

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

Nuevos alérgenos de *Anisakis simplex*:

estudios *in silico* e *in vitro*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan González Fernández

Directora

María del Carmen Cuéllar del Hoyo

Madrid, 2018

© Juan González Fernández, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

TESIS DOCTORAL

Nuevos alergenos de *Anisakis simplex*: estudios *in silico* e *in vitro*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan González Fernández

DIRECTORA

Dra. María del Carmen Cuéllar del Hoyo

(Departamento de Parasitología)

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE

MADRID

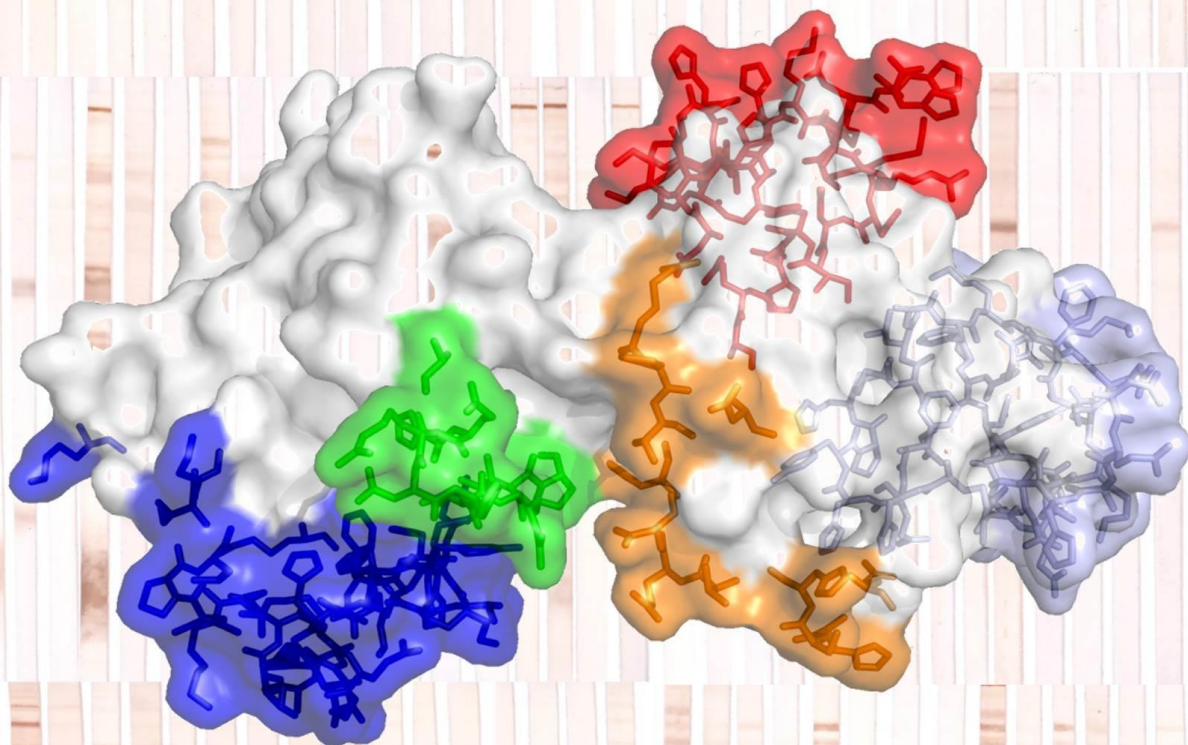
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

TESIS DOCTORAL

Nuevos alérgenos de *Anisakis simplex*:

estudios *in silico* e *in vitro*



JUAN GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

MADRID, 2017



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología

María del Carmen Cuéllar del Hoyo, Doctora en Farmacia y Catedrática de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que Juan González Fernández, Licenciado en Farmacia y Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado “NUEVOS ALERGENOS DE *Anisakis simplex*: ESTUDIOS *IN SILICO* E *IN VITRO*” para optar al Grado de Doctor con Mención Europea por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid,.....de.....de 2017.

Profa. Dra. María del Carmen Cuéllar del Hoyo

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar y de una forma especial me gustaría dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Carmen Cuéllar, por sus enseñanzas y consejos durante todos estos años bajo su tutela. Del mismo modo quiero agradecer al Dr. Alvaro Daschner, el compartir todos sus conocimientos conmigo y su valiosa y desinteresada ayuda. Es especial también mi agradecimiento a la Dra. Carmen Arce por haberme enseñado e ilusionado con la bioquímica, a la Dra. Pilar González con quién empecé a hacer mis primeros experimentos y a la Dra. Pilar Iniesta por su ayuda y disponibilidad durante todos estos años.

He sido muy privilegiado por poder formar parte del Departamento de Parasitología de la UCM y por haber trabajado con tan excelentes profesionales y sobre todo personas. Quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio presentes y pasados, a los técnicos que siempre tenían todo perfecto para hacer los experimentos; y a todos los profesores y alumnos que han ido pasando por el Departamento dejando sus enseñanzas en mi memoria. Quiero dar las gracias en especial a la Dra. Marta Rodero por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio de *Anisakis* y a la Dra. M^a Jesús Perteguer y su equipo del CNM-ISCIH de Majadahonda porque desde que empecé con el trabajo fin de máster me han proporcionado varias proteínas recombinantes de *Anisakis* para esta tesis. Ha sido un placer trabajar con el Dr. Luis Rivas y su equipo, junto con el Dr. Luque-Ortega de la unidad de ultracentrifugación analítica y el Dr. Rafael Núñez del servicio de microscopía electrónica en el CIB-CSIC a quienes agradezco su ayuda y enseñanzas sobre la purificación y manipulación de proteínas.

Asimismo, me gustaría agradecer a la Dra. Christiane K. Fæste, su acogida y tutela durante mi estancia y el haberme prestado el anticuerpo anti-arginina quinasa. A la Dra. Maaike Dooper por sus enseñanzas en el Laboratorio de Biología Molecular y a todo el personal de la Sección de Química y Toxicología del Veterinærinstituttet de Oslo por haberme hecho sentir uno más. Gracias también a las Dras. Kari Lybeck y Christin Plassen y al Dr. Søren Grove por su ayuda en el laboratorio y finalmente, a la Dra. Celia Agustí Ridaura por enseñarme un poco más de cerca la biología de los salmones y sus parásitos.

También me siento muy agradecido a todo el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la UCM por prestarme ayuda siempre que lo he necesitado, a la Dra. Tamara Fernández por su tiempo y ayuda con el revelado de las membranas; a todos mis antiguos profesores de todas las disciplinas que se imparten en esta Facultad y a los de mi Colegio Amor de Dios de Alcorcón por todo lo que me han enseñado desde pequeño.

Gracias a vosotros familiares y amigos por haber puesto vuestro granito de arena en muchos detalles, en especial a Paqui, Antonio, Carmen, Rocío, Juan y Dani. Asimismo quiero agradecer a Sofy sus precisas correcciones realizadas en los fragmentos traducidos al inglés, a Marcos Morente Fontela, Marina Alguacil Guillén, Oscar Díaz García y Mario Rodríguez Ferrero su contribución especial en algunos capítulos, a todas las pescaderías (Galería Parque Lisboa-Alcorcón, Supermercados Gigante-Guadarrama, Hipercor, Frimare, La Sirena, Carrefour y Supermercados de Madrid) por haberme regalado todo el material biológico, a la Dra. Natalie E. Nieuwenhuizen y al Dr. Andreas L. Lopata por las alícuotas del anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g y al Dr. Florencio Martínez Ubeira por las placas Trisakis 170[®].

Gracias a las personas más importantes de mi vida: mi mujer Fátima y mi hijo Pablo; mis padres Isabel y Manuel; y mi abuelo Vicente. A vosotros, a los que no estáis y a los que, si Dios quiere, estaréis, os dedico este trabajo por vuestro amor, paciencia, dedicación, alegría y ayuda incondicional.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la UCM mediante la concesión de una beca-contrato predoctoral (2012-2016), además de una ayuda para estancias breves en el extranjero del programa de formación de personal investigador UCM (2015).

Asimismo, ha sido financiado a través de proyectos de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, Mutua Madrileña, Fundación Ramón Areces y Departamento de Parasitología (UCM).

La investigación ha sido llevada a cabo dentro del grupo 911119-INMUNOPAR (Inmunobiología e Inmunomodulación Parasitaria) del clúster Agroalimentación y Salud del Campus de Excelencia Internacional Moncloa, en la línea titulada: “Identificación y caracterización de alérgenos de parásitos del pescado (*v.g. Anisakis simplex*) y mejora en los métodos de detección y del tratamiento de las alergias inducidas por esos nematodos”.

Índice

RESUMEN	5
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. <i>Anisakis simplex</i>	13
1.1.1. Generalidades.....	13
1.1.2. Patogenia.....	18
1.1.3. Diagnóstico y tratamiento.....	20
1.2. Alergenos de <i>Anisakis</i>	22
1.2.1. Definición y clasificación actual.....	22
1.2.2. La tropomiosina.....	27
1.2.3. La hemoglobina.....	32
1.3. Epitopos y evolución.....	35
1.3.1. Adaptación parásito-hospedador y mimetismo molecular.....	35
1.3.2. Inmunoinformática.....	39
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. Análisis de laboratorio.....	43
3.1.1. Organismos y procedencia.....	43
3.1.2. Extracción de proteínas.....	44
3.1.3. Valoración de proteínas. El método de Bradford.....	44
3.1.4. Diálisis renaturalizante.....	45
3.1.5. Proteínas recombinantes.....	45
3.1.6. Inmunización de ratones BALB/c.....	54
3.1.7. Sueros humanos.....	55
3.1.8. Determinación de inmunoglobulinas mediante ImmunoCAP®.....	59
3.1.9. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y proliferación <i>in vitro</i>	60
3.1.10. Medida de la producción de citoquinas.....	60
3.1.11. Determinación de diamino-oxidasa (DAO) sérica.....	61
3.1.12. Purificación de la hemoglobina nativa de <i>Anisakis</i>	61
3.1.13. Caracterización estructural de la hemoglobina de <i>Anisakis</i>	62
3.1.13.1. Análisis mediante ultracentrifugación analítica.....	62
3.1.13.2. Microscopía electrónica y procesamiento de imagen.....	62
3.1.14. ELISA (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).....	63
3.1.14.1. ELISA indirecto.....	63
3.1.14.2. ELISA captura.....	64
3.1.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	65
3.1.15.1. Tinción con azul Coomassie.....	66
3.1.15.2. Inmunotransferencia.....	66
3.1.15.3. Inhibición de la IgG1 de ratones inmunizados con hemoglobina y miofilina recombinantes de <i>Anisakis</i>	67
3.1.15.4. Tratamiento con peryodato de la hemoglobina nativa purificada de <i>Anisakis</i> y de los extractos totales de <i>Anisakis</i> y <i>Ascaris</i>	68

3.1.16.	Análisis estadístico	68
3.1.17.	Análisis proteómico de alta resolución mediante nanoLC-ESI-orbitrap-MS/MS.....	68
3.2.	Análisis bioinformáticos.....	70
3.2.1.	Secuencias y estructuras proteicas tridimensionales	70
3.2.2.	Análisis de secuencia y filogenético de las tropomiosinas	71
3.2.3.	Modelado por homología	74
3.2.4.	Predicción de epitopos.....	75
3.2.5.	Cálculo del potencial electrostático	75
3.2.6.	Comparación de superficies	75
3.2.7.	Digestión enzimática <i>in silico</i>	76
3.2.8.	Predicciones de sitios de glicosilación	76
4.	RESULTADOS.....	77
4.1.	Análisis <i>in silico</i> de la alergenicidad de la tropomiosina de <i>Anisakis simplex</i>	77
4.1.1.	Resumen.....	77
4.1.2.	Análisis filogenético.....	78
4.1.3.	Análisis de secuencias.....	81
4.1.4.	Modelos tridimensionales	87
4.1.5.	Predicción de epitopos.....	88
4.1.6.	Dendrogramas de similitud estructural.....	90
4.1.7.	Digestión enzimática	92
4.1.8.	Análisis de motivos LExxL y LExxN.....	93
4.1.9.	Predicción de glicosilaciones y fosforilaciones	93
4.1.10.	Distribución de aminoácidos cargados.....	93
4.2.	Niveles de diamino-oxidasa y urticaria crónica.....	96
4.2.1.	Resumen.....	96
4.2.2.	Datos clínicos	96
4.2.3.	Niveles de diamino-oxidasa sérica.....	97
4.3.	La hemoglobina, un nuevo alérgeno principal de <i>Anisakis simplex</i>	101
4.3.1.	Resumen.....	101
4.3.2.	Valores de IgE e IgG4 mediante ImmunoCAP®	101
4.3.3.	IgE e IgG4 anti-hemoglobina de <i>Anisakis</i>	102
4.3.4.	Detección de anticuerpos específicos de las hemoglobinas de <i>Anisakis</i> y <i>Ascaris</i> mediante inmunotransferencia	104
4.3.5.	Estudio de la reactividad cruzada entre las hemoglobinas de <i>Ascaris</i> y <i>Anisakis</i>	106
4.3.6.	Modelos de hemoglobina y epitopos	107
4.3.7.	Propiedades electrostáticas de las hemoglobinas de nematodos y sus hospedadores	111
4.3.8.	Dendrogramas de similitud estructural.....	114
4.4.	Alergenicidad de las tropomiosinas de pescado: desafiando un dogma inmunológico	116
4.4.1.	Estudio de un paciente alérgico a pescados y marisco	116
4.4.1.1.	Resumen.....	116
4.4.1.2.	Historia clínica.....	116
4.4.1.3.	Efecto de la cocción y condiciones reductoras sobre los patrones proteicos y el posterior reconocimiento de la tropomiosina mediante inmunotransferencia	116

