

Original

Alergenicidad de la Almorta (*Lathyrus sativus*)*

M. Martínez San Ireneo, M. D. Ibáñez Sandín, A. Elices Apellaniz,
F. Marañón Lizana^a, E. Fernández-Caldas^a y M. T. Laso Borrego

Sección de Alergia. Hospital del Niño Jesús. Madrid ^aLaboratorio de Investigación y Desarrollo. C.B.FLETI, S.A.

Fundamento: La almorta (*Lathyrus sativus*), legumbre utilizada en algunas regiones españolas en forma de harina para elaborar algunos platos, es responsable de algunos casos de reacción alérgica por ingesta o contacto. Hasta ahora no se había estudiado su comportamiento como antígeno alimentario. **Métodos:** Para el estudio de la composición alérgica de la almorta se ha utilizado el suero de 38 pacientes sensibilizados a legumbres. El 77% presentaba una prueba cutánea positiva frente a la harina de almorta; cuatro de estos pacientes habían presentado sintomatología clínica en relación con la almorta y dos de éstos, además, con otras legumbres. **Resultados:** Las concentraciones de IgE específica frente a almorta, detectadas mediante ELISA, no fueron diferentes cuando se utilizó un extracto hervido durante 15 minutos en comparación con la utilización de un extracto crudo. Los sueros estudiados reconocieron unas 20 bandas proteicas en los *immunoblot* realizados con el extracto crudo de almorta. Las bandas a las que se unió con más frecuencia la IgE de los sueros tenían un peso molecular de 50,9 y 27,7 kDa. Los sueros de individuos clínicamente sensibles sólo a almorta detectaron únicamente 2 alérgenos, con pesos moleculares de 27,7 y 12,9 kDa. **Conclusiones:** La harina de almorta presenta una alergenidad compleja. La mayoría de los alérgenos son termoestables.

PALABRAS CLAVE: Hipersensibilidad a legumbres / ELISA / ELISA-inhibición / SDS-PAGE-immunoblot / *Lathyrus sativus*.

Allergenicity of vetchling (*Lathyrus sativus*)

Background: Vetchling (*Lathyrus sativus*) is a dried legume used in some regions of Spain in the form of flour for cooking and has been responsible for some cases of allergic reactions by food intake or by contact. The role of this agent as food antigen has not been previously studied. **Methods:** Sera from 38 legume-sensitized patients were used to assess the allergenic composition of vetchling. Seventy-seven percent of patients showed a positive skin test to vetchling flour; four of these patients had developed clinical symptoms in relation to vetchling, and two of them, in addition, to other legumes. **Results:** Serum concentration of specific IgE against vetchling, tested by ELISA, were not different when a 15-min boiled extract was used as compared with a raw extract. Twenty protein bands of immunoblots carried out with raw extract of vetchling were recognized by the serum samples studied. Bands to which serums IgE bound most frequently showed a molecular weight of 50.9 and 27.7 kDa. Only two allergens of molecular weight 27.7 and 12.9 kDa, respectively, were detected by sera from the two subjects only sensitive to vetchling. **Conclusions:** Vetchling flour shows a complex allergenicity. Most allergens are thermostable.

KEY WORDS: Hypersensitivity to legumes / ELISA / ELISA-inhibition / SDS-PAGE-immunoblot / *Lathyrus sativus*.

La almorta (*Lathyrus sativus*) es una legumbre perteneciente al género *Lathyrus* y familia *Leguminosae*. Su consumo por el hombre es poco frecuente en la actualidad, pero en algunas regiones españolas, como Castilla-La Mancha, se sigue utilizando esporádicamente en forma de harina para

elaborar algunos platos culinarios. Debido, posiblemente, a su bajo consumo, se han comunicado pocos casos de reacciones alérgicas tras la exposición a esta legumbre^{1,2}, y en la bibliografía revisada no se ha encontrado ningún artículo que estudie su comportamiento como antígeno alimentario.

