low-molecular-weight, hydrophobic proteins, with highly conserved structures comprising 4 intramolecular disulfide bonds, making them very resistant to proteolysis and harsh food-processing conditions [4, 5]. These are strong allergens that, in most cases, sensitize through the gut and share epitopes with proteins of different sources, including plants and pollen. Peach LTP, Pru p 3, is a primary sensitizer in the Mediterranean area and the most frequent food allergen [1, 2, 6, 7]. Reported cases of LTP allergy are also increasing elsewhere, including in Northern Europe, China, and Japan [8–10]. These publications reflect substantial heterogeneity between geographic areas, so further research is needed to assess local and regional variations. LTPs have also been described in a wide number of pollen like *Ambrosia artemisiifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Platanus acerifolia*, and *Cannabis sativa*, among others. Art v 3 and Pla a 3 can elicit rhinitis in sensitized patients due to a primary sensitization to Pru p 3. In these cases, primary sensitization can occur by the inhalation route [7, 11–13].

Component-resolved diagnosis measures specific IgE (sIgE) against individual allergen molecules (purified native or recombinant), enabling the identification of the patient's recognition profile and potential cross-reactivities. The microarray (ImmunoCAP ISAC) involves a multiplex format, measuring many allergens at once [14], which makes it a high-capacity tool for diagnosing multiple allergens, such as pollen [15, 16] (grass, cypress, olive tree, plane tree, and wall pellitory) and food allergens, including peach and nuts [17, 18].

In this study, we analyze the molecular sensitization profile and clinical entities in a large group of people sensitized to Pru p 3, who were referred to our allergy center. The main aim was to establish the relationship between anaphylaxis and LTP sensitization, although allergens of other well-known families were also considered.

Materials and Methods

Patient Selection

A cross-sectional study was conducted. Our sample was drawn from 2,100 patients, aged 16–90 years, with a history of allergy to food or other allergens and referred to our center from 2015 to 2019. Inclusion criteria were (1) sensitization by skin prick test (SPT) to peach peel (commercialized extract containing 30 µg/mL of Pru p 3 by ALK-Abelló [19]) and (2) a positive sIgE to Pru p 3. Exclusion criteria were not having signed the informed consent, pregnancy, being under 16, and/or having a psychiatric illness.

All patients underwent SPT to pollen, plant food, and other common environmental allergens (see online suppl. Table 1; see www.karger.com/doi/10.1159/000511977 for all online suppl. material); 10 mL of peripheral blood was taken for the in vitro assays. sIgE was carried out with 112 ImmunoCAP ISAC (Phadia; Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). The composition of the array is described elsewhere [20].

In addition to peach LTP (Pru p 3), other LTPs included in the array were Ara h 9, Art v 3, Cor a 8, Jug r 3, Pla a 3, and Tri a 14. Respiratory and IgE-mediated food allergy symptoms were collected, and a questionnaire was implemented as reported [21–23]. All participants signed written informed consent, and the local Ethics Committee approved the study.

Skin Prick Test

A 1-mm-tip, single-use prick lancet (ALK-Abelló) was used to perform SPTs with commercial whole extracts (ALK-Abelló) of common inhalant allergens (grass, mugwort, wall pellitory, pigweed, olive tree, cypress, plane tree, prickly saltwort, birch, dust mites, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, and cat and dog dander), and plant food allergens, which included common nuts (walnut, hazelnut, almond, chestnut, sunflower seed, pine nut, and pistachio) and peanut, following standard protocols [24].

Specific IgE Determination

Sera of all the recruited patients was tested with a microarray immunoassay (ImmunoCAP ISAC), following the manufacturer's protocol [25].

Statistical Analysis as Described

Quantitative variables were expressed as means, medians, and range and qualitative variables by absolute frequencies and percentages. Quantitative variables were analyzed by Student's *t* test and/or Mann-Whitney U test, as appropriate. Associations between explanatory and outcome variables were estimated by calculating the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for quantitative variables and by applying the χ^2 or Fisher's exact test to the qualitative variables. Multivariable logistic regression was performed to determine the association between anaphylaxis and the sensitization to LTPs and the rest of the variables included in the study. The statistical software used was SPSS v.24.

Results

Of the 2,100 patients evaluated, we included 421 who were sensitized to Pru p 3: 93.0% reported food allergy, 71.5% also experienced respiratory symptoms, and 6.9%

Table 1. Prevalence of LTPs in our group ($N = 421$) with the analysis of reciprocal relationships between Pru p 3 and the nsLTPs studied

Allergen species	LTP	Prevalence of sensitization (n)	Pru p 3 correlation (p value)
<i>Prunus persica</i>	Pru p 3	100.0% (421)	
<i>Juglans regia</i>	Jug r 3	83.1% (350)	0.849** (<0.01)
<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 3	73.0% (307)	0.761** (<0.01)
<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 9	71.5% (301)	0.718** (<0.01)
<i>Corylus avellana</i>	Cor a 8	64.4% (271)	0.625** (<0.01)
<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 3	62.0% (261)	0.501** (<0.01)
<i>Olea europaea</i>	Ole e 7	25.0% (105)	0.166** (<0.01)
<i>Triticum aestivum</i>	Tri a 14	13.5% (57)	0.364** (<0.01)
<i>Parietaria judaica</i>	Par j 2	6.2% (26)	0.057** (<0.01)

Pearson's correlation coefficient values are shown for paired molecular allergens. A correlation coefficient of 0.7–1 indicates a strong positive association (bold), and of 0.3–0.7, a moderate positive association. LTP, lipid transfer protein. ** The correlation is significant at the 0.01 level (two-tailed).

were asymptomatic. In line with the inclusion criteria, all patients had a positive SPT to peach peel and a positive in vitro sIgE to Pru p 3.

Participants' mean age was 33.25 years (range 16–68; median 32), and 54.6% were women. No significant differences were observed in the LTP IgE recognition between genders. A family history of atopy was reported in 71% of the cases. We observed no significant association between the size of the wheal in the SPT with peach peel and the presence of anaphylaxis.

Plant Food and Pollen Sensitization

SPT Sensitization Profile

All the recruited patients underwent SPT to plant food allergens, including the most relevant tree nuts in our area. The most prevalent was peanut (81% positive), followed by walnut and hazelnut. The least prevalent was pine nut, which was positive in just 14% of the cases (online suppl. Table 2).

Regarding SPT to pollen, the most prevalent was olive tree, followed by mugwort, grass, pigweed, and *Salsola kali*. Three-quarters of participants (74%) were sensitized to 2 or more kinds of pollen, and only 10.5% were mono-sensitized (online suppl. Table 3).

Molecular Allergen Sensitization Profile

When we analyzed the sensitization to the different LTPs included in the microarray, the most prevalent

was Jug r 3, which was positive in 83% of the cases, followed by Pla a 3 (73%) and Ara h 9 (71%). Par j 2 was positive in just 6.2% of the participants (Table 1). We observed a strong positive correlation between Pru p 3 and Jug r 3, Pla a 3, and Ara h 9. There was no positive correlation with Ole e 7, Par j 2, or Tri a 14 (online suppl. Table 4).

With respect to the other families of allergens represented in the microarray, 7.6% of the patients were sensitized to at least one of the included profilins: Hev b 8, Mer a 1, Bet v 2, and/or Phl p 12. Of this group, 70% were sensitized to 4 or more profilins. In addition, 4.8% of the patients were sensitized to at least one of the PR-10 included in the microarray: Mal d 1, Pru p 1, Bet v 1, Aln g 1, Act d 8, Ara h 8, and Gly m 4; similarly to the profilins, 70% were sensitized to 4 or more PR-10. The group of polcalcins showed the lowest in prevalence (sensitization of 4%), including Bet v 4 and Phl p 7; 82% (14/17 patients) were sensitized to both.

Relationship between Food Allergy and Respiratory Symptoms

Participants were categorized into 4 groups by clinical entities: group A, anaphylaxis (37.1% of the cases); group B, urticaria (67.9%); group C, oral allergy syndrome (59.1%); and group D, no food allergy symptoms (6.9%). There were no statistically significant differences between the levels of sIgE among the 4 groups ($p > 0.05$ in all cases). There was no association between these entities and rhinitis, rhinoconjunctivitis, and/or asthma.

A small proportion presented eosinophilic esophagitis (2.1%) or only gastrointestinal symptoms (<2%). Additionally, 71.5% had rhinitis or rhinoconjunctivitis, and 29.7%, asthma.

Of the total study sample, 62% were sensitized to Art v 3, with only 11% of these simultaneously recognizing Art v 1. Regarding Pla a 3, 73% were sensitized, with concomitant reactivity to Pla a 1 or Pla a 2 in just 21% of them.

Risk of Anaphylaxis

The risk of anaphylaxis increased in people sensitized to Ara h 9 ($p = 0.003$) or Pla a 3 ($p = 0.010$) (Table 2) and in those with 5 or more LTP sensitizations ($p < 0.001$, OR 2.19, 95% CI 1.43–3.37). The frequency of anaphylaxis was significantly lower in those presenting 2 or fewer LTP reactivities ($p = 0.04$, OR 0.39, 95% CI 0.16–0.98) (online suppl. Table 4; online suppl. Fig. 1). Interestingly, almost half of the patients were positive to 6 LTPs (including, in addition to Pru p 3, Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9, Cor a 8, and Art v 3) (Fig. 1). Sensitization to Tri a 14, Ole e 7, and/or

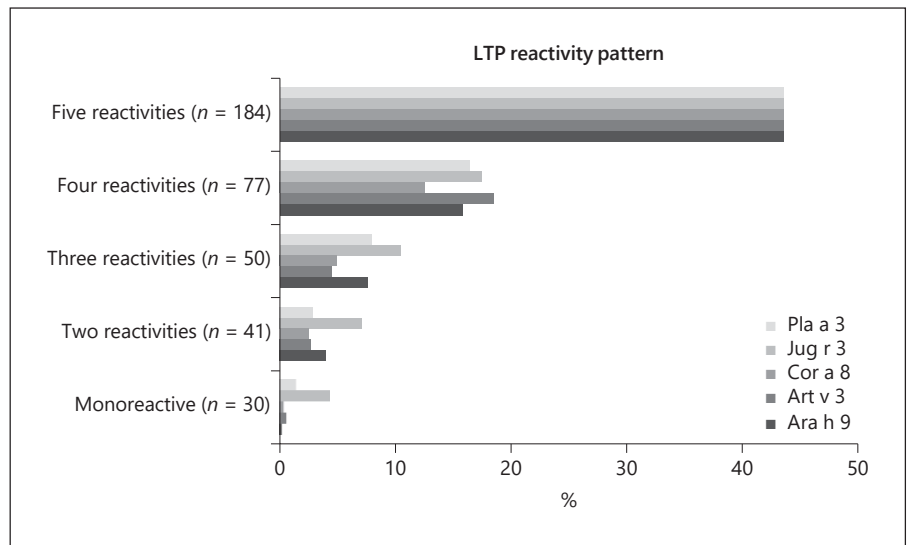


Fig. 1. Prevalence of LTP reactivity. All participants were sensitized to Pru p 3 (9.3% monoreactive). LTP, lipid transfer protein.