4.4.1.4.	Pruebas cutáneas y diagnóstico serológico.....	122
4.4.2.	Posible papel alergénico de la tropomiosina en pacientes con reacciones adversas tras la ingesta de pescado.....	127
4.4.2.1.	Resumen.....	127
4.4.2.2.	Datos clínicos.....	128
4.4.2.3.	IgE frente a tropomiosina.....	128
4.4.2.4.	IgG4 e IgA frente a tropomiosina.....	134
4.5.	Hemoglobina de <i>Anisakis</i> (Ani s 13) recombinante <i>vs</i> nativa: su valoración como nuevo alérgeno de referencia para el diagnóstico.....	136
4.5.1.	Resumen.....	136
4.5.2.	Secuencia de la hemoglobina de <i>Anisakis simplex</i>	136
4.5.3.	IgE específica frente a Ani s 13 recombinante.....	137
4.5.4.	Inmunización de ratones con Ani s 13 recombinante.....	139
4.5.5.	Purificación de nAni s 13.....	140
4.5.6.	Ultracentrifugación analítica y microscopía electrónica.....	142
4.5.7.	Tratamiento de Ani s 13 con peryodato y reactividad cruzada con <i>Ascaris</i>	143
4.5.8.	IgE específica frente a Ani s 13 nativa.....	144
4.6.	Clonación, expresión y caracterización inmunológica de la miofilina y la arginina quinasa de <i>Anisakis</i>	147
4.6.1.	Resumen.....	147
4.6.2.	Secuencia de la miofilina y de la arginina quinasa de <i>Anisakis simplex</i>	148
4.6.3.	Inmunización de ratones con miofilina de <i>Anisakis</i> y reacciones cruzadas.....	150
4.6.4.	IgE específica frente a la miofilina y la arginina quinasa de <i>Anisakis</i>	152
4.6.5.	Miofilina e IgE frente a las proteínas de <i>Anisakis</i>	156
4.7.	Estudio de la reactividad cruzada entre <i>Anisakis simplex</i> y otros invertebrados: el papel de la tropomiosina.....	158
4.7.1.	Resumen.....	158
4.7.2.	Niveles de inmunoglobulinas en pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i> frente a otros parásitos, artrópodos asociados a manifestaciones alérgicas, mariscos y pescados.....	160
4.7.2.1.	Niveles de IgE y reacciones cruzadas.....	160
4.7.2.2.	Niveles de IgG.....	175
4.7.2.3.	Niveles de IgA.....	179
4.7.3.	Estudio de la tropomiosina en las reacciones cruzadas entre <i>Anisakis</i> y langostino.....	182
4.7.3.1.	Niveles de IgE, IgG4 e IgA frente a langostino en pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i>	182
4.7.3.2.	Inmunización de ratones con la tropomiosina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 3).....	187
4.7.3.3.	Determinación de los perfiles de inmunorreconocimiento de IgE frente a la tropomiosina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 3) y frente a los extractos de <i>Anisakis</i> y langostino.....	188
5.	DISCUSIÓN.....	191
5.1.	Análisis <i>in silico</i> de la alergenicidad de la tropomiosina de <i>Anisakis simplex</i>	191
5.2.	Niveles de diamino-oxidasa y urticaria crónica.....	196
5.3.	La hemoglobina, un nuevo alérgeno principal de <i>Anisakis simplex</i>	202

5.4.	Alergenicidad de las tropomiosinas de pescado: desafiando un dogma inmunológico.....	209
5.5.	Hemoglobina de <i>Anisakis</i> (Ani s 13) recombinante <i>vs</i> nativa: su valoración como nuevo alérgeno de referencia para el diagnóstico.....	218
5.6.	Clonación, expresión y caracterización inmunológica de la miofilina y la arginina quinasa de <i>Anisakis</i>	222
5.7.	Estudio de la reactividad cruzada entre <i>Anisakis simplex</i> y otros invertebrados: el papel de la tropomiosina.....	226
6.	CONCLUSIONES	239
	CONCLUSIONS	241
7.	BIBLIOGRAFÍA	243
	ANEXOS.....	271
I.	Publicaciones y capítulos de libro	271
	Artículos en revistas indexadas.....	271
	Capítulos de libro.....	271
II.	Abreviaturas	277
III.	Índice de Figuras	280
IV.	Índice de Tablas	287

RESUMEN

Nuevos alérgenos de *Anisakis simplex*: estudios *in silico* e *in vitro*

Anisakis simplex es un nematodo parásito cuyas larvas de tercer estadio pueden encontrarse en productos de la pesca de captura marina y ocasionar síntomas alérgicos tras ingerirlas vivas en pescados crudos o poco cocinados que no hayan sido congelados. Estos síntomas alérgicos pueden ser locales o generalizados según la respuesta inmunitaria del hospedador, distinguiéndose tres fenotipos clínicos: anisakiosis gástrica, anisakiosis gastroalérgica y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*.

La anisakiosis gástrica (AG) se caracteriza por una reacción inflamatoria aguda, de tipo alérgico y local debida a la penetración gástrica o intestinal del nematodo. Por otro lado, la anisakiosis gastroalérgica (AGA) puede presentar igualmente síntomas digestivos, pero éstos son sobrepasados por síntomas alérgicos agudos generalizados que van desde urticaria o angioedema, hasta anafilaxia. Finalmente, la urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+) se produce en pacientes que tras un episodio de parasitación previa por *Anisakis* desarrollan urticaria crónica. La urticaria crónica se caracteriza por la aparición de habones espontáneamente al menos dos veces por semana en un periodo de, como mínimo, seis semanas.

La urticaria crónica es una patología sin una causa definida pero se conoce bien su mecanismo efector: la degranulación de los mastocitos. Debido a que el conocimiento de los mecanismos inmunológicos previos a la degranulación de los mastocitos es escaso para esta patología, intentamos descubrir nuevas posibles causas de urticaria crónica a través del estudio serológico de pacientes sensibilizados y no sensibilizados a *A. simplex*.

Los síntomas alérgicos de la anisakiosis se deben a que el ser humano no es un hospedador natural de este parásito y además se trata de un parasitismo agudo o intermitente por lo que no parece posible que *Anisakis* module la respuesta inmunológica como sucede en otras helmintosis humanas. En el caso de *Anisakis* es preciso que la larva viva penetre desde la luz intestinal para que la reacción alérgica se produzca, por lo tanto los “alérgenos” de *Anisakis* no se comportan como los alérgenos alimentarios. Sin embargo, debido a la existencia de un área en el campo de la alergología que estudia la detección y caracterización de alérgenos, se han estudiado estos antígenos parasitarios inductores de IgE presentes en las larvas de *Anisakis* de la misma manera que el resto de alérgenos alimentarios. Hasta la fecha, se han caracterizado de forma oficial 14 alérgenos de *A. simplex* nombrados como Ani s 1-14, de los que Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11.02, Ani s 12, Ani s 13 y Ani s 14 son considerados alérgenos principales ya que son reconocidos por más del 50% de los pacientes sensibilizados.

El diagnóstico de rutina de la anisakiosis suele consistir, en primer lugar, en la anamnesis del paciente, valorando la ingesta de pescado crudo o poco cocinado hasta 48 horas antes de la aparición de los síntomas; y continuando con el serológico, con niveles positivos de IgE específica en el suero y acompañándose de pruebas cutáneas positivas con el extracto proteico de larvas de *Anisakis*. Además de los análisis de rutina, los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 son, en la actualidad, la mejor opción para el diagnóstico serológico de la anisakiosis en términos de sensibilidad y especificidad.

Los pacientes que han sufrido un episodio de AGA suelen presentar pruebas cutáneas positivas y tener IgE específica frente a *Anisakis* sin embargo, pueden existir falsos negativos. Además las pruebas cutáneas y la IgE específica frente al extracto de *Anisakis*, en cierta medida, son falsamente positivas en sujetos sanos. Ante esta situación buscamos mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico de la anisakiosis mediante el descubrimiento de nuevos alérgenos y el estudio de las reacciones cruzadas con otros organismos.

Uno de los alérgenos de *Anisakis*, la tropomiosina (Ani s 3), presenta un plegamiento muy sencillo en hélice alfa y se comporta como un panalérgeno de invertebrados ya que está presente en prácticamente todos los organismos y además su estructura es muy parecida en todos ellos. La tropomiosina tiene la peculiaridad de ser alérgica cuando procede de un organismo invertebrado (*v.g.* gamba) pero parece no ser alérgica si su fuente es un vertebrado (*v.g.* carne de cerdo). Por ello, nos propusimos identificar las diferencias de estructura primaria y secundaria entre las tropomiosinas de invertebrados (alérgicas) y vertebrados (no alérgicas), así como sus diferencias en digestibilidad y modificaciones postraduccionales para intentar comprender mejor las causas de su alérgenicidad.

Descubrimos que entre las secuencias de tropomiosinas de vertebrados e invertebrados había diferencias en la proporción de los aminoácidos lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F) y asparagina (N). Además los aminoácidos de las posiciones 10, 60, 110, 127, 144, 201, 214 y 255 presentaban importantes diferencias tanto en carga eléctrica como en volumen al comparar las tropomiosinas de ambos grupos de organismos. Asimismo la probabilidad de plegamiento en hélice alfa en las tropomiosinas de invertebrados fue más baja que en todas las tropomiosinas de los vertebrados, lo que parece indicar que la falta de plegamiento en hélice alfa está relacionada con la inmunogenicidad de las tropomiosinas. Ninguno de los invertebrados mencionados anteriormente presentó plegamiento en hélice alfa en la región 133-135 y 201-206.

También realizamos modelos tridimensionales de tropomiosinas de 26 especies de organismos, siete de ellas de vertebrados y 19 de invertebrados, para identificar los epitopos en su superficie y agruparlos según su similitud topológica. Con ello, establecimos una metodología de análisis bioinformático de superficies moleculares para el desarrollo de nuevas herramientas orientadas a la predicción de reacciones cruzadas.

También medimos y analizamos los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en pacientes con diferentes fenotipos de urticaria crónica estudiando su relación con la ingesta de pescado. Observamos que los niveles de DAO no se diferenciaron entre los pacientes con urticaria crónica y los controles, pero fueron significativamente más elevados en los pacientes UC+ que en los UC-. También observamos que los pacientes con UC+ que presentaron un empeoramiento de la urticaria tras ingerir pescado azul, tenían unos niveles más bajos de DAO sérica y éstos se relacionaban de forma directa con la producción de IgE específica frente a *Anisakis*.

Debido a la presencia de falsos positivos en el diagnóstico de la anisakiosis, también estudiamos las reacciones cruzadas entre *Anisakis* y otros organismos valorando el papel de la tropomiosina en esta reactividad cruzada y en la aparición de la urticaria crónica. Los pacientes con urticaria crónica presentaron niveles superiores de IgE frente a todos los extractos de nuestro estudio comparado con

los que no tenían urticaria crónica, habiéndose reducido la alergenicidad en los extractos sometidos a cocción, pero no viéndose afectado el reconocimiento de la IgA e IgG. También comprobamos que la tropomiosina de *Anisakis* no era un alérgeno principal ya que fue reconocido por el 15,4% (menos del 50%) de los pacientes sensibilizados a *Anisakis*. Asimismo, se demostró el papel protector de la IgG4 anti-tropomiosina y de la IgA ya que estaban disminuidas en los pacientes con urticaria comparado con los sujetos control. Finalmente se observó que una sensibilización previa a tropomiosina de langostino podría generar un reconocimiento cruzado de la de *Anisakis*, contribuyendo a la aparición de falsos positivos diagnosticados mediante ImmunoCAP®.