*Este trabajo ha sido sufragado, en parte, con una beca-ayuda del Fondo para el Fomento de la Investigación de la Fundación de la SEAIC.

En un estudio realizado con un grupo de niños alérgicos a legumbres a los que se probaba, mediante *prick test*, una batería de legumbres, que incluía harina de almorta, se observó que un alto porcentaje de estos niños estaban sensibilizados frente a esta harina³. Esto nos llevó a realizar el presente trabajo con los siguientes objetivos: 1) identificar los alérgenos de la almorta, y 2) estudiar la termoestabilidad de los mismos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes. Se utilizaron sueros de 38 pacientes sensibilizados a legumbres, de edades comprendidas entre los 3 y 20 años (mediana 8 años), de los cuales 29 eran varones y 9 de sexo femenino. El 77 % de los pacientes presentaba una prueba cutánea positiva frente a la harina de almorta (extracto 10 mg/ml, C.B.F. LETI, S.A.). Cuatro de estos pacientes referían haber sufrido reacciones alérgicas con esta legumbre, tres de ellos tras su ingesta y uno por contacto cutáneo. En uno de ellos se confirmó la sensibilización clínica mediante provocación oral abierta de forma controlada con la administración del alimento, en la forma habitual de consumo; se comenzó con una dosis de aproximadamente la mitad de la cantidad con la que el paciente había presentado los síntomas y se aumentó progresivamente hasta alcanzar una reacción objetivable. Todos ellos tenían una prueba cutánea positiva a harina de almorta. Dos de estos niños referían clínica exclusivamente con almorta y los otros dos con almorta y otras legumbres (tabla I). Como controles se usaron los sueros de dos niños atópicos con buena tolerancia a alimentos, incluidas las legumbres. Se recogió una muestra de 5 ml de sangre de cada uno de los niños. Tras su coagulación, se centrifugó a 3500 rpm y el suero resultante se distribuyó en alícuotas y se guardó a -20 °C.

Extractos alérgicos. Se elaboraron dos extractos de harina de almorta, uno crudo y otro hervido. Se extrajo un gramo de harina de almorta en 20 ml de una solución de ClNa al 0,85 %. Después de mantener la solución en agitación durante 16 horas a una temperatura de 4 °C, se filtró y centrifugó y se obtuvo una concentración final de 1:20 (peso:volumen). Una parte del extracto de almorta se hirvió durante 15 minutos y se procesó de la misma forma.

Tabla I. Características clínicas y resultado de los test cutáneos de los pacientes sensibilizados clínicamente a almorta

Caso	Síntomas con almorta	Alergia a otras legumbres	Prick-test con almorta (mm)
16	Urticaria, disfgia y edema de lengua+	No	5
17	Urticaria y angioedema++	No	5
19	Vómitos+	garbanzo ^a	10
22	Urticaria de contacto	garbanzo ^a , lenteja ^a y guisante ^a	7

^aConfirmada por provocaciones orales abiertas.

+Síntomas tras ingesta del alimento.

++Síntomas tras ingesta y provocación oral abierta.

Determinación de concentración de proteínas. La concentración de proteína en los extractos de almorta se estimó por el método de Biuret-Lowry (Sigma Diagnostics, San Luis, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el extracto crudo fue de 4,85 mg/ml, mientras que en el extracto sometido a ebullición fue de 2,19 mg/ml.