Table 2. Association between explanatory variables and anaphylaxis

Variable	<i>B</i>	Standard error	Wald	df	<i>p</i> value	OR	95% CI	
Female	-0.033	0.338	0.009	1	0.92	0.97	0.50	1.88
Family history of atopy	0.081	0.361	0.051	1	0.82	1.09	0.54	2.20
Age	0.014	0.015	0.823	1	0.36	1.01	0.98	1.05
Rhinitis	0.278	0.395	0.495	1	0.48	1.32	0.61	2.87
Asthma	0.316	0.382	0.687	1	0.41	1.37	0.65	2.90
Peanut	0.103	0.062	2.794	1	0.095	1.11	0.98	1.25
Walnut	0.085	0.065	1.698	1	0.19	1.09	0.96	1.24
Sunflower seed	0.023	0.052	0.198	1	0.66	1.02	0.92	1.13
Hazelnut	-0.011	0.060	0.035	1	0.85	0.99	0.88	1.11
Almond	-0.019	0.060	0.100	1	0.75	0.98	0.87	1.10
Ara h 2	0.242	0.323	0.558	1	0.46	1.27	0.68	2.40
Ara h 9	0.227	0.077	8.580	1	0.003	1.26	1.08	1.46
Pla a 3	0.140	0.054	6.658	1	0.010	1.15	1.03	1.28
Tri a 14	0.128	0.150	0.723	1	0.40	1.14	0.85	1.53
Ole e 7	-0.073	0.043	2.907	1	0.088	0.93	0.86	1.01
Art v 3	-0.085	0.061	1.950	1	0.16	0.92	0.82	1.04
Phl p 12	-0.135	0.230	0.345	1	0.56	0.87	0.56	1.37
Pru p 1	-2.256	1.457	2.398	1	0.12	0.11	0.01	1.82

CI, confidence interval; df, degrees of freedom; OR, odds ratio. The statistical models used, Hosmer and Lemeshow test and the area under the ROC curve, are considered adequate if $p > 0.05$ and $p < 0.05$, respectively, as occurred in our results. The risk of anaphylaxis is higher when $OR > 1$ (bold).

Par j 2 were not included in this association because none of them significantly augmented the risk of anaphylaxis.

When we looked at the relationship between SPT to pollen and different clinical entities, the proportion of anaphylaxis in people sensitized to pollen was 37%, similar to cases that were negative in the pollen SPT (36%).

Although the percentage of anaphylaxis was lower in participants sensitized to profilin and/or PR-10 (28 and 25%, respectively), the difference was not statistically significant. Presenting sensitization to polcalcin Bet v 4 was significantly associated with a lower risk of anaphylaxis ($p < 0.05$).

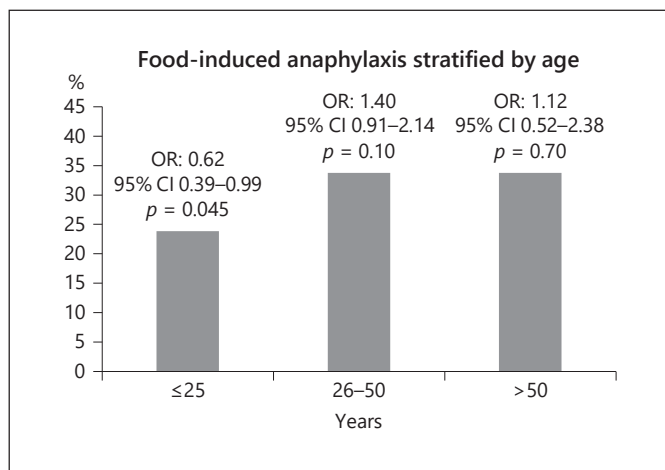


Fig. 2. Prevalence of food-induced anaphylaxis stratified by age in our Pru p 3-sensitized group. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

We also observed a lower incidence of anaphylaxis in participants aged 25 or younger (Fig. 2). However, there were no significant differences between the mean values of sIgE to Pru p 3 in patients younger versus older than 25 years (4.76 vs. 4.74 ISU, respectively).

Discussion

Our aim was to evaluate the relationship between anaphylaxis and IgE response in a large group of people sensitized to Pru p 3, analyzing the clinical entities reported by the patients, the sensitization to other molecular components included in the microarray 112 ImmunoCAP ISAC (Phadia; Thermo Fisher Scientific), and the relationship between food and inhaled allergens. Our results show a similar pattern of sensitization as in other studies [2], although artemisia and plane tree showed higher positive values than expected.

We did not observe any relationship between the skin test response to peach or other food allergens and anaphylaxis or other patient-reported symptoms, as reported elsewhere [26, 27]. Although the most frequent entity in our group was urticaria, occurring in 67.9% of the cases, anaphylaxis occurred in more than a third of the cases. Only a minority of participants sensitized to Pru p 3 tolerated peach fruit. When food allergy symptoms were compared between participants grouped according to respiratory allergies, no significant differences were observed; these findings are consistent with previous studies

[28–30]. Thus, although food and respiratory allergies are entities that occur in atopic patients and can be interrelated [31, 32], in our LTP-sensitized group, they appeared to be independent phenomena.

In our study, the most prevalent LTP after Pru p 3 was Jug r 3, followed by Pla a 3, Ara h 9, and Cor a 8; the least recognized were Ole e 7, Tri a 14, and Par j 2. The LTP profile observed in our population was similar to that published in other studies in the Mediterranean area and elsewhere [8–10, 12, 28, 33–38]. In our region, walnut is widely consumed, and it is possible that some of our patients were primarily sensitized to Jug r 3 instead of Pru p 3. Compared to Ara h 9, the prevalence of sensitization to Ara h 1 and Ara h 3 was low (2%), indicating that Ara h 9 was the most important component involved in peanut sensitization in our area, as also reported by Vereda et al. [36] in peanut-allergic patients. In fact, in these cases, the primary sensitizer appears to be Pru p 3, with people responding to Ara h 9 due to cross-reactivity [35, 36]. Although the presence of plane tree sensitization was not high in our population, Pla a 3 was the third most prevalent LTP; cross-reactivity is the probable explanation. In our sample, we believe that Pru p 3 acts as the primary allergen, and responses to Pla a 3 are due to cross-sensitization. In fact, Pla a 3 was significantly associated with anaphylaxis. It has also been linked to severe food reactions, and together with Art v 3, to respiratory symptoms in LTP-allergic individuals [37, 38]. Our results showed no significant association between Pru p 3 and Ole e 7 or Par j 2, thus confirming the observations in other studies [8, 28, 39] and supporting the lack of cross-reactivity between peach LTP and those pollen LTPs. We considered that the high prevalence of sensitization to Ole e 7 in our population could just be due to the sensitization to olive tree pollen, as this allergen is the most frequently recognized after Ole e 1 [40].

The association between sensitization to Ara h 9 or Pla a 3 and anaphylaxis was significant. Scala et al. [28] reported that people who reacted to >5 LTPs experienced a greater number of food-induced systemic reactions. This finding was replicated in our cohort. Interestingly, more than half of the patients were positive to 5 or more LTPs (including Pru p 3, Jug r 3, Pla a 3, Ara h 9, Cor a 8, and Art v 3). With this in mind, 261 patients of our study group were immune-reactive to 5 or more LTP molecules studied, likely reflecting a degree of common epitope recognition.

The amino acidic sequence homology with Pru p 3 among the different LTPs included in the array is as follows: Jug r 3 (65%), Ara h 9 (62%), Cor a 8 (60%), Art v 3

(51%), Pla a 3 (46%), and Tri a 14 (47%). Pollen LTPs Ole e 7 and Par j 2 present <35% of sequence identity with Pru p 3 [41]. From our data, we hypothesize that Ara h 9, Cor a 8, and Jug r 3, with corresponding amino acid sequence identities, are associated, alongside with Pru p 3, with plant food-pollen sensitization [30].

Most of the profilin-sensitized patients recognized 2 or more profilins, including those that were not relevant in our population, reinforcing the concept that this is a pan-allergen that cross-reacts with the other members of this family. In this study, we found that sensitization to Pru p 1, a PR-10 protein, or Phl p 12, a profilin, was negatively associated with the development of anaphylaxis; however, it was not statistically significant. Although some studies found that sensitization to Pru p 1, Pru p 4, or Phl p 12 was associated with a lower probability of anaphylaxis [11, 42], we could not confirm this finding. However, all of these studies come from Northern or Central European countries [30, 43], where sensitization to these allergens is much higher than in Southern Europe [44, 45].

One limitation of this study is that the cases were selected based on diagnosis of LTP allergy, which was made through clinical history and sIgE test to Pru p 3 rather than on food challenge. Another limitation is that other common allergenic foods may be also involved in our population, like apples, oranges, cabbage, and mustard, which do not have the corresponding LTP representative in the array. Palacin has shown that LTPs of these allergens, as well as others, are relevant in inducing sensitization [46].

We conclude that, in our study group, one-third of the people sensitized to Pru p 3 developed anaphylaxis. Sensitization to 5 or more LTPs was a predictor (risk factor) of anaphylaxis. Our data suggest that there is no association between LTP sensitization and respiratory symptoms.

Acknowledgement

The authors gratefully thank Meggan Harris for excellent technical assistance.

Statement of Ethics

This study was approved by the Ethics Committee of Alicante and was conducted according to the Declaration of Helsinki, good clinical practice, and local regulations.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This project was supported by Grant of Instituto Salud Carlos III (PI17/000615), IPs Miguel Blanca and Maria Luisa Somoza, FEDER. Allergy Service, Hospital Infanta Leonor, Madrid, Spain, and the Network Aradyal (Instituto Salud Carlos III).

Author Contributions

Maria Ruano-Zaragoza has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. Teodorikez Wilcox Jiménez-Rodríguez has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

Victor Soriano-Gomis has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. Angel Esteban-Rodriguez has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

Antonio Palazón-Bru has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. Purificación González-Delgado has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

Miguel Blanca has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. Javier Fernández-Sánchez has made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data and has been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

References

- 1 Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1210–19.e4.
- 2 Fernandez Rivas M. Food allergy in alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(S2):37–44.