Nos propusimos también obtener y purificar nuevos posibles alérgenos de *Anisakis* como hemoglobina, miofilina y arginina quinasa para medir los niveles de IgE frente a ellos en pacientes sensibilizados al parásito y desarrollar una herramienta más sensible y específica para el diagnóstico de la anisakiosis. En primer lugar, la hemoglobina de *Anisakis* fue considerada un nuevo alérgeno principal del parásito siendo incluido en la base de datos oficial con el nombre de Ani s 13. Se demostró experimentalmente la ausencia de reactividad cruzada con la hemoglobina de *Ascaris* (nematodo parásito muy próximo filogenéticamente) y nuestros análisis bioinformáticos de epitopos predijeron la existencia de un epitopo único en la hemoglobina de *Anisakis*; por lo que parece ser una proteína muy específica. Este nuevo alérgeno fue purificado en su forma nativa mediante ultracentrifugación y con él se tapizaron placas de ELISA alcanzándose una positividad del 72,1% en pacientes sensibilizados a *Anisakis* y del 90% en pacientes diagnosticados de AGA. Empleando ultracentrifugación analítica y microscopía electrónica de transmisión se analizó su estructura cuaternaria comprobándose que se presenta en forma de tetrámeros y octámeros, siendo estos últimos los que presentaban un mayor contenido en grupo hemo.

Por otro lado, la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis* fueron secuenciadas, clonadas y purificadas por primera vez, sin embargo los pacientes estudiados no las reconocieron, por lo que no han podido ser consideradas alérgicas en nuestras condiciones experimentales.

Finalmente, el estudio de un paciente sensibilizado a *Anisakis* con alergia a ácaros, marisco y a varias especies de pescado en el que se demostró que las tropomiosinas de pescados (vertebrados) podían ser alérgicas puso en duda el dogma existente acerca de la no alergenicidad de las tropomiosinas de vertebrados. Este estudio nos llevó a realizar otro más amplio para determinar la presencia de IgE frente a pescado en pacientes con síntomas adversos tras su ingesta y estudiar el papel de su tropomiosina como alérgeno clínicamente relevante. La tropomiosina de pescado fue reconocida por 10 de los 19 pacientes seleccionados y todos los pacientes con molestias gastrointestinales tras la ingesta de pescado mostraron una banda de IgE compatible con la tropomiosina. Las tropomiosinas del bacalao, bonito y emperador fueron reconocidas por la mayoría de los pacientes aunque tres de los 10 pacientes no afirmaron presentar reacciones adversas frente a esas especies de pescado. Con ello, se demostró que la tropomiosina de vertebrados (pescados) podría ser alérgica en pacientes que presentan reacciones adversas recurrentes tras la ingesta de pescado.

Las principales conclusiones de esta tesis doctoral son:

1. Las tropomiosinas de invertebrados presentan regiones con una menor probabilidad de plegamiento en hélice alfa que las de vertebrados y son candidatas a ser las responsables de su alergenicidad.
2. Se ha desarrollado una nueva metodología para comparar superficies moleculares y, de este modo, intentar predecir reacciones cruzadas en proteínas de plegamiento sencillo.
3. Los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en la urticaria crónica dependen de los hábitos de consumo de pescado y, concretamente en los pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), dependen de la producción de IgE específica frente a *Anisakis*.
4. En los pacientes UC+, la presencia de niveles bajos de DAO les predisponen a una exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado.
5. La hemoglobina ha sido descrita como un nuevo alérgeno principal de *A. simplex* (Ani s 13).
6. Las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* no presentan reactividad cruzada.
7. Ani s 13, en combinación con los alérgenos de referencia actuales, mejoraría la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la anisakiosis.
8. Los tetrámeros y octámeros fueron los oligómeros más abundantes de Ani s 13, pero los octámeros fueron los que presentaron un mayor contenido de grupo hemo unido.
9. En nuestras condiciones experimentales, la miofilina y la arginina quinasa no pueden ser consideradas alérgenos de *Anisakis*.
10. Existe una baja reactividad cruzada entre *Anisakis* y diferentes organismos de nuestro entorno involucrados en procesos alérgicos como nematodos parásitos, artrópodos domésticos y mariscos.
11. La tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) no es un alérgeno principal de *Anisakis*.
12. La cocción del pulpo (*Octopus vulgaris*) y mejillón (*Mytilus edulis*) parece ser un mecanismo eficaz para reducir la unión de IgE, pero no la de la IgG ni IgA.
13. La IgA y la IgG4 y anti-tropomiosina están disminuidas en los pacientes con urticaria comparado con los sujetos control, lo que confirma su papel protector en la urticaria crónica.
14. La positividad de la IgE frente a langostino (*Litopenaeus vannamei*) por ELISA está asociada a la positividad a *Anisakis* mediante InmunoCAP® contribuyendo a la aparición de falsos positivos.
15. La tropomiosina podría ser un importante alérgeno en pacientes que presentan reacciones adversas recurrentes tras la ingesta de pescado.

SUMMARY

New *Anisakis simplex* allergens: *in silico* and *in vitro* studies

Anisakis simplex is a parasitic nematode whose third stage larvae can be found in marine fishery products. These larvae may cause allergic symptoms when they are ingested in raw or undercooked fish that have not been previously frozen. The allergic symptoms can be local or generalized, depending on the immune response of the host, resulting in three clinical phenotypes: gastric anisakiasis, gastro-allergic anisakiasis and *Anisakis* sensitization-associated chronic urticaria.

Gastric anisakiasis (GA) is characterized by an acute inflammatory reaction of an allergic and localized nature, due to gastric or intestinal penetration by the nematode. Gastro-allergic anisakiasis (GAA) can also produce digestive symptoms, but these are exceeded by generalized acute allergic symptoms ranging from urticaria or angioedema, to anaphylaxis. Finally, *Anisakis* sensitization-associated chronic urticaria (CU+) occurs in patients who develop chronic urticaria after a previous parasitic episode involving *Anisakis*. Chronic urticaria is characterized by the spontaneous appearance of wheals at least twice per week over a period of at least six weeks.

Chronic urticaria is a pathology without a defined cause but its effector mechanism is well-known: the degranulation of mast cells. Because knowledge of the immunological mechanisms that occur prior to mast-cell degranulation is scarce for this particular pathology, we tried to discover new possible causes of chronic urticaria via the serological study of patients who are sensitized to *A. simplex* as well as those who are not sensitized.

The allergic symptoms of anisakiasis develop because humans are not natural hosts for this parasite. Furthermore, it is an acute or intermittent form of parasitism so it does not appear possible that *Anisakis* can modulate the immune response as occurs in other human helminthiasis. In the case of *Anisakis*, it is necessary for live larvae penetrate the gut in order for the allergic reaction to take place. Therefore the *Anisakis*' "allergens" do not behave the way food allergens do. However, thanks to a sector of the allergology field that studies the detection and characterization of allergens, the IgE-inducing parasitic antigens that are present in *Anisakis* larvae have been studied in the same way as food allergens. To date, 14 *A. simplex* allergens have been officially characterized and named Ani s 1-14; of which Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11.02, Ani s 12, Ani s 13 and Ani s 14 are considered major allergens due to the fact that they are recognized by more than 50% of sensitized patients.

The routine diagnosis of anisakiasis usually begins with a review of the patient's anamnesis and an assessment of the intake of raw or undercooked fish up to 48 hours prior to the onset of symptoms; it continues with serological tests that demonstrate positive levels of serum-specific IgE as well as positive skin tests to *Anisakis* larvae's protein extract. In addition to these routine analyses, the recombinant allergens Ani s 1 and Ani s 7 are currently the best tool for a serological diagnosis of anisakiasis in terms of sensitivity and specificity.

Patients who have suffered a GAA episode usually have positive skin tests and are found to have specific IgE against *Anisakis*, but there may be false negatives. In addition, skin tests and specific IgE against *Anisakis* extract can, to a certain extent, produce false positives in healthy subjects. Given this

situation, we seek to improve the sensitivity and specificity of the serological diagnosis of anisakiasis via the discovery of new allergens and the study of cross-reactions with other organisms.

One of the *Anisakis*' allergens, tropomyosin (Ani s 3), presents a very simple alpha helix folding and behaves like an invertebrate panallergen, given that it is present in practically all organisms, and that its structure is very similar in all of these. Tropomyosin has the peculiarity of being allergenic when it comes from an invertebrate organism (*e.g.*, shrimp, *etc.*), but it does not seem to be allergenic if its source is a vertebrate (*e.g.*, pork, *etc.*). Therefore, we aimed to identify the primary and secondary structural differences between invertebrate (allergenic) and vertebrate (non-allergenic) tropomyosins, as well as their differences in digestibility and post-translational modifications in order to improve our understanding of the causes of their allergenicity.

We found that there were differences between the vertebrate and invertebrate tropomyosin sequences, in the proportion of the amino acids lysine (K), arginine (R), phenylalanine (F) and asparagine (N). In addition, when we compared the tropomyosins of both groups of organisms, there were important differences in the amino acids at positions 10, 60, 110, 127, 144, 201, 214 and 255, both in their electric charges and molecular volume. Likewise, the probability of alpha helix folding in the invertebrate tropomyosins was lower than in all vertebrate tropomyosins, suggesting that the lack of alpha helix folding is related to the immunogenicity of the tropomyosins. None of the above-mentioned invertebrates presented alpha helix folding in region 133-135 and 201-206.

We also built three-dimensional tropomyosin models from 26 species of organisms, seven of them vertebrates and 19 invertebrates, to identify the epitopes on their surface and group them by topological similarity. Thus, we established a methodology for the bioinformatic analysis of molecular surfaces toward the development of new tools for predicting cross-reactions.

We also measured and analyzed serum diamine-oxidase (DAO) levels in patients with different chronic urticaria phenotypes by studying the correlation (or lack thereof) with fish intake. We observed that DAO levels did not differ between patients with chronic urticaria and those in the control group, but were significantly higher in CU+ patients than in CU- ones. We also observed that patients with CU+ who presented a worsening of urticaria after the intake of oily fish, had lower levels of serum DAO, and these levels were directly related to the production of specific IgE against *Anisakis*.

Because of false positives in the diagnosis of anisakiasis, we also studied the cross-reactions between *Anisakis* and other organisms, assessing the role of tropomyosin in this cross-reactivity and in the onset of chronic urticaria. Patients with chronic urticaria presented higher levels of IgE against all the studied extracts than those patients without chronic urticaria. We observed a reduction of allergenicity in the extracts that were subjected to cooking, but IgA and IgG recognition were not affected. We also found that *Anisakis* tropomyosin was not a major allergen because it was recognized by only 15.4% (less than 50%) of patients sensitized to *Anisakis*. Similarly, the protective role of IgA and anti-tropomyosin IgG4 was demonstrated by the decreased levels of both isotypes in patients with urticaria when compared with control subjects. Finally, it was observed that a previous sensitization to shrimp tropomyosin could generate a cross-recognition of *Anisakis* tropomyosin, thereby contributing to false positives for *Anisakis* when diagnosed by ImmunoCAP®.

We also worked to obtain and purify new possible *Anisakis* allergens such as hemoglobin, myophilin and arginine kinase so that we could measure and compare IgE levels in *Anisakis*-sensitized patients and develop a more sensitive and specific tool for the diagnosis of anisakiasis. Firstly, *Anisakis* hemoglobin was considered a new major allergen of the parasite and is included in the official database under the name Ani s 13. We demonstrated the absence of cross-reactivity with *Ascaris* hemoglobin (a parasitic nematode that is closely related phylogenetically), and our bioinformatic analyses of epitopes predicted the presence of a unique epitope in *Anisakis* hemoglobin, which seems to indicate that it is a very specific protein. Using ultracentrifugation, this new allergen was purified in its native form and used to coat ELISA plates, which reached positivity rate of 72.1% in *Anisakis*-sensitized patients and 90% in GAA patients. The quaternary structure of Ani s 13 was examined using analytical ultracentrifugation and transmission electron microscopy, and was found to consist of tetramers and octamers, with the latter demonstrating a higher content of heme group.

On the other hand, despite the fact that *Anisakis*' myophilin and arginine kinase were sequenced, cloned and purified for the first time, the patients that we studied did not recognize them, so these could not be considered allergenic under the conditions of our experiment.

Finally, the existing dogma about the non-allergenicity of vertebrate tropomyosins was challenged by the study of an *Anisakis*-sensitized patient with allergies to mites, shellfish and several fish species in which fish tropomyosins (vertebrates) were shown to be allergenic. This result prompted us to perform a broader study to determine the presence of IgE against fish in patients who had adverse symptoms to the ingestion of fish and to study the role of its tropomyosin as a clinically relevant allergen. Fish tropomyosin was recognized by 10 out of 19 patients, and all patients with gastrointestinal complaints resulting from the intake of fish showed a tropomyosin-compatible IgE band. The tropomyosins of cod, albacore and swordfish were recognized by the majority of the patients even though three of the 10 patients claimed no adverse reactions from these fish species. Thus, it was demonstrated that the tropomyosin of vertebrates (fish) could be allergenic in patients who have recurrent adverse reactions after fish intake.