Inmunoensayo para la IgE específica e inhibición de la IgE. La unión de IgE específica se determinó usando el extracto crudo y el hervido. Los extractos se inmovilizaron en placas Immulon 4 (Chantilly, EE.UU.) a una concentración de 10 µg/ml en tampón bicarbonato sódico (0,2M; pH 9,2). Tras el correspondiente bloqueo con HSA, las placas se incubaron con el suero durante toda la noche. A la mañana siguiente, se lavaron con PBS 0,1 % Tween para añadir anti-IgE-PO a 1 µg/ml en una solución bloqueante que contenía PBS 0,1 % Tween, 25 % de suero de ternera fetal y 1 % de heparina (2 h). Después de los lavados, la PO se evaluó con la incubación de 0,16M de tampón acetato (pH 6; 1 ml), TMB en DMSO (20 µl) y 1M H₂O₂ (2 µl). La reacción enzimática se paró con 2N de ácido sulfúrico y la densidad óptica (DO) a 450 nm se estimó en un lector de placas (Titertek Multiskan, Finlandia).

Para los experimentos de inhibición de IgE, se incubaron 125 µl de los extractos alérgicos a distintas concentraciones, con 125 µl del conjunto de sueros a una dilución 1/16. Se dejó inhibir durante 2 horas a temperatura ambiente y en cons-

tante agitación. La IgE específica se determinó como se ha indicado anteriormente. En fase sólida se usaron tanto el extracto crudo como el hervido.

SDS-PAGE e IgE-inmunodetección. La separación electroforética se realizó con geles de acrilamida según el método de Laemmli⁴. Se usaron tanto el extracto crudo como el hervido en condiciones reductoras y no reductoras. En el caso de hacerse en condiciones no reductoras se omitió el uso de β -mercaptoetanol.

Se utilizó el 14 % de gel separador y el 4 % de gel empaquetador. Las muestras se disolvieron en tampón Tris-HCl (pH 6,8) que contenía el 10 % de glicerol, el 2 % de SDS y el 5 % de β -mercaptoetanol. Antes de inyectar en el gel, las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. El gel se corrió en un tampón Tris-HCl 62.5 mM con 0,1 % SDS. Como marcadores moleculares se utilizaron los estándares comerciales de bajo rango de tamaño molecular de Bio-Rad (Richmond, VA, EE.UU.). Las condiciones del campo eléctrico fueron 250V, 35mA y 8W y se establecieron en un equipo de Bio-Rad conectado a un baño refrigerante. Posteriormente, el gel se tiñó con 0,1 % azul de Coomassie (R-250) en agua:metanol:ácido acético (50:40:10) y destañado en la misma solución.

La inmunodetección de IgE específica se realizó únicamente con el extracto crudo. Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de Immobilon (Millipore, Bedford, EE.UU.) en un tanque Trans Blot (Bio-Rad) en medio básico. Tras la transferencia, las membranas se dejaron secar completamente y se incubaron con el suero de cada paciente diluido 1/3 en una solución de PBS 0,1 %, Tween 20 y 1 % de albúmina humana (HSA) durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, las tiras se lavaron con PBS Tween 0,1 % y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con una anti-IgE humana monoclonal marcada con peroxidasa (anti-IgE-PO; Ingenasa, Madrid) a una concentración de 2 mg/ml. Después de los correspondientes lavados, la reacción enzimática se desarrolló en una solución compuesta por 0,1 M tampón citrato (pH 5,0) que contiene 10 mM EDTA y 1 % dextran sulfato (1 ml), tetrametilbenzidina (TMB; Boehringer Mannheim, Alemania) en DMSO (Merk, Alemania (20 μ l) y 1M H₂O₂ (2 μ l).

RESULTADOS

La determinación de IgE específica, mediante ELISA directo, usando 1 μ g de proteína por pocillo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el extracto crudo (media aritmética de DO:1,51) y el hervido (media aritmética de DO:1,50) ($p < 0,6$). La IgE específica resultó positiva (DO > 0,2) en el 74 % del total de los pacientes. El 96 % de los pacientes con IgE específica positiva tenía pruebas cutáneas positivas a harina de almorta. No se pudo demostrar una mayor concentración de IgE específica frente a almorta en los niños que referían alguna manifestación clínica tras su ingesta o contacto con respecto a los que no tenían historia de reacciones alérgicas con esta legumbre.