- 3 Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(9):1336–41.
- 4 Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, et al. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):473–80.
- 5 Clare Mills EN, Gao C, Wilde PJ, Rigby NM, Wijesinha-Bettoni R, Johnson VE, et al. Partially folded forms of barley lipid transfer protein are more surface active. *Biochemistry*. 2009;48(51):12081–8.
- 6 Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1529–39.
- 7 Zuidmeer L, Van Ree R. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(3):269–73.
- 8 Skypala IJ, Cecchi L, Shamji MH, Scala E, Till S. Lipid transfer protein allergy in the United Kingdom: characterization and comparison with a matched Italian cohort. *Allergy*. 2019;74(7):1340–51.
- 9 Mothes-Luksch N, Raith M, Stingl G, Focke-Tejkl M, Razzazi-Fazeli E, Ziegelmayer R, et al. Pru p 3, a marker allergen for lipid transfer protein sensitization also in Central Europe. *Allergy*. 2017;72(9):1415–8.
- 10 Deng S, Yin J. Mugwort pollen-related food allergy: lipid transfer protein sensitization and correlation with the severity of allergic reactions in a Chinese population. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2019;11(1):116–28.
- 11 Sánchez-López J, Tordesillas L, Pascal M, Muñoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, et al. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1018–25.
- 12 Wangorsch A, Larsson H, Messmer M, Garcia-Moral A, Lauer I, Wolfheimer S, et al. Molecular cloning of plane pollen allergen Pla a 3 and its utility as diagnostic marker for peach associated plane pollen allergy. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(5):764–74.
- 13 Sánchez-López J, Asturias JA, Enrique E, Suárez-Cervera M, Bartra J. Cupressus arizonica pollen: a new pollen involved in the lipid transfer protein syndrome? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(7):522–6.
- 14 Shreffler WG. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(4):843–1.
- 15 García BE, Martínez-Aranguren R, Bernard Alonso A, Gamboa P, Feo Brito F, Bartra J, et al. Is the ISAC 112 microarray useful in the diagnosis of pollinosis in Spain? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(2):92–9.
- 16 Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Musap M, Passalacqua G, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem*. 2011;44(12):1005–11.
- 17 D'Amelio CM, Goikoetxea MJ, Martínez-Aranguren R, García BE, Gómez F, Fernández J, et al. Is the performance of ImmunoCAP ISAC 112 sufficient to diagnose peach and apple allergies? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016;116(2):162–3.
- 18 Goikoetxea MJ, D'Amelio CM, Martínez-Aranguren R, Gamboa P, García BE, Gómez F, et al. Is microarray analysis really useful and sufficient to diagnose nut allergy in the Mediterranean area? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(1):31–9.
- 19 Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, García-Casado G, et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec;1850(26):7738–41.
- 20 ThermoFisher Scientific Product Catalog 2018. Available from: <http://www.phadia.com/Global/A%20Document%20Library/Product%20Catalogues/Product-Catalog-2018.pdf>.
- 21 EAACI Global Atlas on Asthma. <http://www.eaaci.org/attachments/Global%20Atlas%20of%20Asthma.pdf> [Internet]. 2015. Available from: <http://www.eaaci.org/attachments/GlobalAtlasofAsthma.pdf>.
- 22 Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis. <http://eaaci.org/resources/scientific-output/global-atlas-of-allergic-rhinitis-and-chronic-rhinosinusitis.html> [Internet]. 2015. Available from: http://eaaci.org/globalatlas/ENT_Atlas_web.pdf.
- 23 Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008–25.
- 24 Position paper: allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 1993;48(14 Suppl):48–82.
- 25 Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1443–9.
- 26 Simola M, Malmberg H. Nasal histamine reactivity: relationships to skin-test responses, allergen provocation and symptom severity in patients with long-continuing allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol*. 2000;120(1):67–71.
- 27 Ta V, Weldon B, Yu G, Humblet O, Neale-May S, Nadeau K. Use of specific IgE and skin prick test to determine clinical reaction severity. *Br J Med Med Res*. 2011;1(4):410–29.
- 28 Scala E, Till SJ, Asero R, Abeni D, Guerra EC, Pirrotta L, et al. Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy*. 2015;70(8):933–43.
- 29 Dubost R, Ruet N, Deviller P. [Incidence of sensitization to profilin in a population allergic to pollen: responsibility of profilin in pollen polysensitizations in patients with a normal level of total IgE]. *Allerg Immunol*. 2000;32(5):199–206.
- 30 Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(4):379–85.
- 31 Vega F, Panizo C, Dordal MT, González ML, Velázquez E, Valero A, et al. Relationship between respiratory and food allergy and evaluation of preventive measures. *Allergol Immunopathol*. 2016;44(3):263–75.
- 32 Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):798–806.e13.
- 33 Rodrigues-Alves R, Lopez A, Pereira-Santos MC, Lopes-Silva S, Spínola-Santos A, Costa C, et al. Clinical, anamnestic and serological features of peach allergy in Portugal. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149(1):65–73.
- 34 Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, Uytendaele A, Sabato V, Hagendorens MM, et al. IgE-reactivity profiles to nonspecific lipid transfer proteins in a northwestern European country. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):679–82.e5.
- 35 Javaloyes G, Goikoetxea MJ, García Nuñez I, Aranda A, Sanz ML, Blanca M, et al. Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1432–4.e3.
- 36 Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, Ibañez MD, Cuesta-Herranz J, van Odijk J, et al. Peanut allergy: clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):603–7.
- 37 Gao ZS, Yang ZW, Wu SD, Wang HY, Liu ML, Mao WL, et al. Peach allergy in China: a dominant role for mugwort pollen lipid transfer protein as a primary sensitizer. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):224–3.
- 38 Van Winkle RC, Chang C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;46(3):211–24.
- 39 Tordesillas L, Sirvent S, Díaz-Perales A, Vilalba M, Cuesta-Herranz J, Rodríguez R, et al. Plant lipid transfer protein allergens: nocross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(3):291–6.

- 40 Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M, et al. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(Suppl 1):11–6.
- 41 Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.
- 42 Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Mascheri A, Borgonovo L, et al. Pru p 3-sensitized Italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presenting IgE antibodies to Pru p 1 and Pru p 4. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(4):362–72.
- 43 Asero R, Piantanida M, Pravettoni V. Allergy to LTP: to eat or not to eat sensitizing foods? A follow-up study. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2018;50(4):156–62.
- 44 Uasuf CG, Villalta D, Conte ME, Di Sano C, Barrale M, Cantisano V, et al. Different co-sensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients. *Clin Mol Allergy*. 2015;13:30.
- 45 Andersen MB, Hall S, Dragsted LO. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(1):4–19.
- 46 Palacín A, Gómez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7:e50799.



Anexo 2.

Anexo 2a. Segunda publicación: Ruano-Zaragoza M, Casas-Saucedo R, De la Cruz Martínez CA, Araujo-Sanchez G, Gelis S, Gonzalez MF, San Bartolomé C, Pascal M, Jiménez-Rodríguez TW, Gonzalez-Delgado P, Fernandez-Sanchez J, Muñoz-Cano R, Bartra J. Advances in the understanding of the cofactor effect in LTP food allergy: from phenotype description to clinical management. *Allergy*. 2022. DOI: 10.1111/all.15291.



Advances in the understanding of the *cofactor effect* in LTP food allergy: From phenotype description to clinical management

To the Editor,

Cofactors may explain why in some cases food ingestion leads to anaphylaxis while in others elicits a milder reaction/tolerance.^{1,2} Cofactors have also been related to a complex food allergy (FA) phenotype such

as Lipid Transfer Protein (LTP)-FA,³ although limited data regarding the epidemiology and clinical profile of these patients are available.

Five hundred and twenty-eight peach nsLTP (Pru p 3)-sensitized adult patients (Pru p 3 specific IgE (sIgE) ≥ 0.10 kU/L (ImmunoCAP®),

TABLE 1 Clinical characteristics

	Cofactor group (194 patients)	Non-cofactor group (302 patients)	p value
Female n (%)	129 (66.5)	174 (57.6)	.04
Age (years)	40.8 \pm 11.6	41.8 \pm 11.6	ns
Age at food allergy onset (years)	27 \pm 17.6	16.1 \pm 11.7	.001
Rhinitis (%)	150 (77.3)	250 (82.8)	.017
Asthma (%)	50 (25.8)	110 (36.4)	.002
Sensitization:			
Pollen ^a (%)	133 (68.6)	221 (73.2)	ns
Dust mites (%)	95 (49)	165 (54.6)	ns
Dog/cat (%)	57 (29.4)	101 (33.5)	ns
Fungi (%)	11 (5.7)	38 (18.9)	ns
Pru p 3 skin-prick test (%)	194 (100)	302 (100)	N/A
PR-10 (Pru p 1, %) ^b	0 (0)	0 (0)	N/A
Profilin (Pru p 4, %) ^b	15 (7.7)	16 (5.3)	ns
Total IgE (kU/L)	241.5 \pm 343.4	293.4 \pm 483.7	ns
Peach sIgE (kU/L)	7.3 \pm 10	7.0 \pm 9.7	ns
Pru p 3 sIgE (kU/L)	10.2 \pm 16.2	7.7 \pm 10.9	ns
Pru p 3/peach	1.3 \pm 0.9	1.3 \pm 1.1	ns
Pru p 3/tIgE	0.08 \pm 0.1	0.05 \pm 0.7	<.001
Local reactions (%)			
OAS	N/A ^c	61 (20.2)	N/A
Gastrointestinal symptoms		16 (5.3)	
Contact urticaria		28 (9.3)	
Systemic reactions:			
Grade 1: mild (%)	54 (36.5)	94 (63.5)	<.001
Grade 2: moderate (%)	118 (55.1)	96 (44.9)	<.02
Grade 3: severe (%)	22 (75.9)	7 (24.1)	.003

Note: A p value <.05 was considered statistically significant.

Values are expressed as mean \pm standard deviation.

Abbreviations: N/A, non-applicable; ns, non-statistically significant.

^aPollen sensitization includes plane tree, grass, mugwort, olive tree, wall pellitory, and cypress.

^b Profilin sensitization was analyzed by positive sIgE to Pru p 4. PR-10 sensitization was analyzed by positive sIgE to Pru p 1. Positive results were considered ≥ 0.10 kU/L.

^c All patients in CG had a systemic reaction.

TABLE 2 Foods involved in systemic reactions in cofactor and non-cofactor patients

	Cofactor group (194 patients)			Non-cofactor group (197 patients)			p value*
	Nº of patients (%)	Nº of reactions	Mean reactions per patient	Nº of patients (%)	Nº of reactions	Mean reactions per patient	
Plant-food mix ^a	147 (75.8)	245	1.7	71 (36.6)	88	1.2	<.0001
Nuts	59 (30.4)	94	1.6	84 (43.3)	131	1.6	.01
Peach	56 (28.9)	63	1.1	68 (35.1)	76	1.1	ns
Rosaceae ^b	53 (27.3)	68	1.3	32 (16.5)	44	1.4	.008
Other fruits	32 (16.5)	36	1.1	41 (21.1)	59	1.4	ns
Other vegetables	29 (14.9)	44	1.5	23 (11.9)	31	1.3	ns
Lettuce	23 (11.9)	24	1.0	11 (5.7)	13	1.2	.03
Seeds	15 (7.7)	16	1.1	17 (8.8)	17	1	ns
Cereals	14 (7.2)	16	1.1	12 (6.2)	17	1.4	ns
Other plant-food	4 (2.1)	4	1	2 (1)	3	1.5	ns

Note: Foods were depicted in order of frequency of involvement: Plant-food mix; Nuts (walnut, hazelnut, peanut, almond, cashew, pistachio, chestnut, or a combination of nuts); Peach; Rosaceae (apple, pear, plum, cherry, strawberry, nectarine, apricot); Other fruits (kiwi, banana, grape, melon, pineapple, watermelon, orange); Lettuce; Cereals (wheat, corn, rice, oats); Seeds (sunflower seed, mustard, soy); Other vegetables (tomato, green bean, lentils, chickpeas, peas, zucchini, mushroom). 'Other plant food' included: honey, cocoa, peppers, parsley, lemon verbena, pepper, or cinnamon.

Abbreviation: ns, non-statistically significant.

^aPlant-food mix: reactions where several LTP-containing plant foods were involved, but no a particular food was identified as a single trigger.

^bRosaceae: other Rosaceae apart from peach.

*p value has been calculated comparing the number of patients reacting with each food group using the Chi² test. A p value <.05 was considered statistically significant.

ThermoFisher Scientific) were selected and grouped according to the presence of cofactor (physical exercise, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), alcohol, menstruation and/or sleep deprivation). 194 (37%) patients were included in the cofactor group (CG) and 302 (57%) in the non-cofactor group (NCG). Thirty-two (6%) patients were asymptomatic, and therefore, were not included in any of the groups. All patients had a positive peach LTP skin-prick test. (Detailed methods-Supplementary Material).

Cofactor group had more women (66.5% vs. 57.6%; $p = .04$), a later disease onset (27 vs. 16.1 years; $p = .001$) and a higher Pru p 3 sIgE/tIgE ratio (0.08 ± 0.1 vs. 0.05 ± 0.7 ; $p < .001$) (Table 1).

In the overall cohort, 391 patients had a history of at least one systemic reaction (SR). Considering only the most severe reaction experienced by each patient, 29 (5.5%) suffered grade 3, 214 (40.5%) grade 2, and 148 (28%) grade 1 reactions.⁴ Considering only patients with SR, CG showed a higher risk of either a G2 or G3 (OR 1.97; $p < .05$) and G3 reactions (OR 3.5; $p = .003$) compared with NCG (Table 1). Plant-food mix (55.8%), nuts (36.6%), and peach (31.7%) were the most frequent culprit foods (Figure S2). Among nuts, walnut (25%), peanut (18%), hazelnut (16%), and almond (8%) were the most frequent. Indeed, when comparing both groups, plant-food mix was significantly more involved in CG, as well as lettuce and other Rosaceae fruits apart from peach (Figure S2 and Table 2).