The main conclusions of this doctoral thesis are:

1. Invertebrate tropomyosins present regions with a lower probability of alpha helix folding than those of vertebrates and may be responsible for their allergenicity.
2. A new methodology has been developed to compare molecular surfaces and, thus, to try to predict cross-reactions in simple folding proteins.
3. Serum diamine-oxidase (DAO) levels in chronic urticaria patients depend on fish-consumption habits and – particularly in patients diagnosed with *Anisakis* sensitization-associated chronic urticaria (CU+) – are dependent on the production of specific IgE against *Anisakis*.
4. In the CU+ patients, the presence of low levels of DAO predisposes them to an exacerbation of urticaria after fish intake.
5. Hemoglobin has been described as a new major allergen of *A. simplex* (Ani s 13).
6. *Anisakis* and *Ascaris* hemoglobins do not cross-react.

7. Ani s 13, in combination with the current reference allergens, would improve sensitivity and specificity in the diagnosis of anisakiasis.
8. Tetramers and octamers were the most abundant oligomers of Ani s 13, but the octamers were the ones with the highest content of attached heme group.
9. Under our experimental conditions, myophilin and arginine kinase cannot be considered *Anisakis* allergens.
10. There is low cross-reactivity between *Anisakis* and different local organisms that are involved in allergic processes, such as parasitic nematodes, domestic arthropods and shellfish.
11. *Anisakis* tropomyosin (Ani s 3) is not a major allergen of *Anisakis*.
12. The cooking of octopus (*Octopus vulgaris*) and mussels (*Mytilus edulis*) seems to be an effective mechanism for reducing the binding of IgE, but not IgG and IgA.
13. IgA and anti-tropomyosin IgG4 levels are lower in patients with urticaria compared with control subjects, confirming their protective role in chronic urticaria.
14. The positivity of IgE against whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ELISA is associated with the positivity to *Anisakis* by ImmunoCAP[®] contributing to the occurrence of false positives.
15. Tropomyosin could be an important allergen in patients who have recurrent adverse reactions after fish intake.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Anisakis simplex*

1.1.1. Generalidades

Anisakis simplex es una especie de nematodo marino parásito de distribución cosmopolita perteneciente a la familia *Anisakidae*, orden *Ascaridida* y clase *Chromadorea* ([NCBI Taxonomy](#), [ITIS](#)). El género *Anisakis* Dujardin, 1845, comprende 10 especies válidas (D'Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci *et al.*, 2009; Mattiucci y D'Amelio, 2014; Mattiucci y Nascetti, 2008) (Figura 1).

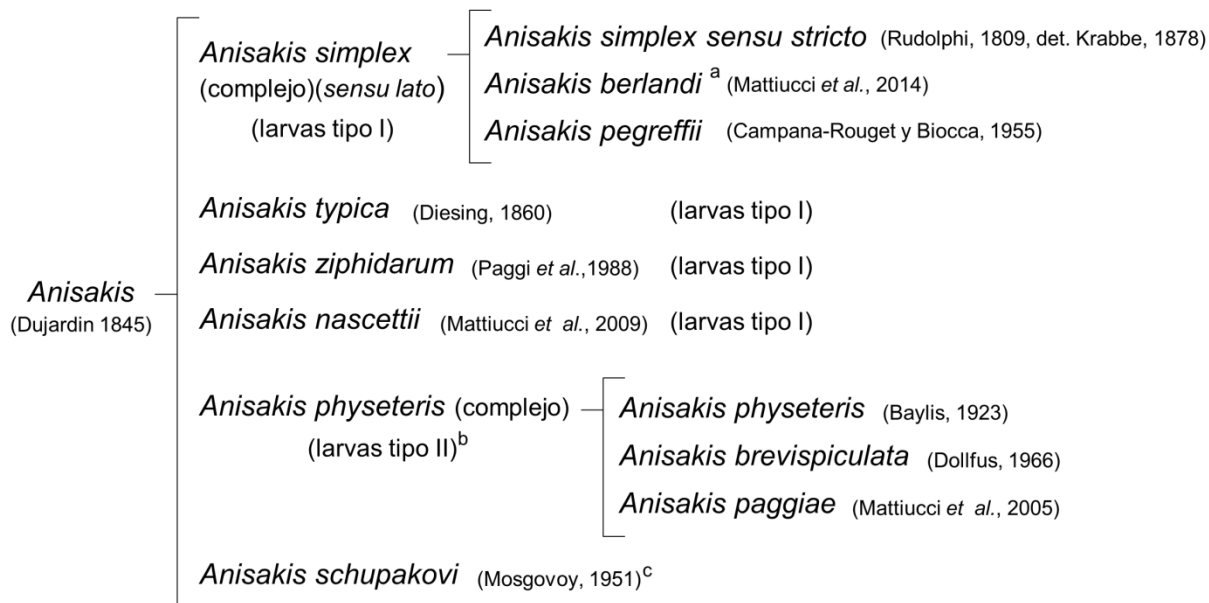


Figura 1. Especies del género *Anisakis* y morfología larvaria. Larvas con morfología tipo I presentan ventrículo más largo que ancho y habitualmente sigmoideo. Larvas con morfología tipo II presentan ventrículo más ancho que largo y nunca sigmoideo. ^aAntiguamente denominada *Anisakis simplex* C (Mattiucci *et al.*, 2014). ^bSegún la clasificación morfológica de las larvas propuesta por Shiraki en 1974 teniendo en cuenta la presencia o ausencia de la espina caudal, hay dos tipos morfológicos más: larvas tipo III y tipo IV que se corresponderían con las especies *Anisakis brevispiculata* y *A. paggiae* respectivamente (Murata *et al.*, 2011). La especie *A. physeteris* es la que conservaría una morfología de tipo II. Sin embargo, estos tipos III y IV han sido agrupados en el tipo II por ser muy imprecisos e inconsistentes (Mattiucci y Nascetti, 2008). ^cLa especie *A. schupakovi* Mosgovoy, 1951, presenta larvas que no se podrían englobar en ninguno de los dos tipos (Bagrov, 1981, 1982).

La identificación específica de estos helmintos basándonos en diferencias morfológicas es difícil para los adultos y mucho más difícil en las larvas. Los complejos *A. simplex* (*s.l.*) y *A. physeteris* son morfológicamente distinguibles en el estadio adulto y larvario, pero contienen especies que son indistinguibles salvo mediante el uso de marcadores evolutivos moleculares como por ejemplo las secuencias espaciadoras ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosómico (rDNA) 5,8S o el estudio de la secuencia de ADN mitocondrial (mtDNA) que codifica para las subunidades 1 y 2 de la citocromo c-oxidasa (*cox1* o *cox2*) mediante una reacción en cadena de la polimerasa basada en la longitud de los fragmentos generados tras aplicar enzimas de restricción (PCR-RFLP) (Mattiucci y Nascetti, 2008).

En la Figura 2 se describe gráficamente el ciclo biológico de *Anisakis*. Los mamíferos marinos y en concreto los delfines y ballenas son los principales hospedadores definitivos de *Anisakis* spp. (Mattiucci y Nascetti, 2008). Los huevos no embrionados del parásito (~ 41-58 µm) (Smith y Wootten, 1978) salen

con las heces de estos cetáceos al agua (Nagasawa, 1990). El embrionamiento tiene lugar en el fondo marino entre 7-5°C y durante 15-22 días (Højgaard, 1998). En un primer momento se creía que solo la primera muda de L1 (larva de primer estadio) a L2 sucedía dentro del huevo. Sin embargo, se descubrió que la L1 mudaba a L2 a las dos semanas del embrionamiento y en 3-4 días tenía lugar la muda a L3 también dentro del huevo (Køie *et al.*, 1995). El huevo eclosiona liberando una L3 envainada con la cutícula holgada de la L2, permaneciendo la cutícula de la L1 con la cáscara del huevo (Køie *et al.*, 1995). Estas L3 envainadas preinfectantes (0,33-0,37 mm) y nadadoras, son ingeridas por alguno de los distintos grupos de diminutos crustáceos que forman el zooplancton (copépodos y eufausiáceos). Tras ser ingeridas por los copépodos, se desenvainan y se localizan en su hemocele sin aparentemente aumentar de tamaño ni desarrollarse. Sin embargo, los eufausiáceos son hospedadores intermediarios obligatorios de *Anisakis* en los que la L3 crece (4,2-20 mm) se desenvaina y se convierte en infectante para los hospedadores definitivos (Køie, 2001). Estos crustáceos son ingeridos directamente por los hospedadores definitivos, cerrándose el ciclo; o bien por hospedadores paraténicos, que son los peces y cefalópodos. Dentro de estos hospedadores la L3 empieza a enquistarse en la superficie de órganos viscerales. Los peces más grandes pueden ingerir a otros más pequeños con L3 lo que conlleva una acumulación de larvas con el tiempo. Las L3 procedentes de peces muertos o de pescados eviscerados en el mar permanecen infectantes durante seis semanas (Køie, 2001).

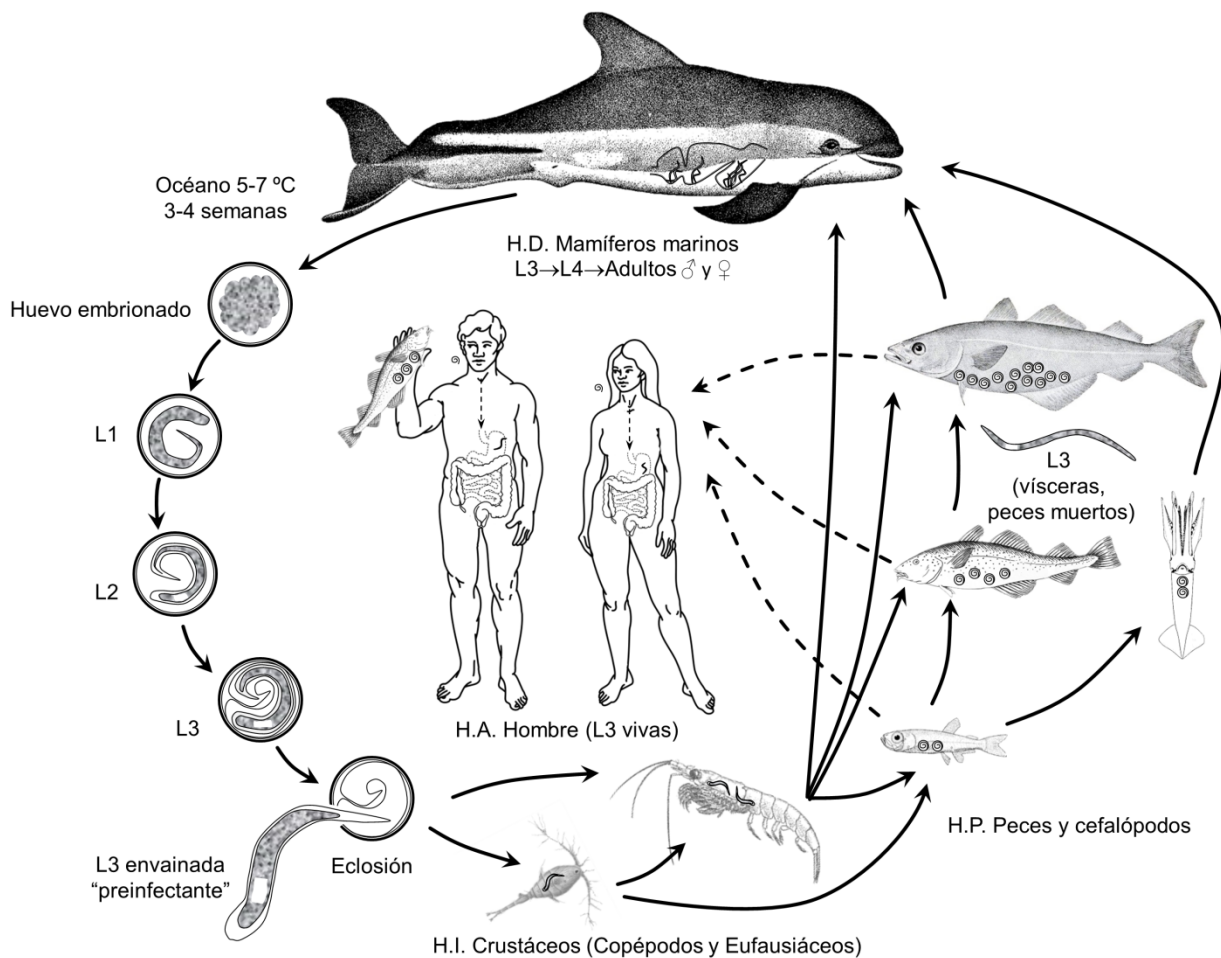


Figura 2. Ciclo biológico de *Anisakis simplex*. H.D.: hospedador definitivo, H.I.: hospedador intermediario, H.A.: hospedador accidental, H.P.: hospedador paraténico.