En los estudios de ELISA-Inhibición, empleando el extracto crudo (4 °C) en fase sólida, se obtuvieron dos rectas estadísticamente paralelas (t de Student; $p=0,005$) (fig. 1). Cuando se utilizó el extracto hervido en fase sólida también se observaron dos rectas paralelas ($p=0,01$); se obtuvo una mayor inhibición con el extracto sometido a ebullición, lo que sugería una mayor afinidad de la IgE específica por el extracto hervido (fig. 2).

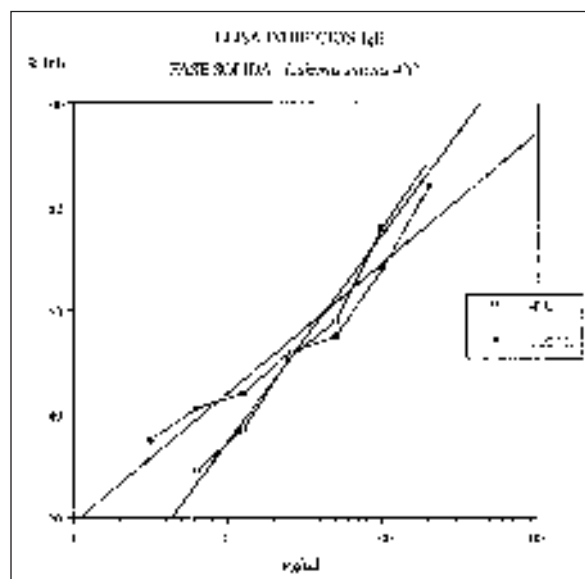


Fig. 1. Resultados del ELISA-inhibición usando el extracto crudo (4 °C) de almorta en fase sólida. Al análisis de paralelismo mediante la prueba t de Student muestra que las rectas son paralelas ($p=0,005$).

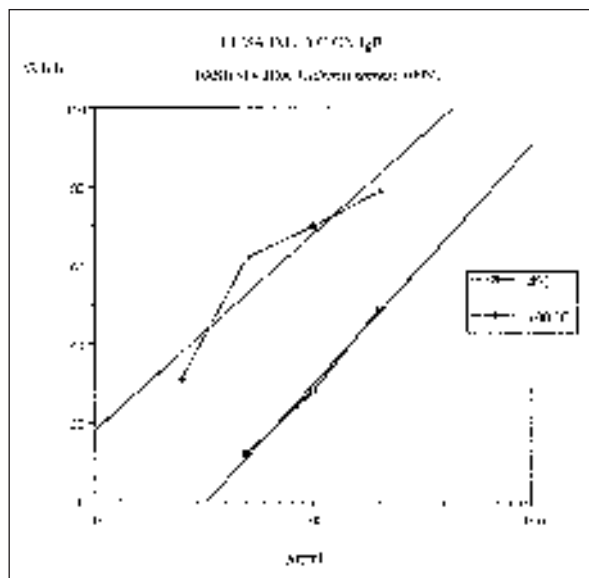


Fig. 2. Resultados del ELISA-inhibición usando el extracto hervido (100 °C) de almorta en fase sólida. Al análisis de paralelismo mediante la prueba t de Student muestra que las rectas son paralelas ($p=0,01$).

En la figura 3 se muestran las proteínas/péptidos identificados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando el extracto crudo y el hervido de almorta. En condiciones reductoras, no se apreciaron cambios relevantes en la identificación de bandas proteicas tanto en el extracto crudo como en el sometido a ebullición, en comparación con los extractos sin reducir. Sí se observaron diferencias entre los SDS-PAGE del extracto crudo y del hervido, con la pérdida de bandas de bajo peso molecular (inferior a 31 kDa) en el hervido, aunque se mantenía una con un peso molecular de 12,9 kDa.