Noteworthy, 185 out of 194 patients in CG presented reactions both with and without cofactors, related to different foods

(Table S3). Interestingly, cofactor-induced reactions were more severe (G2 and G3) than non-cofactor ones (OR 3.2; $p < .001$). Exercise (41.7%) and NSAIDs (37.8%) were the most frequent cofactors and cofactor type did not correlate with reaction severity (Figure S1).

In summary, patients with cofactor-related reactions are mostly female, with a delayed onset of disease and a higher Pru p 3 sIgE/tIgE ratio. So far, sIgE levels in LTP allergy have not been correlated with severity,⁵ and there is no data regarding the relevance of the ratios. Female predominance in the CG may be related to hormone factors; estrogen levels have been related to higher risk of anaphylaxis.² Indeed, NSAID intake to control menstrual pain is a frequent practice that may explain the frequent involvement of these drugs in our series.

We have also shown that the same patient may have a systemic reaction both with and without a cofactor. Thus, the cofactor effect may not depend on the intrinsic characteristic of the individuals and may be considered a potential universal effect, as also shown in the wheat allergy model.⁶ In our study, cofactor-related reactions were also more severe, and as far as we know, this is the first description in LTP-FA.

Plant-food mix was the group most frequently involved in SR, meaning that a mix of different plant-foods was consumed in the same meal, most of them containing LTP.³ Thus, it was not possible to identify whether the trigger was just one of the plant-foods, or the cumulative dose of LTPs from different sources.

In conclusion, more than 30% of the LTP-sensitized patients of this large cohort have cofactor-related reactions, frequently severe, although the individual culprits cannot usually be identified. Thus, dietary advice is extremely complicated, leaving the patients at high risk of developing anaphylaxis. This observation may suggest that, following the guidelines,¹ the prescription of adrenaline autoinjectors may be based not only on the history of a previous anaphylaxis, but also on a previous mild-to-moderate reaction to foods known to

be associated with anaphylaxis in the patient's region, which in ours, is any LTP-containing food.

KEY WORDS

anaphylaxis, cofactor, lipid transfer protein, Pru p 3, risk factors

ACKNOWLEDGEMENTS

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

Maria Ruano-Zaragoza^{1,2,3} 

Rocío Casas-Saucedo^{1,2,3}

Cynthia Aracelis De la Cruz Martínez¹

Giovanna Araujo-Sanchez^{1,2,3}

Sonia Gelis^{1,2}


Maria Fernanda González^{1,2}

Clara San Bartolomé^{2,3,4}

Mariona Pascal^{2,3,4} 

Teodorikez Wilfox Jiménez-Rodríguez^{3,5,6} 

Purificación Gonzalez-Delgado^{3,5,6} 

Javier Fernandez-Sanchez^{3,5,6}  Rosa

Muñoz-Cano^{1,2,3} 

Joan Bartra^{1,2,3} 

¹Allergy Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

²Clinical & Experimental Respiratory Immunology, Institut Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

³Asma, Reacciones Adversas y Alergia (ARADyAL), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴Immunology Department, Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB), Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Allergy Section, Alicante University Hospital, Alicante, Spain

⁶UMH-ISABIAL, Alicante University Hospital, Alicante, Spain

Correspondence

Rosa Muñoz-Cano, Allergy Department, Hospital Clinic, C. de Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.


Email: rmunoz@clinic.cat

Rosa Muñoz-Cano and Joan Bartra contributed equally to this work.

ORCID

Maria Ruano-Zaragoza  <https://orcid.org/0000-0002-5847-7480>

Mariona Pascal  <https://orcid.org/0000-0003-0549-9720>

Teodorikez Wilfox Jiménez-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0002-4341-0507>

Purificación Gonzalez-Delgado  <https://orcid.org/0000-0002-1192-8475>

Javier Fernandez-Sanchez  <https://orcid.org/0000-0003-1065-7199>

Rosa Muñoz-Cano  <https://orcid.org/0000-0001-8566-8285>

Joan Bartra  <https://orcid.org/0000-0001-7767-4730>

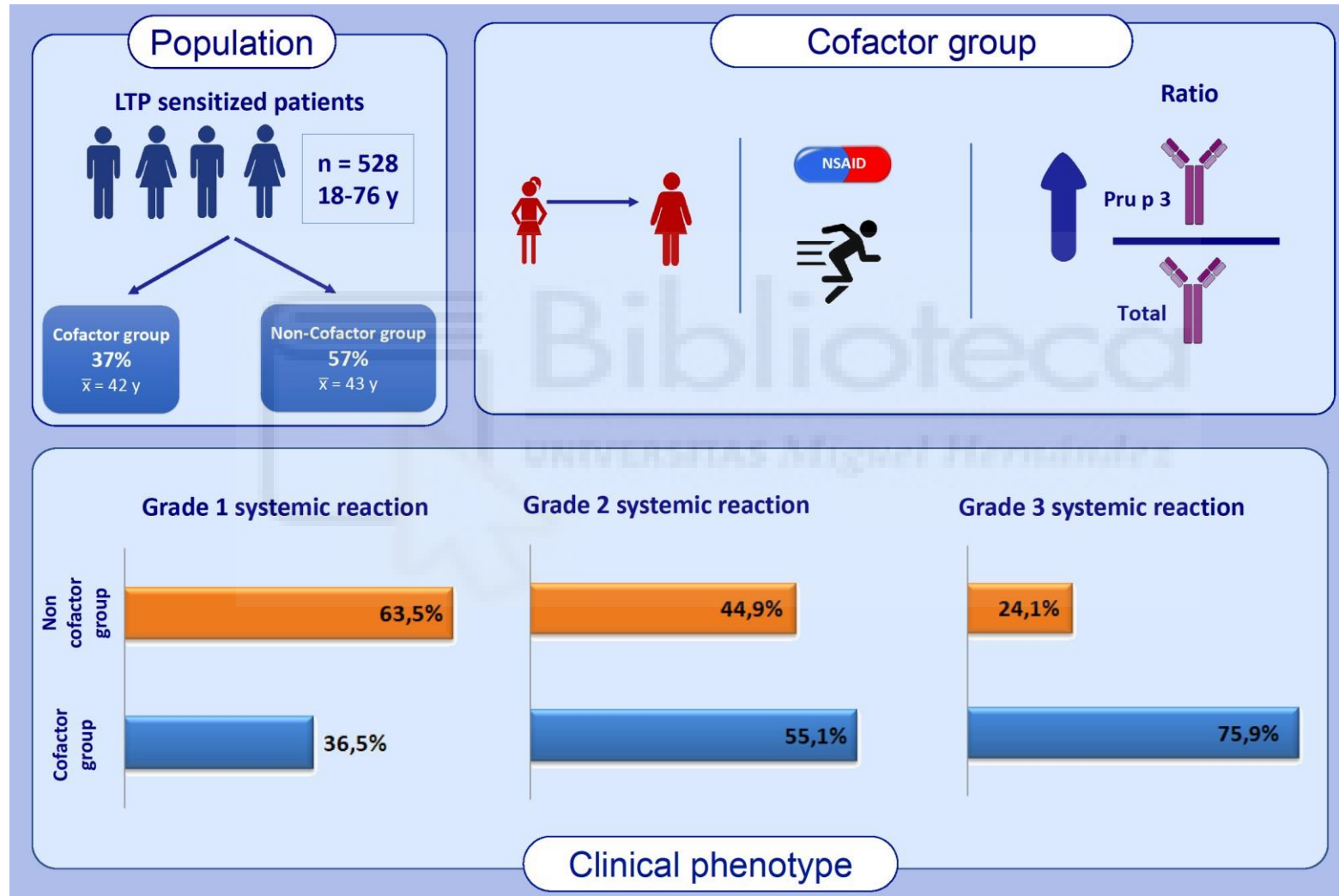
REFERENCES

1. Muraro A, Worm M, Alviani C, et al. EAACI guidelines: anaphylaxis (2021 update). *Allergy*. 2022;77(2):357-377. doi: 10.1111/all.15032
2. Muñoz-Cano R, San Bartolome C, Casas-Saucedo R, et al. Immune-mediated mechanisms in cofactor-dependent food allergy and anaphylaxis: effect of cofactors in basophils and mast cells. *Front Immunol*. 2021;17(11). doi:10.3389/fimmu.2020.623071
3. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1529-1539. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.04071.x
4. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(2):371-376. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.029
5. Novembre E, Mori F, Contestabile S, Rossi ME, Pucci N. Correlation of anti-Pru p 3 IgE levels with severity of peach allergy reactions in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(4):271-274. doi:10.1016/j.ana.2012.02.006
6. Christensen MJ, Eller E, Mortz CG, et al. Wheat-dependent cofactor-augmented anaphylaxis: a prospective study of exercise, aspirin, and alcohol efficacy as cofactors. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(1):114-121. doi:10.1016/j.jaip.2018.06.018

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

Anexo 2b. Resumen gráfico del artículo enviado a la revista



Anexo 3.

Anexo 3a. Lista detallada de los 112 alérgenos (y su función proteica) incluidos en la micromatriz ImmunoCAP-ISAC 112® (PHADIA, *ThermoFisher Scientific*, Uppsala, Suecia).

ImmunoCAP ISAC 112 Allergen Components			
Allergen component	Allergen source COMMON NAME	LATIN NAME	PROTEIN GROUP
Food Allergens			
nGal d 1	Egg white	<i>Gallus domesticus</i>	Ovomucoid
nGal d 2	Egg white	<i>Gallus domesticus</i>	Ovalbumin
nGal d 3	Egg white	<i>Gallus domesticus</i>	Conalbumin/Ovotransferrin
nGal d 5	Egg yolk/chicken meat	<i>Gallus domesticus</i>	Livetin/Serum albumin
nBos d 4	Cow's milk	<i>Bos domesticus</i>	Alpha-lactalbumin
nBos d 5	Cow's milk	<i>Bos domesticus</i>	Beta-lactoglobulin
nBos d 6	Cow's milk and meat	<i>Bos domesticus</i>	Serum albumin
nBos d 8	Cow's milk	<i>Bos domesticus</i>	Casein
nBos d lactoferrin	Cow's milk	<i>Bos domesticus</i>	Transferrin
rGad c 1	Cod	<i>Gadus callarias</i>	Parvalbumin
nPen m 1	Shrimp	<i>Penaeus monodon</i>	Tropomyosin
nPen m 2	Shrimp	<i>Penaeus monodon</i>	Arginine kinase
nPen m 4	Shrimp	<i>Penaeus monodon</i>	Sarcoplasmic Ca-binding protein
rAna o 2	Cashew nut	<i>Anacardium occidentale</i>	Storage protein, 11S globulin
rBer e 1	Brazil nut	<i>Bertholletia excelsa</i>	Storage protein, 2S albumin
rCor a 1.0401	Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	PR-10 protein
rCor a 8	Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
nCor a 9	Hazelnut	<i>Corylus avellana</i>	Storage protein, 11S globulin
nJug r 1	Walnut	<i>Juglans regia</i>	Storage protein, 2S albumin
nJug r 2	Walnut	<i>Juglans regia</i>	Storage protein, 7S globulin
nJug r 3	Walnut	<i>Juglans regia</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
nSes i 1	Sesame seed	<i>Sesamum indicum</i>	Storage protein, 2S albumin