En el ciclo natural las L3 son ingeridas por mamíferos marinos y es en su primer, segundo y tercer estómago donde penetran zonas puntuales de la mucosa y submucosa en grupos numerosos realizando dos mudas: muda a L4 (pre-adulto) (2,8-3,5 cm) y finalmente de L4 a adulto macho (3,5-7 cm) o hembra (4,5-15 cm) (Smith y Wootten, 1978). Tras la cópula, la hembra adulta deposita los huevos fertilizados que se expulsarán con las heces del cetáceo reanudándose de nuevo el ciclo (Klimpel *et al.*, 2004).

Todo pescado parasitado por *Anisakis* puede causar una enfermedad conocida con el nombre de anisakiosis cuando es ingerido crudo o poco cocinado por los seres humanos, quienes son hospedadores accidentales en los cuales la larva no puede completar su ciclo de vida (Nagasawa, 1990). Cuando el pez es pescado y muere, las L3 se desenquistan y migran desde su localización visceral principal hacia el músculo que es la parte que normalmente se aprovecha para el consumo humano.

Las L3 de *Anisakis* se pueden encontrar vivas en derivados de pescado crudo como ahumados, semiconservas, pescado seco o en vinagre, ceviches y en especialidades como el sushi o el sashimi. Actualmente, dentro de las especies que más se consumen en España (con capturas mayores a 5000 toneladas en peso vivo), se incluyen algunas como la merluza o el jurel (Tabla 1), cuya prevalencia de parasitación por larvas de *Anisakis* puede alcanzar el 100% de los peces muestreados en algunas regiones (Tabla 2).

Tabla 1. Capturas de pesca marítima por buques pesqueros españoles en el año 2014.

Especie	Nombre común	Zona	Peso vivo (kg)
<i>Thunnus albacares</i>	Rabil	Índico occidental	106.172.625
<i>Merluccius hubbsi</i>	Merluza argentina	Atlántico suroccidental	52.699.673
<i>Scomber scombrus</i>	Caballa del Atlántico	Atlántico nororiental	36.431.699
<i>Scomber japonicus</i>	Estornino	Atlántico nororiental	34.543.533
<i>Illex argentinus</i>	Pota argentina	Atlántico suroccidental	33.463.682
<i>Nototbeniidae</i>	Tramas, doradillos	Atlántico suroccidental	33.205.968
<i>Patagonotothen ramsayi</i>	Nototenia coluda	Atlántico suroccidental	32.093.187
<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza europea	Atlántico nororiental	31.632.080
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardina europea	Atlántico nororiental	28.873.520
<i>Micromesistius pontassou</i>	Bacaladilla	Atlántico nororiental	24.331.006
<i>Engraulis encrasicolus</i>	Boquerón	Atlántico nororiental	22.820.187
<i>Prionace glauca</i>	Tiburón azul	Atlántico centrooriental	20.776.316
<i>Thunnus obesus</i>	Patudo	Índico occidental	19.413.004
<i>Gadus morhua</i>	Bacalao del Atlántico	Atlántico nororiental	16.378.311
<i>Trachurus trachurus</i>	Jurel del Atlántico	Atlántico nororiental	15.559.127
<i>Trachurus spp.</i>	Jureles	Atlántico nororiental	14.320.444
<i>Xiphias gladius</i>	Emperador	Pacífico suroriental	14.229.412
<i>Percoidaei</i>	Percoideos	Atlántico nororiental	13.509.743
<i>Loligo gahi</i>	Calamar patagónico	Atlántico suroccidental	12.826.896
<i>Boops boops</i>	Boga	Atlántico nororiental	11.184.177
<i>Merluccius senegalensis</i>	Merluza del Senegal	Atlántico centrooriental	10.922.110
<i>Thunnus alalunga</i>	Atún blanco	Atlántico nororiental	8.967.454
<i>Merluccius spp.</i>	Merluzas	Atlántico suroriental	8.505.769
<i>Merluccius paradoxus</i>	Merluza de altura del Cabo	Atlántico suroriental	6.285.247
<i>Lophiidae spp.</i>	Rapes	Atlántico nororiental	5.532.455
<i>Macruronus magellanicus</i>	Merluza de cola	Atlántico suroccidental	5.350.765

Fuente: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/pesca-maritima/>

Tabla 2. Prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en pescados de diferentes áreas geográficas.

Área	Especie	Número de muestras	Prevalencia; intensidad (media±SD, rango)
Mar de Barents	Bacalao	212 (océano) 207 (costa)	96%; 4,3 y 6,1 (océano y costa, respectivamente)
Estrecho de Skagerrak (sureste de Noruega)	Carbonero	33	100%; 193,6 (32-390)
Costa portuguesa	Jurel	58	76%; 6,2±10,2 (1-46)
	Caballa	45	96%; 12,7±14,8 (1-80)
	Merluza	3	100%; 51,3±5,7 (45-59)
	Bacaladilla	65	94%; 14,3±18,9 (1-89)
Madeira	Tonino	154	70%; 2,2±0,1 (1-6)
Costa mediterránea (España)	Bacaladilla (17-24 cm)	224	12%; 1,2
	Bacaladilla (>25 cm)	77	17%; 1,5
	Merluza	63	41%; 1,7
Costa mediterránea (Italia)	Jurel	177	80-100%, 19,3-70,7
Galicia	Merluza, bacaladilla, maruca, aguja, rape, caballa, chopo y jurel	402	>74%; >14
Francia	Bacalao	304	2%; 1,5±0,8 (1-3)
	Merlán	169	3,6%; 1,1±0,5 (1-2)

Tabla basada en el informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre parásitos del pescado (EFSA, 2010) con modificaciones: (Abollo *et al.*, 2001; Klimpel *et al.*, 2004; Manfredi *et al.*, 2000; Valero *et al.*, 2006). SD: Desviación estándar.

En relación a los cefalópodos, un reciente estudio con 45 pulpos (*Octopus vulgaris*), 34 calamares (*Loligo vulgaris*) y 123 potas (*Illex coindetti*) pescados en las costas del Mediterráneo español, demostró la ausencia en músculo de larvas de *Anisakis* (Picó-Durán *et al.*, 2016).

Los peces de río están libres de *Anisakis* y los de acuicultura, como el salmón del Atlántico, que hayan sido alimentados desde su nacimiento con piensos extrusionados en jaulas flotantes o en tanques terrestres, presentan un riesgo insignificante de parasitación por *Anisakis* (EFSA, 2010). En España de 2010 a 2012 se llevó a cabo un estudio encargado por la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos para la evaluación de la presencia de *Anisakis* en pescados de acuicultura marina españoles. Este informe concluyó que no se encontraron larvas de *Anisakis* en ninguno de los 1.080 ejemplares de dorada, lubina, rodaballo y corvina procedentes de 45 granjas del Atlántico y del Mediterráneo español (APROMAR, 2012).

Las larvas de *Anisakis* mueren por tratamientos térmicos (congelación/calentamiento), pH, altas concentraciones de sal y vinagre, altas presiones o altas dosis de rayos gamma (Tabla 3). Las medidas de prevención adoptadas en el Reglamento (CE) 853/2004 (UE, 2004) y la norma española publicada en el Real Decreto 1420/2006 se centran en la prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. En este documento se establece que todos los productos de la pesca destinados a consumirse crudos o prácticamente crudos se deben congelar a -20°C durante un periodo mínimo de 24 horas ya que este tratamiento mata las larvas de *Anisakis*.

Además de la congelación, las larvas de *Anisakis* mueren cuando son sometidas a una temperatura $>60^{\circ}\text{C}$ durante, al menos, un minuto (EFSA, 2010); por lo que son seguros los pescados hervidos y fritos. También son seguros a la plancha, siempre que se verifique que el pescado está “bien hecho” con las proteínas coaguladas (textura blanquecina mate, separable fácilmente de las espinas) y al microondas, siempre que se den dos vueltas al pescado durante la cocción para eliminar puntos fríos y dejando reposar la pieza, al menos, dos minutos para que la temperatura se distribuya por conducción a todo el producto. Para todos estos productos de la pesca que vayan a cocinarse no es necesaria congelación previa (Alonso *et al.*, 2016; Oliver *et al.*, 2007).

Las larvas de *Anisakis* también son sensibles al ácido acético diluido al 2,5% y NaCl al 6% durante, al menos, 35 días o al ácido acético diluido al 6% con un 12% de sal durante, al menos, 13 días. Por ello el método tradicional de elaboración de boquerones en vinagre (6% ácido acético y sal durante 4-24 horas) es insuficiente para matar las larvas de *Anisakis* (Oliver *et al.*, 2007; Sánchez-Monsalvez *et al.*, 2005).

Las larvas de *Anisakis* son sensibles al NaCl a una concentración del 9% en el pescado durante seis semanas, por ello son seguras las semiconservas de anchoas ya que permanecen de 5-12 meses con una concentración de más del 12% de sal. Las larvas también mueren con niveles entre el 10-20% de sal durante, al menos, cuatro semanas o con niveles de más del 20% de sal durante, al menos, tres semanas (Oliver *et al.*, 2007).

Tabla 3. Condiciones y tratamientos efectivos para matar las larvas de *Anisakis simplex*.

Pescado	Tratamiento	Parámetros
Arenque	Salado	5% NaCl, >17 semanas 6-7% NaCl, 10-12 semanas 8-9% NaCl, 6 semanas
	Salado en seco	20 días
Anchoa	Marinado	10% ácido acético + 12% NaCl mínimo 5 días
		2,5% ácido acético + 6% NaCl 35 días
		10% ácido acético + 12% NaCl 5 días
Sardina	Marinado	6% ácido acético + 12% NaCl + 4°C 13 días
Arenque	Marinado	28 días en escabeche (6,3% NaCl+ 3,7% ácido acético)
Salmón rojo y rocote canario	Congelación	-35°C 15h + -18°C 24h
Platija	Congelación	-15°C 96 h; -20°C 60 h; -30°C 20 h; -40°C 9 h
	Congelación	-15°C pocos minutos
Larvas <i>in vitro</i>	Calentamiento	60°C >15 min
		$>60^{\circ}$ (temperatura interior) 1 min
		74°C 15 s 60°C 10 min (filetes 3 cm)
	Extractos de plantas	[6]-shogaol a 62,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; [6]-gingerol a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Salmón real y platija	Altas presiones	414 MPa 30-60 s
		276 MPa 90-180 s
		207 MPa 180 s
Arenque	Irradiación	6-10 kGy
Congrio	Irradiación	>1 kGy

Las referencias de cada tratamiento se pueden consultar en el informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre parásitos del pescado (EFSA, 2010).

1.1.2. Patogenia

La enfermedad causada por la penetración de larvas infectantes (L3) de *Anisakis* a través del intestino humano recibe el nombre de anisakiosis (van Thiel, 1962). No se debe confundir con la anisakidosis, que es causada por las L3 de los miembros de la familia *Anisakidae*: *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* (Mattiucci y Nascetti, 2008). Los síntomas alérgicos como la urticaria asociada a la penetración intestinal de las larvas de *Anisakis*, fueron descritos por primera vez en Japón (Kasuya *et al.*, 1990). A partir de los años noventa se empezaron a describir los primeros casos de alergia a *Anisakis* en España (Audicana *et al.*, 1995) y se siguieron los protocolos clásicos de las alergias alimentarias, restringiendo estrictamente la ingesta de pescado por parte de los pacientes. Hoy en día, y gracias a las investigaciones llevadas a cabo desde finales de los noventa (Alonso *et al.*, 1999), estos pacientes pueden ingerir pescado (cocinado o congelado previamente si va a ser ingerido crudo) ya que se ha demostrado que los síntomas alérgicos se producen solo cuando la larva viva de *A. simplex* atraviesa activamente el tracto gastrointestinal (Daschner *et al.*, 2012). Ningún paciente, incluso los que han sufrido anafilaxia, reacciona frente a las larvas muertas, frente al extracto proteico total o frente al conjunto de proteínas de excreción/secreción (ES) de larvas de *Anisakis* en pruebas de provocación (Alonso-Gómez *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004; Sastre *et al.*, 2000). Recientemente, experimentos con ratas también han confirmado la seguridad de la ingesta de larvas muertas (Abe y Teramoto, 2014).