En los *immunoblot* del extracto crudo realizados con los sueros de los 38 niños sensibilizados a legumbres se detectaron unas 20 bandas de pesos moleculares comprendidos entre 99,5 y 12,9 kDa (fig. 4). Los sueros de los niños que presentaban clínica exclusivamente con almorta, representados en las líneas 16 y 17 de la figura 4, reconocieron sólo dos bandas alergénicas muy tenues de 27,7 y 12,9 kDa. Más del 50 % de los sueros detectaron bandas proteicas con pesos moleculares de 50,9 y 27,7 kDa. Los sueros de los sujetos controles no detectaron ninguna banda proteica.

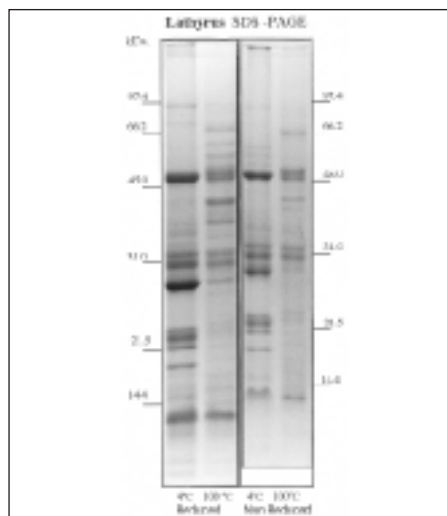


Fig. 3. SDS-PAGE con los extractos crudo (4 °C) y hervido (100 °C) de almorta. Las dos líneas de la derecha representan los extractos en condiciones nativas; las dos de la izquierda, tras reducción con β -mercaptoetanol; kDa = marcadores de pesos moleculares.

DISCUSIÓN

La almorta es una legumbre que sirve de alimento para animales y, esporádicamente, es utilizada en forma de harina para la elaboración de las denominadas *gachas*, cuyo consumo es casi exclusivo en la región castellano-manchega. La ingestión crónica de semillas de almorta produce latirismo, un síndrome neurológico que se caracteriza por una rigidez muscular severa y una parálisis de los miembros inferiores⁵.

Los niños aquí estudiados, aunque estaban sensibilizados mayoritariamente a la lenteja y al garbanzo, presentaban también una sensibilización muy alta a almorta, demostrada por una prueba cutánea positiva y la IgE específica. La mayoría de estos

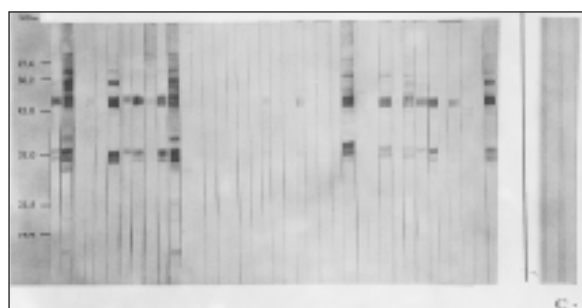


Fig. 4. SDS-PAGE *immunoblotting* del extracto crudo de almorta. Líneas 1 a 38: sueros de los pacientes; C: sueros de sujetos control; kDa: marcadores de pesos moleculares.

pacientes no había consumido nunca esta legumbre, lo que parece confirmar la existencia de reactividad antigénica cruzada con las legumbres de uso más frecuente y que en nuestro medio inducen un número importante de reacciones alérgicas, principalmente en la edad pediátrica. Fraj. et al² demostraron reactividad cruzada entre la almorta y la lenteja, y en menor medida, con el guisante, mediante técnica de RAST-inhibición, utilizando el suero de un paciente con alergia a almorta². Mediante técnicas de ELISA-inhibición e inhibición de *blots*, hemos observado reactividad cruzada entre almorta, lenteja y garbanzo (datos no publicados, artículo en preparación). Otros autores^{6,7} también han encontrado una amplia reactividad cruzada *in vitro* entre la familia de las leguminosas utilizando los sueros de niños sensibilizados clínicamente a cacahuete y/o soja. Bernhisel et al.⁷, en sus estudios de SDS-PAGE, hallaron una banda prominente de 20 kDa en todas las especies de legumbres utilizadas, excepto en la judía verde (la almorta no se incluyó). La reactividad cruzada clínica, aunque más rara, también se produce. Dos de nuestros pacientes sensibilizados clínicamente a almorta presentaban, además, alergia clínica a otras legumbres, uno a garbanzo y otro a garbanzo, lenteja y guisante, confirmado por provocaciones orales.