ImmunoCAP ISAC 112 Allergen Components, con't

Allergen component	Allergen source COMMON NAME	LATIN NAME	PROTEIN GROUP
Food Allergens			
rAra h 1	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Storage protein, 7S globulin
rAra h 2	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Storage protein, Conglutin
rAra h 3	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Storage protein, 11S globulin
nAra h 6	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Storage protein, Conglutin
rAra h 8	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	PR-10 protein
rAra h 9	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
rGly m 4	Soybean	<i>Glycine max</i>	PR-10 protein
nGly m 5	Soybean	<i>Glycine max</i>	Storage protein, Beta-conglycinin
nGly m 6	Soybean	<i>Glycine max</i>	Storage protein, Glycinin
nFag e 2	Buckwheat	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Storage protein, 2S albumin
rTri a 14	Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
rTri a 19.0101	Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	Omega-5 gliadin
nTri a aA_T1	Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	
nAct d 1	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	
nAct d 2	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Thaumatine-like protein
nAct d 5	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	
rAct d 8	Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	PR-10 protein
rApi g 1	Celery	<i>Apium graveolens</i>	PR-10 protein
rMal d 1	Apple	<i>Malus domestica</i>	PR-10 protein
rPru p 1	Peach	<i>Prunus persica</i>	PR-10 protein
rPru p 3	Peach	<i>Prunus persica</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
Aeroallergens			
nCyn d 1	Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Grass group 1
rPhl p 1	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	Grass group 1
rPhl p 2	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	Grass group 2
nPhl p 4	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	
rPhl p 5	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	Grass group 5
rPhl p 6	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	
rPhl p 7	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	Polcalcin
rPhl p 11	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	
rPhl p 12	Timothy	<i>Phleum pratense</i>	Profilin
rAln g 1	Alder	<i>Alnus glutinosa</i>	PR-10 protein
rBet v 1	Birch	<i>Betula verrucosa</i>	PR-10 protein
rBet v 2	Birch	<i>Betula verrucosa</i>	Profilin
rBet v 4	Birch	<i>Betula verrucosa</i>	Polcalcin
rCor a 1.0101	Hazel pollen	<i>Corylus avellana</i>	PR-10 protein
nCry j 1	Japanese cedar	<i>Cryptomeria japonica</i>	
nCup a 1	Cypress	<i>Cupressus arizonica</i>	
nOle e 1	Olive	<i>Olea europaea</i>	
nOle e 7	Olive	<i>Olea europaea</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
rOle e 9	Olive	<i>Olea europaea</i>	
rPla a 1	Plane tree	<i>Platanus acerifolia</i>	
nPla a 2	Plane tree	<i>Platanus acerifolia</i>	
rPla a 3	Plane tree	<i>Platanus acerifolia</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
nAmb a 1	Ragweed	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	
nArt v 1	Mugwort	<i>Artemisia vulgaris</i>	
nArt v 3	Mugwort	<i>Artemisia vulgaris</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
rChe a 1	Goosefoot	<i>Chenopodium album</i>	
rMer a 1	Annual mercury	<i>Mercurialis annua</i>	Profilin
rPar j 2	Wall pellitory	<i>Parietaria judaica</i>	Lipid transfer protein (nsLTP)
rPla l 1	Plantain (English)	<i>Plantago lanceolata</i>	
nSal k 1	Saltwort	<i>Salsola kali</i>	

ImmunoCAP ISAC 112 Allergen Components, con't

Allergen component	Allergen source COMMON NAME	LATIN NAME	PROTEIN GROUP
Aeroallergens			
rCan f 1	Dog	<i>Canis familiaris</i>	Lipocalin
rCan f 2	Dog	<i>Canis familiaris</i>	Lipocalin
nCan f 3	Dog	<i>Canis familiaris</i>	Serum albumin
rCan f 5	Dog	<i>Canis familiaris</i>	Arginine esterase
rEqu c 1	Horse	<i>Equus caballus</i>	Lipocalin
nEqu c 3	Horse	<i>Equus caballus</i>	Serum albumin
rFel d 1	Cat	<i>Felis domesticus</i>	Uteroglobin
nFel d 2	Cat	<i>Felis domesticus</i>	Serum albumin
rFel d 4	Cat	<i>Felis domesticus</i>	Lipocalin
nMus m 1	Mouse	<i>Mus musculus</i>	Lipocalin
rAlt a 1	Alternaria	<i>Alternaria alternata</i>	
rAlt a 6	Alternaria	<i>Alternaria alternata</i>	Enolase
rAsp f 1	Aspergillus	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
rAsp f 3	Aspergillus	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
rAsp f 6	Aspergillus	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mn superoxide dismutase
rCla h 8	Cladosporium	<i>Cladosporium herbarum</i>	
rBlo t 5	House dust mite	<i>Blomia tropicalis</i>	
nDer f 1	House dust mite	<i>Dermatophagoides farinae</i>	
rDer f 2	House dust mite	<i>Dermatophagoides farinae</i>	
nDer p 1	House dust mite	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
rDer p 2	House dust mite	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
rDer p 10	House dust mite	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Tropomyosin
rLep d 2	Storage mite	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	
rBla g 1	Cockroach	<i>Blattella germanica</i>	
rBla g 2	Cockroach	<i>Blattella germanica</i>	
rBla g 5	Cockroach	<i>Blattella germanica</i>	
nBla g 7	Cockroach	<i>Blattella germanica</i>	Tropomyosin
Other			
rApi m 1	Honey bee venom	<i>Apis mellifera</i>	Phospholipase A2
nApi m 4	Honey bee venom	<i>Apis mellifera</i>	Melittin
rPol d 5	Paper wasp venom	<i>Polistes dominulus</i>	Venom, Antigen 5
rVes v 5	Common wasp venom	<i>Vespa vulgaris</i>	Venom, Antigen 5
rAni s 1	Anisakis	<i>Anisakis simplex</i>	
rAni s 3	Anisakis	<i>Anisakis simplex</i>	Tropomyosin
rHev b 1	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	
rHev b 3	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	
rHev b 5	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	
rHev b 6.01	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	
rHev b 8	Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Profilin
nMUXF3	Sugar epitope from Bromelain		CCD-marker

Notas: la técnica de ImmunoCAP™ ISAC (Thermo Fisher Scientific, Suecia) está disponible desde 2001. Usa una matriz fija que desde su última versión en 2009 determina 112 alérgenos nativos o recombinantes, purificados, colocados por triplicado, cuya determinación es semicuantitativa (fluorescencia). Equivalen a 51 fuentes de alérgenos distintas. De los cuales, si aislamos únicamente los alérgenos alimentarios, encontramos 44 alérgenos de 18 fuentes alimentarias distintas (**ver Anexo 3b**).

Anexo 3b. Desglose detallado de únicamente los alérgenos alimentarios que incluye la micromatriz ImmunoCAP ISAC, clasificados según su origen vegetal o animal.

Alérgeno vegetal	Fuente vegetal	Familia de proteínas	Nombre científico	Alimento
Act d 1	nAct d 1	Cisteína proteasa	<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwi
Act d 2	nAct d 2	Taumatina (TLP)	<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwi
Act d 5	nAct d 5	<i>Kiwelin</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwi
Act d 8	rAct d 8	PR-10	<i>Actinidia deliciosa</i>	Kiwi
Ana o 2	rAna o 2	Globulina 11S	<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardo
Api g 1	rApi g 1	PR-10	<i>Apium graveolens</i>	Apio
Ara h 1	rAra h 1	Globulina 7/8S	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ara h 2	rAra h 2	Conglutina	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ara h 3	rAra h 3	Globulina 11S	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ara h 6	nAra h 6	Conglutina	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ara h 8	rAra h 8	PR-10	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ara h 9	rAra h 9	nsLTP	<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete
Ber e 1	rBer e 1	Albúmina 2S	<i>Bertholletia excelsa</i>	Nuez de Brasil
Cor a 1.0401	rCor a 1.0401	PR-10	<i>Corylus avellana</i>	Avellana
Cor a 8	rCor a 8	nsLTP	<i>Corylus avellana</i>	Avellana
Cor a 9	rCor a 9	Globulina 11S	<i>Corylus avellana</i>	Avellana
Fag e 2	nFag e 2	Albúmina 2S	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Trigo sarraceno / alforfón
Gly m 4	rGly m 4	PR-10	<i>Glycine max</i>	Soja
Gly m 5	nGly m 5	β -conglucina	<i>Glycine max</i>	Soja
Gly m 6	nGly m 6	Glicinina	<i>Glycine max</i>	Soja
Jug r 1	nJug r 1 (rJug r 1 en ImmunoCAP)	Albúmina 2S	<i>Juglans regia</i>	Nuez
Jug r 2	nJug r 2	Globulina 7/8S (CCD)	<i>Juglans regia</i>	Nuez
Jug r 3	rJug r 3	nsLTP	<i>Juglans regia</i>	Nuez
Mal d 1	rMal d 1	PR-10	<i>Malus domestica</i>	Manzana
Pru p 1	rPru p 1	PR-10	<i>Prunus persica</i>	Melocotón

Pru p 3	rPru p 3	nsLTP	<i>Prunus persica</i>	Melocotón
Ses i 1	nSes i 1	Albúmina 2S	<i>Sesamum indicum</i>	Semilla de sésamo / ajonjolí
Tri a 14	rTri a 14	nsLTP	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
Tri a 19.0101	rTri a 19.0101	Omega-5 gliadina (cruda)	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
Tri a aA_TI	nTri a aA_TI	Omega-5 gliadina	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo

Alérgeno animal	Fuente animal	Familia de proteínas	Nombre científico	Alimento
Ani s 1	rAni s 1	Inhibidora de proteasa serina Kunitz	<i>Anisakis simplex</i>	Anisakis
Bos d 4	nBos d 4	α -Lactoalbúmina	<i>Bos domesticus</i>	Leche de vaca
Bos d 5	nBos d 5	β -Lactoglobulina	<i>Bos domesticus</i>	Leche de vaca
Bos d 6	nBos d 6	Albúmina Sérica Bovina	<i>Bos domesticus</i>	Leche de vaca
Bos d 8	nBos d 8	Caseína	<i>Bos domesticus</i>	Leche de vaca
Bos d LF	nBos d LF	Lactoferrina	<i>Bos domesticus</i>	Leche de vaca

Gad m 1/Gad c 1	rGad m 1/rGad c 1	β-Parvalbúmina	<i>Gadus morhua/callarias</i>	Bacalao
Gal d 1	nGal d 1	Ovomucoide	<i>Gallus domesticus</i>	Huevo de gallina
Gal d 2	nGal d 2	Ovalbúmina	<i>Gallus domesticus</i>	Huevo de gallina
Gal d 3	nGal d 3	Ovotransferrina/Conalbúmina	<i>Gallus domesticus</i>	Huevo de gallina
Gal d 5	nGal d 5	Albúmina sérica / α -livetina	<i>Gallus domesticus</i>	Huevo de gallina
Pen m 1	nPen m 1	Tropomiosina	<i>Penaeus monodon</i>	Langostino (crustáceo)
Pen m 2	nPen m 2	Arginina-quinasa	<i>Penaeus monodon</i>	Langostino (crustáceo)
Pen m 4	nPen m 4	Proteína de unión a calcio sarcoplásmica	<i>Penaeus monodon</i>	Langostino (crustáceo)



Anexo 4. Aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante.



**COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE - HOSPITAL GENERAL**

C/. Pintor Baeza, 12 - 03010 Alicante
<http://www.dep19.san.gva.es>
Teléfono: 965-913-952
Correo electrónico: ceim_hgua@gva.es

Ref. CEIm: PI2020 005 - Ref. ISABIAL: 190419

**INFORME DEL COMITE DE ETICA PARA LA INVESTIGACION CON
MEDICAMENTOS**

Reunidos los miembros del Comité de Ética para la Investigación con medicamentos del Departamento de Salud de Alicante – Hospital General, en su sesión del día 29 de Enero de 2020 (Acta 2020-1), y una vez estudiada la documentación presentada por **Dra. María Ruano Zaragoza** del Servicio de Alergología del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Biomarcadores de utilidad diagnóstica en pacientes con alergia a las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de fenotipo grave"**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Alicante con fecha 18 de Mayo de 2020.

UNIVERSITAT MIGUEL HERNÁNDEZ

Fdo. Dr. Luis Manuel Hernández Blasco
Secretario Técnico CEIm Departamento de
Salud de Alicante – Hospital General

Anexo 5. Aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona.

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

ANA LUCIA ARELLANO ANDRINO, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Clínic de Barcelona

Certifica:

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor, para que se realice el estudio:

CÓDIGO:

DOCUMENTOS CON VERSIONES:

Tipo	Subtipo	Versión
Protocolo	Revisió històries clíniques	versió 1 - 18/02/2022

TÍTULO: Sensibilización a las proteínas de transferencia de lípidos: riesgo de anafilaxia y perfil molecular

PROMOTOR:

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ROSA MARÍA MUÑOZ CANO

y considera que, teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas (si las hubiera), y que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Que se han evaluado la compensaciones económicas previstas (cuando las haya) y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos y se consideran adecuadas.
- Que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este centro.
- Que dicho estudio cumple con las obligaciones establecidas por la normativa de investigación y confidencialidad que le son aplicables.
- Que dicho estudio se incluye en una de las líneas de investigación biomédica acreditadas en este centro, cumpliendo los requisitos necesarios, y que es viable en todos sus términos.

Este CEIm acepta que dicho estudio sea realizado, debiendo ser comunicado a dicho Comité Ético todo cambio en el protocolo o acontecimiento adverso grave.

y hace constar que:

1º En la reunión celebrada el día 10/03/2022, acta 5/2022 se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.

Mod_04 (V4 de 18/06/2018)

Reg. HCB/2022/0246

PR

Página 1

2º El CEIm del Hospital Clínic i Provincial, tanto en su composición como en sus PNTs, cumple con las normas de EMA/CHMP/ICH/135/1995

3º Listado de miembros:

Presidente:

- JOSEP MARÍA MIRÓ MEDA (Médico Enfermedades Infecciosas, HCB)

Vicepresidente:

- JULIO DELGADO GONZÁLEZ (Médico Hematólogo, HCB)

Secretario:

- ANA LUCIA ARELLANO ANDRINO (Médico Farmacólogo Clínico, HCB)

Vocales:

- JOSE RIOS GUILLERMO (Estadístico. Plataforma de Estadística Médica. IDIBAPS)
- OCTAVI SANCHEZ LOPEZ (Representante de los pacientes)
- MARIA JESÚS BERTRAN LUENGO (Médico Epidemiólogo, HCB)
- JOAQUÍN SÁEZ PEÑATARO (Médico Farmacólogo Clínico, HCB)
- SERGI AMARO DELGADO (Médico Neurólogo, HCB)
- EDUARD GUASCH CASANY (Médico Cardiólogo, HCB)
- MARINA ROVIRA ILLAMOLA (Farmacéutico Atención Primaria, CAP Eixample)
- PAU ALCUBILLA PRATS (Médico Farmacólogo Clínico, HCB)
- JOSE TOMAS ORTIZ PEREZ (Médico Cardiólogo, HCB)
- ELENA CALVO CIDONCHA (Farmacéutica Hospitalaria, HCB)
- CECILIA CUZCO CABELLOS (Enfermera, HCB)
- PAULA MARTÍN FARGAS (Abogada, HCB)
- SALVATORE BRUGALETTA (Médico Cardiólogo, HCB. Miembro del CEA, HCB)
- XAVIER CANALS-RIERA (Ingeniero Telecomunicaciones)
- FRANCESC XAVIER CORBELLE (Informático, HCB)
- JOSEP DÍAZ CORT (Licenciado en Ciencias Físicas. Catedrático en Informática)
- GASPARD MESTRES ALOMAR (Médico, Angiología, Cirugía Vascul, HCB)
- MARTA FRANCH SAGUER (Abogada)
- PATRICIA AMOROS REBOREDO (Farmacéutica Hospitalaria, HCB)
- ANNA MARÍA GUIJARRO PÉREZ (Servicio de Atención a la Ciudadanía, HCB)

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, este se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

Motivo: Certifico la precisión e
integridad de este documento
Fecha: 2022.03.14 10:57:00 +01'00'

Reg. HCB/2022/0246

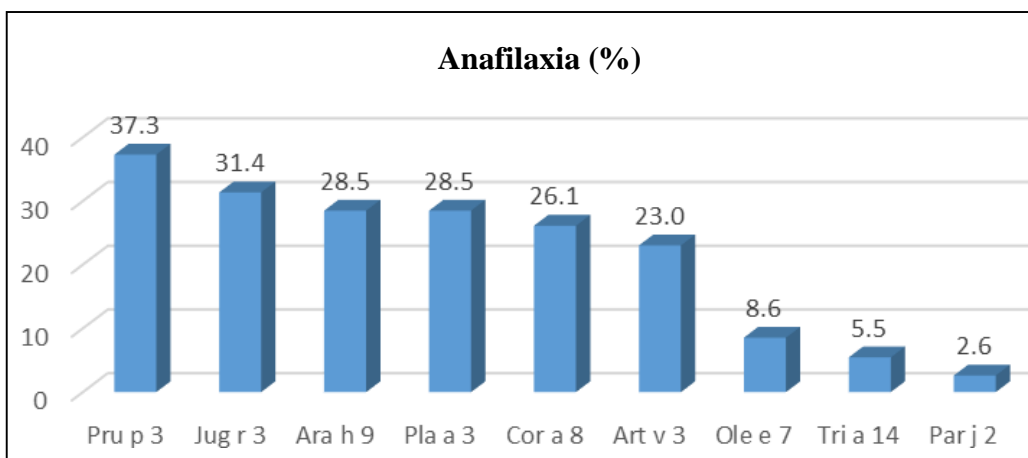
PR

Página 2

Mod_04 (V4 de 18/06/2018)

HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA
Villarroel, 170 - 08036 Barcelona (España)
Tel. 93 227 54 00 Fax 93 227 54 54
www.clinicbarcelona.org

Anexo 6. Incidencia de anafilaxia según la sensibilización a cada LTP en los 421 pacientes analizados (primer estudio).





11. AGRADECIMIENTOS

- A mi madre, por tu cariño y apoyo incondicional, aliento, ternura y comprensión sin límites, por haberme acompañado siempre y, desde el principio hasta el final, en este largo trayecto.
- A mi padre y a mi hermana y hermano, por vuestra alegría y ánimo constante. Por saber que siempre estáis cuando os necesito.
- A Ángel, por tu fe en mí, por tu generosidad y ayuda inquebrantable, por haberme apoyado con tu amor y agradecidos consejos.
- A Miguel, mi maestro generoso y sabio, por el regalo apasionado y desinteresado de tu tiempo, con tus enseñanzas, y por transmitirme la esperanza y confianza necesarias. Por la fe que demostraste por mí desde el primer momento. Gracias por transmitirme tu pasión hacia la investigación.
- A Teo, por tu amistad. Y por el obsequio cariñoso de tu tiempo, con tus consejos, por tu ánimo y vitalidad cómplice salvadora para mí.
- A mis dos directores de tesis, Javier Fernández Sánchez y M^a Purificación González Delgado, por vuestra guía, vuestro apoyo y por transmitirme vuestras ideas, que motivaron mi camino a la investigación, por vuestras enseñanzas y por vuestra ayuda incondicional. En especial a ti, Javier, por tu empeño y apoyo empleados para que este trabajo viera la luz.
- A Joan y Rosa, por vuestros sabios y valiosos consejos, por confiar en mí como candidata y como profesional. Por estar siempre a mi lado. Por vuestro apoyo.

- A la doctora Clare Mills, por su generosa aportación en el proceso de investigación. Por compartir su sabiduría conmigo y dejarme aprender con ella, al seleccionarme y permitir que realizara una estancia formativa con su prestigioso equipo de investigación en el *Manchester Institute of Biotechnology* (Reino Unido), y poderme nutrir de sus conocimientos.

A todos vosotros, gracias de corazón.





REFERENCIAS

1. Muraro A, Worm M, Alviani C, Cardona V, DunnGalvin A, Garvey LH, et al. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Food Allergy, Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI guidelines: Anaphylaxis (2021 update). *Allergy*. 2022 Feb;77(2):357-377. doi: 10.1111/all.15032. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34343358.
2. Asero R, Ariano R, Aruanno A, Barzaghi C, Borrelli P, Busa M, et al. Systemic allergic reactions induced by labile plant-food allergens: Seeking potential cofactors. A multicenter study. *Allergy*. 2021 May;76(5):1473-1479. doi: 10.1111/all.14634. Epub 2020 Nov 1. PMID: 33080053.
3. Muñoz-Cano R, San Bartolome C, Casas-Saucedo R, Araujo G, Gelis S, Ruano-Zaragoza M, et al. Immune-Mediated Mechanisms in Cofactor-Dependent Food Allergy and Anaphylaxis: Effect of Cofactors in Basophils and Mast Cells. *Front Immunol*. 2021 Feb 17;11:623071. doi: 10.3389/fimmu.2020.623071. PMID: 33679712; PMCID: PMC7925840.
4. Sánchez-López J, Araujo G, Cardona V, et al. Food-dependent NSAID-induced hypersensitivity (FDNIH) reactions: Unraveling the clinical features and risk factors. *Allergy*. 2020. doi: 10.1111/all.14689. PMID: 33289951.
5. Christensen MJ, Eller E, Mortz CG, et al. Wheat-Dependent Cofactor-Augmented Anaphylaxis: A Prospective Study of Exercise, Aspirin, and Alcohol Efficacy as Cofactors. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Jan;7(1):114-121. doi: 10.1016/j.jaip.2018.06.018. PMID: 30599881.
6. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):371-6. doi: 10.1016/j.jaci.2004.04.029. PMID: 15316518.

7. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861614.
8. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*. 2003;111(7):1065–72. doi: 10.1172/JCI16142. PMID: 12671056.
9. Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Feb;111(2 Suppl):S540-7. doi: 10.1067/mai.2003.134. PMID: 12592300.
10. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):3-12; quiz 13. doi: 10.1016/j.jaci.2004.11.008. PMID: 15637539.
11. Seth D, Poowutikul P, Pansare M, Kamat D. Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann*. 2020 Jan 1;49(1):e50-e58. doi: 10.3928/19382359-20191206-01. PMID: 31930423.
12. Savage J, Johns CB. Food Allergy: Epidemiology and Natural History. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015;35(1):45–59. doi: 10.1016/j.iac.2014.09.004. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25459576.
13. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2014 Feb;133(2):291-307; quiz 308. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.020. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24388012.
14. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in

Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014 Aug;69(8):992-1007. doi: 10.1111/all.12423. Epub 2014 May 10. PMID: 24816523.

15. Lyons SA, Burney PGJ, Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Barreales L, Clausen M, Dubakiene R, Fernandez-Perez C, Fritsche P, Jedrzejczak-Czechowicz M, Kowalski ML, Kralimarkova T, Kummeling I, Mustakov TB, Lebens AFM, van Os-Medendorp H, Papadopoulos NG, Popov TA, Sakellariou A, Welsing PMJ, Potts J, Mills ENC, van Ree R, Knulst AC, Le TM. Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Jul-Aug;7(6):1920-1928.e11. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.044. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30898689.