Actualmente existen diferentes fenotipos clínicos de esta enfermedad:

-Anisakiosis gástrica (AG): es la más frecuente en Japón (91,6% de los casos) (Asaishi *et al.*, 1980a) y se caracteriza por una reacción inflamatoria aguda, de tipo alérgico y local debida a la penetración gástrica o intestinal del nematodo. Mediante endoscopia se observan lesiones edematosas en torno a la zona donde ha penetrado la larva ocasionando síntomas como dolor epigástrico o intestinal grave, náuseas y vómitos en las 12 horas siguientes a la ingesta del pescado crudo o poco cocinado parasitado con las larvas de *Anisakis*. En estudios histológicos con animales de laboratorio, las biopsias gástricas de conejo muestran la presencia de neutrófilos, eosinófilos y degradación fibrinoide incluso en lesiones en las que la larva ya se había desprendido (Asaishi *et al.*, 1980b). En Japón es práctica habitual la extracción manual de las larvas mediante endoscopia para eliminar de forma inmediata el intenso dolor abdominal (Akasaka *et al.*, 1979; Sugimachi *et al.*, 1985). También se pueden formar granulomas en los que se puede observar la L3 ya muerta en cortes histológicos de las lesiones (Ishikura *et al.*, 1993).

-Anisakiosis gastroalérgica (AGA): es la más frecuente en España (98% de los casos) (Daschner y Cuéllar, 2010). Se pueden producir igualmente síntomas digestivos, pero éstos son sobrepasados por síntomas alérgicos agudos generalizados que van desde urticaria o angioedema, hasta anafilaxia (Daschner *et al.*, 2000). Estas manifestaciones alérgicas podrían estar relacionadas con un mecanismo de defensa natural mediado por IgE para expulsar la larva tras las primeras horas post-infección (Daschner y Cuéllar, 2010). La AGA se considera siempre una infección secundaria (existe IgE específica previamente, es decir, sensibilización a *Anisakis*) en la que se produce una estimulación policlonal de linfocitos Th1 y Th2 incrementándose los niveles de IgE total e IgM, IgG, IgG4, IgE e IgA específicas (Daschner *et al.*, 2002). En cuanto al perfil de citoquinas, estos pacientes muestran niveles mayores de citoquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 que los pacientes con urticaria crónica asociada a

sensibilización por *Anisakis* (UC+) (Cuéllar *et al.*, 2012a). La AGA es diagnosticada tras un detallado análisis de la historia clínica del paciente en la que debe aparecer la ingesta de pescado crudo o poco cocinado hasta 48 horas antes del comienzo de los síntomas junto con pruebas cutáneas positivas (*Skin Prick Test* – SPT) e IgE específica sérica frente a *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2000). A pesar del carácter agudo de una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE, en este fenotipo de la enfermedad el comienzo de los síntomas no siempre es inmediato lo que dificulta el diagnóstico cuando el paciente que acude a la unidad de emergencias no es interrogado sobre la ingesta reciente de pescado crudo (Daschner *et al.*, 2000).

-Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+): en estos pacientes, un episodio de parasitación previa por *Anisakis* parece ser capaz de inducir urticaria crónica en individuos genéticamente predispuestos, los cuales constituyen hasta el 50% de los pacientes que acuden a la consulta de alergia por urticaria crónica en España (Daschner *et al.*, 2005). La urticaria crónica es una patología sin una causa definida pero se conoce bien su mecanismo efector: la degranulación de los mastocitos. La urticaria crónica se caracteriza por la aparición de habones espontáneamente al menos dos veces por semana en un periodo de como mínimo seis semanas. Además, estos pacientes con UC+ han presentado una historia de alergia inducida por pescado o síntomas abdominales junto con pruebas cutáneas positivas e IgE específica frente a *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2010a). Aunque el conocimiento de los mecanismos inmunológicos previos a la degranulación de los mastocitos es escaso para la urticaria crónica, existen algunas evidencias para incluir a la urticaria crónica como un trastorno inflamatorio (Bingham, 2008). Algunos estudios han destacado que diferentes citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17) están implicadas en la gravedad de esta enfermedad (Cuéllar *et al.*, 2010; Kasperska-Zajac *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2008). Al igual que en la AGA, estos pacientes están sensibilizados a *Anisakis* y también presentan IgG, IgG4 e IgE específicas pero en menor cantidad que en los pacientes con AGA (Daschner *et al.*, 2014; Daschner y Pascual, 2005). Al medir los niveles de citoquinas en suero de estos pacientes se encuentran incrementadas la IL-10 y el TGF- β (anti-inflamatorias) debido al contacto previo con antígenos inmunomoduladores liberados por las larvas vivas de *Anisakis*, pero en una proporción más baja que en los pacientes con AGA (Daschner *et al.*, 2011, 2013). Además el IFN- γ (citoquina pro-inflamatoria) parece estar incrementado en los pacientes con UC+ en comparación con los pacientes diagnosticados de AGA (Cuéllar *et al.*, 2012a), lo que indica que los pacientes UC+ producen más citoquinas pro-inflamatorias y menos anti-inflamatorias que los AGA. Los linfocitos de los pacientes con UC+ producen más IL-2, IL-4, e IFN- γ que los linfocitos de pacientes que solo presentan urticaria crónica no asociada a la sensibilización por *Anisakis* cuando se enfrentan al extracto de L3 de *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2013). En estudios recientes, se ha observado que una infección crónica asintomática debida al parásito *Toxoplasma gondii* potencia la urticaria asociada a la sensibilización por *Anisakis* (Fernández-Figares *et al.*, 2014). Los pacientes UC+ también suelen presentar exacerbaciones de su urticaria o molestias gastrointestinales tras la ingesta de pescado aunque se ha observado también que la urticaria no mejora por una dieta exenta de pescado (Daschner *et al.*, 2013). Dado que el pescado es rico en el aminoácido histidina, que es transformado en la amina biógena histamina (Prester, 2011) los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en estos pacientes son de interés para la investigación sobre esta enfermedad ya que una

producción de DAO insuficiente podría incrementar los niveles de histamina y desencadenar los síntomas urticariales. La DAO ([EC 1.4.3.22](#)) es una enzima que oxida diaminas como la histamina y algunas monoaminas primarias y presenta un centro activo con el cofactor TOPA (2,4,5-trihidroxifenilalanil)-quinona-Cu²⁺ formado mediante modificación postraduccional de un residuo de tirosina altamente conservado (Schwelberger y Bodner, 1997). Es una proteína N-glicosilada y posee péptido señal, hecho que demuestra que la proteína es secretada aunque la DAO se detecta principalmente en el interior de vesículas dentro de las células epiteliales de la mucosa intestinal. Estas vesículas se liberan para degradar la histamina al igual que sucede en la placenta y en los riñones, principalmente (Schwelberger, 2010; Schwelberger *et al.*, 1998). La histamina es el mediador principal que ocasiona los habones de la urticaria y se encuentra en nuestros mastocitos o en ciertos alimentos. De hecho, entre el 30-40% de los pacientes con urticaria crónica atribuyen sus síntomas a una intolerancia alimentaria (Guida *et al.*, 2000). Además, varios estudios en humanos y animales han revelado una relación inversa entre la permeabilidad del intestino delgado y la actividad de la DAO (Honzawa *et al.*, 2011). Estos niveles de DAO se medían inicialmente tras la administración intravenosa de heparina para desplazar la DAO entérica a la circulación periférica (Lessof *et al.*, 1990), pero en la actualidad existen kits de ELISA comerciales más sensibles que hacen posible asignar los niveles plasmáticos de la enzima en el suero directamente (<http://www.immundiagnostik.com>).

Las diferentes manifestaciones de la anisakiosis parecen depender en gran medida de la respuesta inmunitaria del hospedador. Los hospedadores con fuertes respuestas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) son capaces de expeler la larva a través de reacciones alérgicas mientras que los individuos que tienden hacia respuestas Th1 (TNF- α , IL-2 e IFN- γ) desarrollan una respuesta inflamatoria menos violenta (la patogenia se representa esquemáticamente en la Figura 5) (Nieuwenhuizen y Lopata, 2013). Los pacientes sensibilizados a *Anisakis* presentan un pico de IgE específica a las 4-6 semanas tras el contacto con las larvas de *Anisakis* vivas (Daschner *et al.*, 2002, 2014) y a continuación disminuye progresivamente incluso pudiendo permanecer detectable hasta transcurridos ocho años (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016a). El papel de la IgG4 en la patogenia de *Anisakis* parece ser muy importante (Daschner *et al.*, 2014) por ser un isotipo de inmunoglobulina que presenta mayor afinidad que la IgE, que suele presentarse en paralelo a esta clase de anticuerpo (Wu y Zarrin, 2014) y que por lo tanto puede competir con ella por la unión al alérgeno.

1.1.3. Diagnóstico y tratamiento

Es cierto que cuando se trata de pacientes con AG, hay tiempo para poder observar las larvas por endoscopia penetrando la mucosa intestinal cuando los pacientes sienten el dolor abdominal y consecuentemente se pueden retirar con la pinza del instrumento. Sin embargo, en España, dado que la mayoría de los casos son de AGA, las larvas pueden no ser observables porque el propio individuo a través de la fuerte reacción alérgica mediada, las ha expelido a las pocas horas de comenzar los síntomas (Daschner y Cuéllar, 2010).

El diagnóstico de rutina de la anisakiosis suele consistir en primer lugar en la anamnesis del paciente, valorando la ingesta de pescado crudo o poco cocinado hasta 48 horas antes de la aparición de los

síntomas; y continuando con el serológico, con niveles positivos de IgE específica en el suero y acompañándose de pruebas cutáneas positivas con el extracto proteico de larvas de *Anisakis*.

La IgE específica frente a *Anisakis* es positiva cuando el paciente presenta un valor mayor o igual a 0,35 kU/l (clase 1 o superior) medida mediante ImmunoCAP® (Phadia AB, Uppsala, Suecia) (Ewan y Coote, 1990). Asimismo, se ha observado que se consigue una mejor especificidad si se emplea un valor umbral de positividad de 0,7 kU/l, cuando se trabaja con el antígeno de *Anisakis* (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014). Por otro lado, la prueba cutánea se considera positiva cuando, tras la inoculación cutánea del extracto alergénico, el paciente desarrolla un habón con un diámetro medio de, al menos, 3 mm. Se suele utilizar histamina al 1% como control positivo y solución salina al 0,9% de NaCl como control negativo (Daschner *et al.*, 2000).

El tratamiento en Japón suele consistir en la extracción de la larva por endoscopia cuando ésta es accesible. En España el tratamiento es generalmente sintomático para evitar primero el shock anafiláctico [adrenalina intramuscular (1 mg/ml) 0,01 mg/kg con un máximo de 0,5 mg para un adulto y 0,3 mg para un niño] (Simons *et al.*, 2011) y/o la urticaria [educación y evitación del desencadenante: ingerir larvas vivas de *Anisakis*-congelar el pescado y antihistamínicos de segunda o tercera generación sin efecto sedante-pauta descendiente de corticoides o en casos refractarios ciclosporina] (Ferrer-Puga *et al.*, 2010).

Aunque los pacientes que han sufrido un episodio de AGA suelen presentar pruebas cutáneas positivas y tener IgE específica frente a *Anisakis*, pueden existir falsos negativos. En un estudio realizado por Daschner *et al.*, (2000), dos de los 40 pacientes con AGA investigados tuvieron pruebas cutáneas negativas frente al extracto proteico de *Anisakis* y uno no presentó IgE específica frente al parásito.

Por el contrario, las pruebas cutáneas y la IgE específica frente al extracto de *Anisakis* en cierta medida son falsamente positivas en sujetos sanos. En el trabajo anterior (Daschner *et al.*, 2000), cuatro (19%) de 21 sujetos del grupo control presentaron pruebas cutáneas positivas al extracto de *Anisakis* incluso sin haber sufrido una reacción alérgica. En un estudio multicéntrico realizado en España 56 (13,1%) de 427 sujetos sin episodios previos de angioedema o urticaria estaban sensibilizados a *Anisakis* (Fernández de Corres *et al.*, 2001). Esta alta tasa de sensibilización subclínica se debe probablemente a episodios de parasitación previa en individuos expuestos al nematodo vivo por sus hábitos alimentarios que no han sido diagnosticados previamente (Daschner *et al.*, 2012). Además un reciente estudio mostró positividad a *Anisakis* mediante pruebas cutáneas en 25 (3,2%) de 789 pacientes alérgicos a los ácaros, cuatro (25%) de 16 pacientes alérgicos al marisco y tres (8,3%) de 36 pacientes alérgicos a los ácaros y al marisco al mismo tiempo (López-Matas *et al.*, 2016).