Existe una gran homogeneidad entre los extractos crudo y hervido, demostrado por ELISA-inhibición. El hecho de que el extracto sometido a ebullición se inhiba más a sí mismo que el crudo, indica una mayor potencia del extracto hervido, que puede deberse a una mayor concentración de los alérgenos más importantes o a una mayor afinidad de la IgE específica por los alérgenos hervidos. La formación de neoantígenos tampoco puede ser descartada. También hay que tener en cuenta que el paciente alérgico a legumbres, en la mayoría de los casos no ha estado expuesto a alérgenos crudos, ya que la consumición de estas semillas y por lo tanto la presentación alérgica, generalmente, ha sido del alimento cocinado. Asimismo, la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IgE específica frente al extracto crudo y el hervido, apoya la resistencia al calor de la mayoría de los alérgenos en el extracto de almorta, al igual que en otras legumbres⁸.

La almorta no se ha incluido con anterioridad en estudios de inmunodetección. Se han utilizado los sueros de 38 niños sensibilizados a legumbres, de

los cuales un alto porcentaje estaba sensibilizado a almorta, para identificar los alérgenos que son detectados por la mayoría de ellos. Más del 50 % de estos sueros detectaron bandas proteicas de 50,9 y 27,7 kDa. La relevancia clínica de estas proteínas no se puede establecer debido al desconocimiento de la tolerancia a esta legumbre, por la mayoría de los pacientes. Se ha observado que los sueros de los niños con sensibilización clínica exclusiva a almorta detectaron sólo dos bandas proteicas en el extracto de almorta, de 27,7 y 12,9 kDa. Estas proteínas podrían representar alguno de los alérgenos principales de la almorta. Creemos que sería necesario ampliar estos estudios con un mayor número de pacientes clínicamente sensibles a esta leguminosa, confirmado por provocaciones orales, para extraer conclusiones definitivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdivieso R, Quirce S, Sainz T. Bronchial asthma caused by *Lathyrus sativus* flour. *Allergy* 1988; 43: 536-539.
2. Fraj J, Quirce S, Martín C, Cuevas M, de la Hoz B, Dávila I et al. Reacciones de hipersensibilidad inmediata a la harina de almorta (*Lathyrus sativus*). *Resp Esp Alergol Inmunol Clin* 1991; 6: 47-51.
3. Ibáñez MD, Martínez M, Fernández-Caldas E, Sánchez JJ, Marañón F, Alonso et al. Allergy to legumes. Clinical and immunological studies. *Cuad Inmunoa-lergol Pediatr* 1997; 12: 57-58.
4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
5. Khursheed J, Kamaluddin Ahmad. Studies on Neurolathyrism. *Environmental Res* 1993; 60: 259-266.
6. Barnett D, Bonham B, Howden ME. Allergenic cross-reactions among legume foods. An *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 433-438.
7. Bernhisel-Broadbent J, Taylor S, Sampson HA. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II Laboratory correlates. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 701-709.
8. Carrillo T, Cuevas M, Díez ML, Losada E, Moneo I. Diagnóstico inmunológico *in vitro* en la hipersensibilidad a legumbres. *Allergol Immunopathol* 1986; 14: 139-146.

Dra. M. Martínez San Ireneo
Sección de Alergia
Hospital del Niño Jesús
Avda. Menéndez y Pelayo 65
28009 Madrid