16. Tejedor Alonso MA, Moro Moro M, Múgica García MV. Epidemiology of anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2015 Jun;45(6):1027-39. doi: 10.1111/cea.12418. PMID: 25495512.

17. Panesar SS, Javad S, de Silva D, Nwaru BI, Hickstein L, Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilò MB, Cardona V, Dubois AE, Dunn Galvin A, Eigenmann P, Fernandez-Rivas M, Halken S, Lack G, Niggemann B, Santos AF, Vlieg-Boerstra BJ, Zolkipli ZQ, Sheikh A; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Group. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*. 2013 Nov;68(11):1353-61. doi: 10.1111/all.12272. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24117770.

18. Cardona V, Cabañes N, Chivato T, De la Hoz B, Fernández Rivas M, Gangoiti Goikoetxea I, et al. Guía de actuación en anafilaxia: Galaxia 2016. En: Respirar [en línea]. Disponible en www.respirar.org/images/galaxia_web_28-11-2016.pdf.

19. Cardona V, Álvarez-Perea A, Ansotegui-Zubeldia IJ, et al. Guía de Actuación en Anafilaxia en Latinoamérica. Galaxia-Latam [Clinical Practice Guide for Anaphylaxis in

Latin America (Galaxia-Latam)]. *Rev Alerg Mex.* 2019;66 Suppl 2:1-39. Spanish. doi: 10.29262/ram.v66i6.588. PMID: 31443138.

20. Vissers YM, Iwan M, Adel-Patient K, Stahl Skov P, Rigby NM, Johnson PE, et al. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: The necessity of degranulation assays. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(11):1631–42. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03830.x. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21801247.

21. Downs ML, Baumert JL, Taylor SL, et al. Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *J Proteomics.* 2016 Jun 16;142:62-9. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.045. Epub 2016 May 3. PMID: 27150359.

22. Wakamatsu J, Stark TD, Hofmann T. Antioxidative Maillard Reaction Products Generated in Processed Aged Garlic Extract. *J Agric Food Chem.* 2019 Feb 27;67(8):2190-2200. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06907. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30715866.

23. Schulten V, Lauer I, Scheurer S, Thalhammer T, Bohle B. A food matrix reduces digestion and absorption of food allergens in vivo. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Oct;55(10):1484-91. doi: 10.1002/mnfr.201100234. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21984443.

24. Cabanillas B, Cuadrado C, Rodriguez J, Dieguez MC, Crespo JF, Novak N. Boiling and pressure cooking impact on IgE reactivity of soybean allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;175(1–2):36–43. doi: 10.1159/000485894. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29342467.

25. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;

121(5): 1210–19.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2008.02.019. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18378288.

26. Fernandez Rivas M. Food allergy in *alergologica*-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:37-44. PMID: 19530417.

27. Ballmer-Weber BK, Scheurer S, Fritsche P, Enrique E, Cistero-Bahima A, Haase T, et al. Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(1):167–73. doi: 10.1067/mai.2002.125601. PMID: 12110837.

28. Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):481–8. doi: 10.1016/j.jaci.2006.05.012. Epub 2006 Jun 27. PMID: 16890775.

29. Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Rodríguez-Pérez R, Benito C, Sánchez-Monge R, Salcedo G, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(4):789–95. doi: 10.1016/S0091. PMID: 14564363.

30. Yeats TH, Rose JK. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci*. 2008 Feb;17(2):191-8. doi: 10.1110/ps.073300108. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18096636; PMCID: PMC2222726.

31. Scala E, Till SJ, Asero R, Abeni D, Guerra EC, Pirrotta L, et al. Lipid transfer protein sensitization: Reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2015;70(8):933–43. doi: 10.1111/all.12635. Epub 2015 May 7. PMID: 25903791.

32. Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G, Sanchez-Monge R, et al. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* [1999 Mar;103(3 Pt 1):514-9. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70479-3. PMID: 10069888.
33. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Vries SC De, Ree R Van. Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 May;122(1):20-32. doi: 10.1159/000024355. PMID: 10859466.
34. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: A clinical study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2002 Oct;57(10):900-6. doi: 10.1034/j.1398-9995.2002.t01-1-23541.x. PMID: 12269935.
35. Barber D, De La Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colas C, Dávila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1764–73. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03351.x. PMID: 19877313.
36. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, et al. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100°C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebocontrolled food challenge results. *Clin Immunol*. 2003;112(4):775–83. doi: 10.1016/s0091-6749(03)01942-0. PMID: 14564361.
37. Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, et al. C. Allergenic cross- reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in

vitro study. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:699-707. doi: 10.1016/0091-6749(94)90177-5. PMID: 7930303.

38. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D, et al. Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(4):908–14. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.020. PMID: 15480333.

39. Gomez F, Aranda A, Campo P, Diaz-Perales A, Blanca-Lopez N, Perkins J, et al. High prevalence of lipid transfer protein sensitization in apple allergic patients with systemic symptoms. *PLoS One.* 2014 Sep 11;9(9):e107304. doi: 10.1371/journal.pone.0107304. PMID: 25210741; PMCID: PMC4161420.

40. Pastorello EA, Ortolani C, Baroglio C, Pravettoni V, Ispano M, Giuffrida MG, et al. Complete Amino Acid Sequence Determination of the Major Allergen of Peach (*Prunus persica*) Pru p 1. *Biol Chem.* 1999;380(November):1315–20. doi: 10.1515/BC.1999.167. PMID: 10614824.

41. Zuidmeer L, Ree R Van. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:269–73. doi: 10.1097/ACI.0b013e32814a5401. PMID: 17489047.

42. Sanchez-Lopez J, Tordesillas L, Pascal M, Munoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, et al. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133(4): 1018–25. doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.005. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24080266.

43. Wangorsch A, Larsson H, Messmer M, Garcia-Moral A, Lauer I, Wolfheimer S, et al. Molecular cloning of plane pollen allergen Pla a 3 and its utility as diagnostic marker

for peach associated plane pollen allergy. *Clin Exp Allergy*. 2016; 46(5): 764–74. doi: 10.1111/cea.12721. PMID: 26892183.

44. Tordesillas Leticia et al. Plant Lipid Transfer Protein Allergens: No Cross-Reactivity between Those from Foods and Olive and Parietaria Pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156:291–6. doi: 10.1159/000323503. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21720174.

45. Sancho AI, van Ree R, van Leeuwen A, Meulenbroek BJ, van de Weg EW, Gilissen LJ, Puehringer H, Laimer M, Martinelli A, Zaccharini M, Vazquez-Cortés S, Fernandez-Rivas M, Hoffmann-Sommergruber K, Mills EN, Zuidmeer L. Measurement of lipid transfer protein in 88 apple cultivars. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(1):19-26. doi: 10.1159/000112499. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18087158.

46. Borges JP, Jauneau A, Brulé C, Culerrier R, Barre A, Didier A, Rougé P. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem*. 2006 Oct;44(10):535-42. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.09.018. Epub 2006 Oct 10. PMID: 17064926.

47. Cubells-Baeza N, Gómez-Casado C, Tordesillas L, Ramírez-Castillejo C, Garrido-Arandia M, González-Melendi P, Herrero M, Pacios LF, Díaz-Perales A. Identification of the ligand of Pru p 3, a peach LTP. *Plant Mol Biol*. 2017 May;94(1-2):33-44. doi: 10.1007/s11103-017-0590-z. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28299506.

48. Ahrazem O, Jimeno L, López-Torrejón G, Herrero M, Espada JL, Sánchez-Monge R, Duffort O, Barber D, Salcedo G. Assessing allergen levels in peach and nectarine cultivars. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007 Jul;99(1):42-7. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60619-9. PMID: 17650828.

49. Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, et al. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer

protein. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(2): 473–80. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.057. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16890774.

50. Clare Mills EN, Gao C, Wilde PJ, Rigby NM, Wijesinha-Bettoni R, Johnson VE, et al. Partially folded forms of barley lipid transfer protein are more surface active. *Biochemistry*. 2009; 48(51): 12081–8. doi: 10.1021/bi901328f. PMID: 19899810.

51. Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem*. 2000 Feb;48(2):493-7. doi: 10.1021/jf9906681. PMID: 10691663. doi: 10.1021/jf9906681. PMID: 10691663.

52. Gaier S, Marsh J, Oberhuber C, Rigby NM, Lovegrove A, Alessandri S, Briza P, Radauer C, Zuidmeer L, van Ree R, Hemmer W, Sancho AI, Mills C, Hoffmann-Sommergruber K, Shewry PR. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Nov;52 Suppl 2:S220-9. doi: 10.1002/mnfr.200700274. PMID: 18384093.

53. Wijesinha-Bettoni R, Alexeev Y, Johnson P, Marsh J, Sancho AI, Abdullah SU, Mackie AR, Shewry PR, Smith LJ, Mills EN. The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis. *Biochemistry*. 2010 Mar 16;49(10):2130-9. doi: 10.1021/bi901939z. PMID: 20121231.

54. Palacin A, Varela J, Quirce S, del Pozo V, Tordesillas L, Barranco P, Fernandez-Nieto M, Sastre J, Diaz-Perales A, Salcedo G. Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009 Aug;39(8):1267-76. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03280.x. PMID: 19486028.

55. Asero R, Antonicelli L, Arena A, et al. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:547-555. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03167.x. Epub 2009 Feb 3. PMID: 19220321.
56. Haroun-Díaz E, Azofra J, González-Mancebo E, de las Heras M, Pastor-Vargas C, Esteban V, et al. Nut allergy in two different areas of Spain: Differences in clinical and molecular pattern. *Nutrients*. 2017;9(8):1–11. doi: 10.3390/nu9080909. PMID: 28825657; PMCID: PMC5579702.
57. Rodrigues-Alves R, Lopez A, Pereira-Santos MC, Lopes-Silva S, Spinola-Santos A, Costa C, et al. Clinical, anamnestic and serological features of peach allergy in Portugal. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 149(1): 65–73. doi: 10.1159/000176308. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19033734.
58. Skypala IJ, Cecchi L, Shamji MH, Scala E, Till S. Lipid transfer protein allergy in the United Kingdom: characterization and comparison with a matched Italian cohort. *Allergy*. 2019;74(7): 1340–51. doi: 10.1111/all.13747. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30762886; PMCID: PMC6767535.
59. Mothes-Luksch N, Raith M, Stingl G, Focke-Tejkl M, Razzazi-Fazeli E, Ziegelmayer R, et al. Pru p 3, a marker allergen for lipid transfer protein sensitization also in Central Europe. *Allergy*. 2017; 72(9): 1415–8. doi: 10.1111/all.13151. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28252802; PMCID: PMC5573991.
60. Deng S, Yin J. Mugwort pollen-related food allergy: lipid transfer protein sensitization and correlation with the severity of allergic reactions in a Chinese population. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2019; 11(1): 116–28. doi: 10.4168/aair.2019.11.1.116. PMID: 30479082; PMCID: PMC6267181.