Además de los análisis de rutina, los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 son en la actualidad la mejor opción para el diagnóstico serológico de la anisakiosis en términos de sensibilidad y especificidad (Anadón *et al.*, 2010). El fragmento recombinante del alérgeno Ani s 7 (t-Ani s 7) es considerado un marcador específico del contacto previo de un paciente con larvas vivas de *Anisakis* (Anadón *et al.*, 2009). Existe en la actualidad un kit de ELISA comercial que utiliza dos alérgenos recombinantes (Ani s 1 y t-Ani s 7) y se comercializa con el nombre de Trisakis 170® (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España).

A pesar de ser los actuales alérgenos de referencia para el diagnóstico de la anisakiosis, los estudios realizados demuestran que el 17,9% de los pacientes AGA y el 57,5% de los pacientes UC+ fueron negativos a Ani s 1; y el 7,1% de los pacientes AGA y el 7,5% de los pacientes UC+ fueron negativos a Ani s 7 (Cuéllar *et al.*, 2012b) por lo que es necesario el desarrollo de métodos más sensibles.

1.2. Alérgenos de *Anisakis*

1.2.1. Definición y clasificación actual

Un alérgeno se define como un antígeno capaz de producir anticuerpos IgE. La estimulación de la producción de IgE es inherente a las infecciones parasitarias y especialmente a las producidas por helmintos sin necesidad de que siempre se produzcan reacciones alérgicas. En el caso de *Anisakis* es preciso que la larva viva penetre desde la luz intestinal para que la reacción alérgica se produzca, por lo tanto los “alérgenos” de *Anisakis* no se comportan como los alérgenos alimentarios (Daschner *et al.*, 2012). Por este motivo existen otras definiciones en la bibliografía que incluyen requisitos especiales para considerar a una sustancia como alérgeno (Daschner *et al.*, 2012). Uno de estos requisitos es que el antígeno no sea parasitario. Sin embargo, los antígenos parasitarios inductores de IgE presentes en las larvas de *Anisakis* se han estudiado de la misma forma que el resto de alérgenos alimentarios. De hecho, la clasificación de alérgenos ofrecida por el subcomité de nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (WHO/IUIS) (www.allergen.org), considera que todos los alérgenos de *Anisakis* son alérgenos alimentarios. Otro de los requisitos es el estatus de atopia necesario en el individuo para responder frente al antígeno produciendo IgE (Daschner *et al.*, 2012). Por ello, un alérgeno podría ser definido como un antígeno no parasitario capaz de producir anticuerpos IgE en un individuo atópico (Goldsby *et al.*, 2003). Los alérgenos se nombran generalmente con el siguiente formato: **Ggg(g) e(e) n.iivv**, es decir, las tres primeras letras del género (**g**) o las cuatro primeras en casos de posible confusión o ambigüedad (ejemplo **Cand** a 1.0101 de *Candida albicans* y **Can** f 1.0101 de *Canis familiaris*) y la primera o las dos primeras del atributo de la especie (**e**) en casos de ambigüedad y sin cursiva (ejemplo: Asp **f** 13.0101 es una serín-proteasa de *Aspergillus fumigatus* y Asp **fl** 13.0101 es la homóloga de *Aspergillus flavus*) (Breiteneder y Chapman, 2014). A continuación se van añadiendo números (**n**) según el orden de descubrimiento generalmente o bien si existe algún alérgeno homólogo con ese número en alguna otra especie (ejemplo: Ani s **3**.0101 es la tropomiosina de *Anisakis simplex* y Asc l **3**.0101 es la tropomiosina de *Ascaris lumbricoides* siendo esta el segundo alérgeno descubierto de *Ascaris*). Sin embargo, la numeración en relación a alérgenos homólogos de otras especies no es una regla ya que, como se muestra en este ejemplo, Asc l **13**.0101 y Asc s **13**.0101 son glutatión S-transferasas de *Ascaris lumbricoides* y *A. suum* y sin embargo, Ani s **13**.0101 es la hemoglobina de *Anisakis simplex*. Los dos dígitos que indican el número de isoalérgeno (**ii**) y los dos dígitos que indican el número de variante (**vv**) se colocan detrás del número de alérgeno separados por un punto (ejemplo: Chi t **3.0702** es una hemoglobina del díptero *Chironomus thummi* isoalérgeno 7 y variante 2 del alérgeno Chi t 3). Por regla general estos cuatro últimos dígitos se suelen obviar cuando se hace referencia a todos los isoalérgenos y variantes en general (ejemplo: se utiliza Ani s 11 cuando nos referimos a los dos isoalérgenos Ani s 11.0101 y Ani s 11.0201 de *Anisakis simplex*).

Para caracterizar un nuevo alérgeno se necesita la siguiente información (WHO/IUIS 2-7-2014):

1. Origen del alérgeno: especie, familia y orden del organismo de procedencia siguiendo la clasificación taxonómica actual de Uniprot (<http://www.uniprot.org/taxonomy/>) o del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).
2. Tejidos donde se expresa el alérgeno de forma natural y a los que las personas están expuestos.
3. Datos bioquímicos:
 - a. Peso molecular (kDa).
 - b. Glicosilaciones y modificaciones postraduccionales (no obligatorio).
 - c. Secuencia del gen codificante y de la proteína. Necesarios los números de acceso en las bases de datos de proteínas: europea, americana o japonesa (EMBL/GenBank/DDBJ).
 - d. Existencia o no de péptido señal y posiciones aminoacídicas que comprende (los métodos de predicción bioinformáticos son válidos).
 - e. Confirmación de la secuencia del alérgeno mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (no obligatorio).
 - f. Referencia de la secuencia si está publicada o expuesta en congresos.
4. Alergenicidad: los alérgenos serán aceptados si son reconocidos por la IgE de al menos cinco sueros de pacientes alérgicos a la fuente del alérgeno o al menos representan el 5% de todos los sueros testados en el estudio frente a esa fuente del alérgeno.
 - a. Criterios de selección de los pacientes alérgicos del estudio: identificar si son alérgicos mediante historia clínica o estudios de provocación con la fuente del alérgeno.
 - b. Método de determinación de la IgE específica al alérgeno de los pacientes (tests *in vitro*, pruebas cutáneas, pruebas celulares).
 - c. Ruta de exposición (inhalación, ingestión *etc.*).
 - d. Evidencia experimental de alergenicidad (ImmunoCAP[®], ELISA, inmunotransferencia, prueba cutánea).
 - e. Referencia acerca de la alergenicidad si ha sido publicada o expuesta en congresos.

Como se puede observar los métodos más habituales empleados en la caracterización de alérgenos son la clonación del gen y expresión del alérgeno recombinante, electroforesis en gel de poliacrilamida, inmunotransferencia, ELISA, ImmunoCAP[®], pruebas cutáneas; y técnicas más complejas como la electroforesis en dos dimensiones, espectrometría de masas, difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (Cirkovic-Velickovic *et al.*, 2005). Para clasificar a los alérgenos como resistentes a la digestión (clase 1) o lábiles (clase 2) se deben realizar estudios de digestibilidad con fluido gástrico simulado (*Simulated Gastric Fluid* – SGF) (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2008).

Varios grupos de investigación han explorado los alérgenos de *Anisakis* en conjunto, habiendo sido cribados en un primer momento 16 posibles alérgenos (Arlan *et al.*, 2003). Hoy en día, varias decenas de alérgenos han sido propuestos mediante estudios de proteómica (Arcos *et al.*, 2014; Fæste *et al.*, 2014) o de secuenciación masiva (Baird *et al.*, 2016). Hasta la fecha oficialmente existen 14 alérgenos de *A. simplex* caracterizados (Tabla 4).

Tabla 4. Alérgenos caracterizados de *Anisakis simplex*.

Nombre	Familia	kDa	Secuencias	Estructura 3D	Positividad (%)
Ani s 1 ^a	Inhibidor de serín-proteasa tipo Kunitz; dominio tipo lustrina rico en cisteína	21-24	AB100095 Q7Z1K3	Modelo <i>ab initio</i> (Coronas-Serna <i>et al.</i> , 2014)	85% (Moneo <i>et al.</i> , 2000) y (Caballero y Moneo, 2002) 88% (Shimakura <i>et al.</i> , 2004) 93% (Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2007) 61% (Anadón <i>et al.</i> , 2010) 62% (Cuéllar <i>et al.</i> , 2012b) 67-86% (Caballero <i>et al.</i> , 2013) 84% (Carballeda-Sangiao <i>et al.</i> , 2016b)
Ani s 2	Paramiosina	97	AF173004 AAF72796	ND	88% (Pérez-Pérez <i>et al.</i> , 2000)
Ani s 3	Tropomiosina	41	Y19221 CAB93501	Modelo por homología (SDAP database)	0-13% (Asturias <i>et al.</i> , 2000a) 46% (Caballero <i>et al.</i> , 2012)
Ani s 4	Inhibidor de cisteín-proteasas	9	AM279414 CAK50389	Modelo por homología (Rodríguez-Mahillo <i>et al.</i> , 2007)	27% (Moneo <i>et al.</i> , 2005) 40% (Rodríguez-Mahillo <i>et al.</i> , 2007) 20-41% (Caballero <i>et al.</i> , 2013) 35% (Carballeda-Sangiao <i>et al.</i> , 2016b)
Ani s 5	SXP/RAL-2	15	AB274998 BAF43534	Sí. 2MAR (García-Mayoral <i>et al.</i> , 2014)	25% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2007a) 20-26% (Caballero <i>et al.</i> , 2013) 35% (Carballeda-Sangiao <i>et al.</i> , 2016b)
Ani s 6	Inhibidor de serín-proteasas	10	AB274999 BAF43535	ND	18% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2007a)
Ani s 7	ND*	139	EF158010 ABL77410	Modelo <i>ab initio</i> (Coronas-Serna <i>et al.</i> , 2014)	100% (Lorenzo <i>et al.</i> , 2000a) 81% (Rodríguez <i>et al.</i> , 2008) 94% (Anadón <i>et al.</i> , 2010) 93% (Cuéllar <i>et al.</i> , 2012b)
Ani s 8	SXP/RAL-2	15	AB300625 BAF75681	ND	25% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2007b)
Ani s 9	SXP/RAL-2	14	EU074790 ABV55106	ND	14% (Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2008) 41-43% (Caballero <i>et al.</i> , 2013)
Ani s 10	ND*	21	GU187358 ACZ95445	ND	39% (Caballero <i>et al.</i> , 2011) 12-49% (Caballero <i>et al.</i> , 2013)
Ani s 11.0101	ND*	27	AB555754 BAJ78220	ND	47% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2011)
Ani s 11.0201	ND*	16-19	AB555755 BAJ78221	ND	ND (Kobayashi <i>et al.</i> , 2011) 78% (Carballeda-Sangiao <i>et al.</i> , 2016b)
Ani s 12	ND*	31	AB555757 BAJ78223	ND	57% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2011)
Ani s 13	Hemoglobina	37	JX860676.1 AFY98826	Modelo por homología (González-Fernández <i>et al.</i> , 2015)	64% (González-Fernández <i>et al.</i> , 2015) [Este resultado forma parte de la presente tesis doctoral]
Ani s 14	ND*	24-27	LC027371 BAT62430	ND	54% (Kobayashi <i>et al.</i> , 2015)

^aAni s 1 se utilizó para denominar también a un alérgeno de *Anisakis* similar a la troponina C que fue reconocido por el 20% de los pacientes sensibilizados (Arrieta *et al.*, 2000). No debe confundirse con el alérgeno principal Ani s 1 aunque en la publicación se denominen igual por haberse publicado al mismo tiempo y tengan aproximadamente el mismo peso molecular. Actualmente se le conoce como *troponin-like protein* de *Anisakis simplex* habiendo perdido su nomenclatura en la base de datos de alérgenos oficial. Números de acceso GenBank: [AJ012103.2](#); [CAB58171.1](#) (gen y proteína). ND: No determinada. 3D: Tridimensional. *con secuencias repetitivas.

Ani s 11 presenta dos isoformas (isoalérgenos) Ani s 11.0101 y Ani s 11.0201 y también existe otro alérgeno no incluido en la tabla que fue publicado al mismo tiempo que Ani s 1, que no debe

confundirse con él aunque en el título del artículo se indica “Ani s 1”. Este alérgeno es la troponina C de *Anisakis* (Arrieta *et al.*, 2000). De todos los alérgenos, solo Ani s 2 y Ani s 3 son somáticos y panalérgenos, es decir, que están en la cutícula de las larvas y que ocasionan reacciones cruzadas con otras especies (Asnoussi-Alsharif, 2015; Daschner *et al.*, 2012; Guarneri *et al.*, 2007). Los demás son proteínas de ES salvo las que, por el momento, su tejido de expresión permanece desconocido: Ani s 10, Ani s 11, Ani s 12 y Ani s 14. Los alérgenos principales, son por definición, aquellos que son reconocidos por más del 50% de los pacientes sensibilizados (Breiteneder y Chapman, 2014). Los alérgenos principales de *Anisakis* son: Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11.02, Ani s 12, Ani s 13 y Ani s 14.