61. Van Winkle RC, Chang C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014 Jun;46(3):211-24. doi: 10.1007/s12016-012-8338-7. PMID: 23179517.
62. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: Clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1529–39. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04071.x. PMID: 22994350.
63. Umasunthar T, Hodes M, Turner PJ, Gore C, Habibi P, Warner JO, et al. Incidence of fatal food anaphylaxis in people with food allergy: a systematic review and meta-analysis *Experimental Allergy. Clin Exp Allergy*. 2013;43:1333–41. doi: 10.1111/cea.12211. PMID: 24118190; PMCID: PMC4165304.
64. Nucera E, Mezzacappa S, Aruanno A, Pecora V, Rizzi A, Ricci AG, et al. Hypersensitivity to major panallergens in a population of 120 patients. *Postępy dermatologii i Alergol*. 2015 Aug;32(4):255-61. doi: 10.5114/pdia.2015.53321. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26366148; PMCID: PMC4565840.
65. HA S. Food-induced anaphylaxis. 2004. p. 257:161-71; discussion 71-6, 207-10, 76-85. PMID: 15025397.
66. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida G, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):350–9. doi: 10.1067/mai.2003.35. PMID: 12589356.
67. Sicherer SH, York N. Current perspectives Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):594-602. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.044. Epub 2011 Jan 13. PMID: 21236480.

68. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Mascheri A, Borgonovo L, et al. Pru p 3- sensitised Italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presenting IgE antibodies to Pru p 1 and Pru p 4. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;156(4):362-72. doi: 10.1159/000324440. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21829031.
69. Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, et al. World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *World Allergy Organ J.* 2011; 4: 13-37. doi: 10.1097/WOX.0b013e318211496c. Epub 2011 Feb 23. PMID: 23268454; PMCID: PMC3500036.
70. Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, et al. Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: 1386-92. doi: 10.1067/mai.2003.1498. PMID: 12789243.
71. Kraft M, Dölle-Bierke S, Renaudin JM, et al. Wheat Anaphylaxis in Adults Differs from Reactions to Other Types of Food. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021:S2213-2198(21)00382-2. doi: 10.1016/j.jaip.2021.03.037. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33831620.
72. Andersen MBS, Hall S, Dragsted LO. Identification of european allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;41(1):4–19. doi: 10.1007/s12016-009-8177-3. PMID: 19851893.
73. Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;13(4):379–85. doi: 10.1097/ACI.0b013e32835f5b07. PMID: 23426007.
74. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.

75. Sanchez-Lopez J, Asturias JA, Enrique E, Suarez-Cervera M, Bartra J. Cupressus arizonica pollen: a new pollen involved in the lipid transfer protein syndrome? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011; 21(7): 522–6. PMID: 22312935.
76. Scala E, Abeni D, Bd DP, Paganelli R, Locanto M, Giani M, et al. Ole e 1, Ole e 7, and Ole e 9: Identifying distinct clinical subsets of olive tree–allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Feb;137(2):629-631.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2015.07.009. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26316094.
77. Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Ferna FJ, Gamboa P, Mun R, et al. Graph Based Study of Allergen Cross-Reactivity of Plant Lipid Transfer Proteins (LTPs) Using Microarray in a Multicenter Study. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0050799. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23272072; PMCID: PMC3522694.
78. Blanca M, Victorio Puche L, Garrido-Arandia M, Martín-Pedraza L, Romero Sahagún A, López-Sánchez JD, et al. Pru p 9, a new allergen eliciting respiratory symptoms in subjects sensitized to peach tree pollen. *PLoS ONE* 2020 Mar 19;15(3):e0230010. doi: 10.1371/journal.pone.0230010. Erratum in: *PLoS One*. 2020 Apr 21;15(4):e0232301. PMID: 32191737; PMCID: PMC7082028.
79. Somoza ML, Pérez-Sánchez N, Victorio-Puche L, Martín-Pedraza L, Esteban Rodríguez A, Blanca-López N, et al. Subjects develop tolerance to Pru p 3 but respiratory allergy to Pru p 9: A large study group from a peach exposed population. *PLoS One*. 2021 Aug 19;16(8):e0255305. doi: 10.1371/journal.pone.0255305. PMID: 34411133; PMCID: PMC8376049.
80. Garcia BE, Martinez-Aranguren R, Bernard Alonso A, Gamboa P, Feo Brito F, Bartra J, et al. Is the ISAC 112 microarray useful in the diagnosis of pollinosis in Spain? *J*

Investig Allergol Clin Immunol. 2016; 26(2): 92–9. doi: 10.18176/jiaci.0052. PMID: 27164624.

81. Ree R Van. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):910-3. doi: 10.1042/bst0300910. PMID: 12440944.

82. Winkle RC Van, Chang C. The Biochemical Basis and Clinical Evidence of Food Allergy Due to Lipid Transfer Proteins: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allerg Immunol.* 2014;46(3):211–24. doi: 10.1007/s12016-012-8338-7. PMID: 23179517.

83. Cardona V. Lettuce Allergy Is a Lipid Transfer Syndrome-Related Food Allergy With a High Risk of Severe Reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2017;27(2):98–103. doi: 10.18176/jiaci.0110. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27609533.

84. Javaloyes G, Goikoetxea MJ, Núñez IG, Sanz ML, Blanca M, Scheurer S, et al. Performance of Different in Vitro Techniques in the Molecular Diagnosis of Peanut Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(7):508–13. PMID: 23397673.

85. Goikoetxea MJ, D'Amelio CM, Martinez-Aranguren R, Gamboa P, Garcia BE, Gomez F, et al. Is microarray analysis really useful and sufficient to diagnose nut allergy in the Mediterranean area? *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016; 26(1): 31–9. PMID: 27012014.

86. Shreffler WG. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Apr;127(4):843-9; quiz 850-1. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.011. PMID: 21458654.

87. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Mussap M, Passalacqua G, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian

patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem.* 2011; 44(12):1005–11. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.05.007. Epub 2011 May 19. PMID: 21627961.

88. D'Amelio CM, Goikoetxea MJ, Martinez-Aranguren R, Garcia BE, Gomez F, Fernandez J, et al. Is the performance of immuno- CAP ISAC 112 sufficient to diagnose peach and apple allergies? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016; 116(2): 162–3. doi: 10.1016/j.anai.2015.11.003. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26684914.

89. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem.* 2002 Dec; 1850(26): 7738–41. doi: 10.1021/jf0258398. PMID: 12475298.

90. EAACI Global Atlas on Asthma. <http://www.eaaci.org/attachments/Global%20Atlas%20of%20Asthma.pdf> [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.eaaci.org/attachments/GlobalAtlasofAsthma.pdf>.

91. Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis. <http://eaaci.org/resources/scientific-output/global-atlas-of-allergic-rhinitis-and-chronic-rhinosinusitis.html> [Internet]. 2015. Disponible en: http://eaaci.org/globalatlas/ENT_Atlas_web.pdf.

92. Cardona Dahl V; Grupo de trabajo de la Guía GALAXIA de actuación en anafilaxia. Guía de actuación en anafilaxia [Guideline for the management of anaphylaxis]. *Med Clin (Barc).* 2011 Mar 26;136(8):349-55. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2010.10.003. Epub 2010 Dec 17. PMID: 21168172.

93. Position paper: allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy.* 1993; 48(14 Suppl): 48–82. PMID: 8342740.

94. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33(10): 1443–9. doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01784.x. PMID: 14519153.
95. Balsells-Vives S, San Bartolomé C, Casas-Saucedo R, et al. Low levels matter: Clinical relevance of low Pru p 3 sIgE in patients with peach allergy. *Front. Allergy*, 05 April 2022. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.868267>
96. Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, et al. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jan;141(1):372-381.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.028. PMID: 28506851.
97. Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int*. 2016;25(4):98-105. doi: 10.1007/s40629-016-0115-3. PMID: 27656353; PMCID: PMC5016538.
98. Simola M, Malmberg H. Nasal histamine reactivity; relationships to skin-test responses, allergen provocation and symptom severity in patients with long-continuing allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120(1): 67–71. doi: 10.1080/000164800760370864. PMID: 10779189.
99. Ta V, Weldon B, Yu G, Humblet O, Neale-May S, Nadeau K. Use of specific IgE and skin prick test to determine clinical reaction severity. *Br J Med Med Res*. 2011; 1(4): 410–29. doi: 10.9734/bjmmr/2011/711. PMID: 22993721; PMCID: PMC3444260.
100. Dubost R, Ruet N, Deviller P. Incidence de la sensibilisation á profiline dans une population allergique aux pollens: responsabilité de la profiline dans des

polysensibilisations polliniques chez des patients á taux normal d'IgE totales [Incidence of sensitization to profilin in a population allergic to pollen: responsibility of profilin in pollen polysensitizations in patients with a normal level of total IgE]. *Allerg Immunol (Paris)*. 2000 May;32(5):199-206. French. PMID: 10900490.

101. Vega F, Panizo C, Dordal MT, González ML, Velázquez E, Valero A, et al. Relationship between respiratory and food allergy and evaluation of preventive measures. *Allergol Immunopathol*. 2016; 44(3): 263–75. doi: 10.1016/j.aller.2015.05.008. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26316421.

102. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Burks AW, et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(4): 798–806.e13. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.026. PMID: 20920770; PMCID: PMC2990684.

103. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, Uyttendroek A, Sabato V, Hagendorens MM, et al. IgE-reactivity profiles to nonspecific lipid transfer proteins in a northwestern European country. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139(2): 679–82.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.016. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27522157.

104. Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, Ibañez MD, Cuesta-Herranz J, van Odijk J, et al. Peanut allergy: clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(3): 603–7. doi: 10.1016/j.jaci.2010.09.010. Epub 2010 Nov 18. PMID: 21093026.

105. Gao ZS, Yang ZW, Wu SD, Wang HY, Liu ML, Mao WL, et al. Peach allergy in China: a dominant role for mugwort pollen lipid transfer protein as a primary sensitizer.

J Allergy Clin Immunol. 2013; 131(1): 224–3. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.015. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22939759.

106. Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M, et al. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. J Investig Allergol Clin Immunol. 2007; 17(Suppl 1): 11–6. PMID: 18050566.

107. Asero R, Piantanida M, Pravettoni V. Allergy to LTP: to eat or not to eat sensitizing foods? A follow-up study. Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2018; 50(4): 156–62. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.57. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29542889.

108. Uasuf CG, Villalta D, Conte ME, Di Sano C, Barrale M, Cantisano V, et al. Different cosensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients. Clin Mol Allergy. 2015; 13: 30. doi: 10.1186/s12948-015-0035-7. PMID: 26633941; PMCID: PMC4667484.

109. Bogas G, Muñoz-Cano R, Mayorga C, Casas R, Bartra J, Pérez N, Pascal M, Palomares F, Torres MJ, Gómez F. Phenotyping peach-allergic patients sensitized to lipid transfer protein and analysing severity biomarkers. Allergy. 2020 Dec;75(12):3228-3236. doi: 10.1111/all.14447. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32535938.

110. Palacín A, Gómez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. PLoS One. 2012; 7: e50799. doi: 10.1371/journal.pone.0050799. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23272072; PMCID: PMC3522694.

111. Novembre E, Mori F, Contestabile S, Rossi ME, Pucci N. Correlation of anti-Pru p 3 IgE levels with severity of peach allergy reactions in children. Ann Allergy Asthma Immunol. 2012 Apr;108(4):271-4. doi: 10.1016/j.anai.2012.02.006. PMID: 22469448.

112. Pascal M, Moreno C, Dávila I, et al. Integration of in vitro allergy test results and ratio analysis for the diagnosis and treatment of allergic patients (INTEGRA). *Clin Transl Allergy*. 2021 Aug;11(7):e12052. doi: 10.1002/ct2.12052. PMID: 34582103.

113. Skypala IJ, Asero R, Barber D, et al. European Academy of Allergy; Clinical Immunology (EAACI) Task Force: Non-specific Lipid Transfer Protein Allergy Across Europe. Non-specific lipid-transfer proteins: Allergen structure and function, cross-reactivity, sensitization, and epidemiology. *Clin Transl Allergy*. 2021 May 18;11(3):e12010. doi: 10.1002/ct2.12010. PMID: 34025983; PMCID: PMC8129635.