De todos los alérgenos potenciales de *Anisakis* que todavía no han sido completamente caracterizados y que, por consiguiente, no figuran en esta tabla; cabe destacar la miofilina (banda a 56 kDa) y la arginina quinasa (banda a 40 kDa) por pertenecer a familias de proteínas clásicamente alérgicas en otros organismos y por encontrarse en un rango de peso molecular entre 37,7 y 73,3 kDa en el que se encuentran los alérgenos que son reconocidos por un mayor número de pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Fæste *et al.*, 2014).

La miofilina fue identificada por primera vez en el cestodo *Echinococcus granulosus*, expresándose en el músculo liso de todas sus formas parasitarias: oncosferas, capa germinal, protoescolices y adultos (Martin *et al.*, 1995). Es una proteína de la familia de las calponinas (<http://pfam.xfam.org/family/PF00402>) de 190 aminoácidos y 21,2 kDa (GenBank: [CAA82316](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/CAA82316)) aunque aparece a 56 kDa en el extracto total de L3 de *Anisakis* (Fæste *et al.*, 2014). Se han identificado cuatro isoformas de miofilina de *E. granulosus* (α β γ δ) con aproximadamente el mismo peso molecular (22 kDa) pero distintos puntos isoeléctricos. Esta proteína presenta dos dominios de unión a Ca^{2+} homólogos a los de tipo “mano EF” cerca del extremo N-terminal (posiciones 27-38) y otro en la región central (101-112) (Martin *et al.*, 1995). Este dominio en “mano EF” consiste en un bucle de 12 aminoácidos flanqueado en ambos extremos por 12 aminoácidos plegados en hélice alfa. De los 12 aminoácidos del bucle, las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 y 12 son las que contienen los aminoácidos que intervienen en la unión del ion Ca^{2+} . El residuo aspártico o glutámico de la posición 12 es el que aporta los dos oxígenos necesarios para unir el ion (PROSITE documentation PDOC00018, 2006). Además presenta un motivo de 20 aminoácidos muy conservados (164-181) en la región C-terminal que se denomina firma de repetición de tipo calponina (PROSITE: [PS01052](https://www.expasy.org/prosite/PS01052)) (Martin *et al.*, 1997a). Otras proteínas similares a la miofilina (*myophilin-like*) fueron identificadas en *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *Schistosoma japonicum* y en *Clonorchis sinensis* (Huang *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 1997b; Peng *et al.*, 2008). En relación a su función, se cree que intervienen en la contracción muscular lisa y su unión con la actina es dependiente de fosforilación (Martin *et al.*, 1997b). Debido a su papel en la contracción del músculo liso de estos parásitos y su elevada presencia en la ventosa oral y la faringe de los adultos y las metacercarias de *C. sinensis*, es probable que sea una proteína esencial para la invasión tisular (Huang *et al.*, 2012). En la actualidad, a fecha de 23/02/2017, en una búsqueda de miofilina excluyendo las entradas “*predicted*” y limitando el tamaño desde 100 a 250 aminoácidos en la base de datos NCBI se encontraron 125 miofilinas: 121 en animales, dos en hongos y dos en protozoos. De las 121 secuencias de animales 118 fueron de invertebrados: artrópodos, nematodos

(*Anisakis*, *Ascaris*, *Toxocara* y *Trichinella*), platelmintos (*Echinococcus*, *Taenia*, *Schistosoma*, *Schistocephalus*, *Clonorchis* e *Hymenolepis*), cnidarios, el molusco *Crassostrea gigas* y el placozoo *Trichoplax adhaerens*. Las tres restantes fueron de vertebrados: *Salmo salar* (salmón) e *Ictalurus punctatus* (pez gato); presentando, en comparación con la miofilina de *E. granulosus*, un 45% y un 85% de identidad, respectivamente.

En relación con su reconocimiento inmunológico, la miofilina es una proteína inmunogénica reconocida por la IgG de siete de 13 pacientes con hidatidosis (*E. granulosus*) (Martin *et al.*, 1996). También, una proteína similar a la miofilina de *C. sinensis* es reconocida por la IgG de pacientes infectados con *C. sinensis*, *S. japonicum*, *E. granulosus* y *T. solium* por lo que esta reactividad cruzada hace pensar que sea una proteína muy conservada (Huang *et al.*, 2012). Por el momento la miofilina de *Anisakis* no ha sido caracterizada como alérgeno aunque ya ha sido publicado el transcriptoma de *Anisakis simplex* y *A. pegreffii* (Baird *et al.*, 2016) y en la base de datos Uniprot figura una proteína predicha como calponina de *Anisakis* de 183 aminoácidos [A0A0M3JCG1](#).

La arginina quinasa es una enzima monomérica de unos 40 kDa que se expresa en el citoplasma de las células de invertebrados y protozoos y en las mitocondrias de algunos artrópodos (Uda *et al.*, 2006). Esta enzima cataliza reversiblemente la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la arginina y de este modo la arginina-fosfato sirve como almacenamiento de energía de un modo distinto al ATP¹ en los músculos de la mayoría de invertebrados² (Ellington, 2001). La arginina quinasa es una enzima muy conservada en la evolución y comparte un ancestro común con la creatina quinasa (Uda *et al.*, 2006). Dado que la arginina quinasa no se expresa en humanos, se está utilizando como diana farmacológica para *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* ya que en situaciones de estrés el parásito necesita la energía almacenada en forma de arginina-fosfato (Pereira, 2014). De hecho, polifenoles como el resveratrol han dado buenos resultados en la inhibición de la arginina quinasa de *T. cruzi* (Valera Vera *et al.*, 2016). Los nematodos solo expresan la arginina quinasa como única enzima para generar fosfágenos al igual que los artrópodos y los moluscos (Wickramasinghe *et al.*, 2007). En los nematodos *Toxocara canis*, *T. vitulorum* y *A. lumbricoides* la arginina quinasa se expresa principalmente en los huevos en eclosión, en la mitad posterior de los helmintos, en la hipodermis y en tejidos musculares, no encontrándose en la cutícula. Es en los tejidos activos donde se necesita energía y, por lo tanto, donde se expresa la arginina quinasa de los nematodos (Kulathunga *et al.*, 2012). De forma experimental, se ha expresado la arginina quinasa recombinante de *A. suum* de 400 aminoácidos (45 kDa) y péptido señal desde la posición 1 a la 23 (Nagataki *et al.*, 2012).

Con respecto a la inmunogenicidad de la arginina quinasa, la recombinante de *T. canis* resultó inmunogénica en ratones infectados experimentalmente con el nematodo (Wickramasinghe *et al.*, 2008). Se considera un panalérgeno al igual que la tropomiosina ya que las IgE de los individuos sensibilizados la reconocen independientemente de la especie de invertebrado de la que proceda. En particular, la arginina quinasa del langostino blanco (Lit v 2) es reconocida indistintamente por pacientes sensibilizados a ácaros, cucarachas y gambas (Pascal *et al.*, 2015). Aunque muchas arginina quinasa han sido identificadas y estudiadas inmunológicamente (Khora, 2016), en la base de datos oficial

¹ Estas moléculas fosforiladas de alta energía se denominan **fosfágenos**. Existen ocho fosfágenos en la naturaleza: arginina fosfato, talasemina fosfato, creatina fosfato, glicociamina fosfato, taurociamina fosfato, hipotaurociamina fosfato, lombricina fosfato y ofelina fosfato (Robin, 1974).

² Los vertebrados solo presentan el fosfágeno creatina-fosfato y solo expresan creatina quinasa (Ellington, 2001).

(www.allergen.org) encontramos a fecha de 16/09/2016 solo ocho arginina quininas caracterizadas como alérgenos: Bomb m 1 del gusano de seda (*Bombyx mori*), Der f 20 y Der p 20 de los ácaros del polvo (*Dermatophagoides farinae* y *D. pteronyssinus*), Per a 9 de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), Plo i 1 polilla india de la harina (*Plodia interpunctella*), Cra c 2 de la quisquilla (*Crangon crangon*), Lit v 2 del langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) y Pen m 2 del langostino jumbo (*Penaeus monodon*). Las arginina quininas Bomb m 1 (Liu *et al.*, 2009), Per a 9 (Sookrung *et al.*, 2006) y otra no incluida en la base de datos oficial, la del cangrejo nadador azul (Rosmilah *et al.*, 2012) han sido descritas como alérgenos principales. En este último estudio se observó que la IgE sérica de 30 pacientes maliciosos alérgicos al cangrejo nadador azul, dejaron de reconocer la arginina quinasa cuando se expusieron frente al extracto cocido del cangrejo, demostrándose de este modo su termosensibilidad (Rosmilah *et al.*, 2012). Finalmente, cabe destacar que Lit v 2, presentó epitopos útiles para predecir reactividad clínica en pacientes sensibilizados al marisco (Pascal *et al.*, 2015). Actualmente la arginina quinasa de *Anisakis* no ha sido caracterizada como alérgeno pero se encuentra su secuencia de ARN mensajero (mRNA) probable (Tránsito: [ASIM_0001088101-mRNA-1](#)) y su traducción a proteína [A0A0M3JSD5](#) con 410 aminoácidos.

1.2.2. La tropomiosina

Si consideramos que la tierra se formó hace 4.467 Ma según las últimas estimaciones (Rudge *et al.*, 2010), los primeros genes que codificaron para tropomiosina estaban presentes hace aproximadamente 1000 Ma cuando aparecieron las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* con los genes *TPM1* y *TPM2* o hace 900 Ma en nematodos como *Caenorhabditis elegans* con el gen *tmy-1*. Varias duplicaciones del genoma han sido propuestas dentro del linaje de los vertebrados ya que presentan cuatro genes *TPM1-TPM4* y los anfibios y peces hasta seis genes (Vrhovski *et al.*, 2008). Es una molécula altamente conservada por sus funciones esenciales en el citoesqueleto de las células y, especialmente, en las fibras musculares. Es una proteína microfibrilar que presenta una estructura secundaria en hélice alfa con ligeramente más de 3,6 aminoácidos por vuelta (Stewart, 2001). Pertenece a una familia de proteínas que presentan un motivo muy conservado en la región C-terminal que se denomina firma de tropomiosina LK[EAD]AExRA[ET] (PROSITE: [PS00326](#)) siendo x cualquier aminoácido y los aminoácidos entre corchetes ambigüedades (ejemplo: [EAD] significa que en la tercera posición podemos encontrar uno de estos aminoácidos: Glutámico, Alanina o Aspártico). Existen cientos de isoformas que se expresan tanto en células musculares como no musculares de opistocontos, amplio grupo filogenético de eucariotas que incluye a los animales y los hongos. Sin embargo la tropomiosina no se encuentra en plantas, protistas o procariotas (Geeves *et al.*, 2015). El gran número de isoformas documentadas de tropomiosina³ deriva del uso de promotores alternativos y del corte y empalme de exones internos de varios genes. La tropomiosina estabiliza y regula el citoesqueleto de actina, que está involucrado en funciones celulares como la motilidad, división, contracción, señalización, transcripción y transporte intracelular (Schevzov *et al.*, 2011).

La isoforma más común de la tropomiosina tiene un peso molecular de ~32,5 kDa (Sereda *et al.*, 2008) y 284 aminoácidos. Es abundante en las fibras musculares y forma dímeros paralelos de 20 Å de diámetro

³ Se conocen más de 40 isoformas en mamíferos (Schevzov *et al.*, 2011).

y 400 Å de longitud que son superhélices levógiras, asociándose estas superhélices entre sí “cabeza-cola” formando cadenas superpuestas (Stewart, 2001).

La formación de esta superhélice de dos moléculas sencillas es posible porque las secuencias aminoacídicas de cada tropomiosina presentan héptadas repetitivas de aminoácidos aproximadamente cada dos vueltas de hélice alfa (cada posición en la repetición está nombrada con letras de “a” a “g”) en los cuales los residuos hidrofóbicos están localizados en las posiciones “a” y “d” y son los responsables de la interacción entre dos hélices alfa de la superhélice (Figura 3). Al mismo tiempo, interacciones electrostáticas carga-carga entre los residuos generalmente ácidos de las posiciones “e” y los residuos generalmente básicos en posición “g” ayudan a estabilizar el enrollamiento. Los restantes aminoácidos, en posiciones “b”, “c” y “f”, ocupan las posiciones externas e interactúan con otras proteínas como actina y troponina (Stewart, 2001).

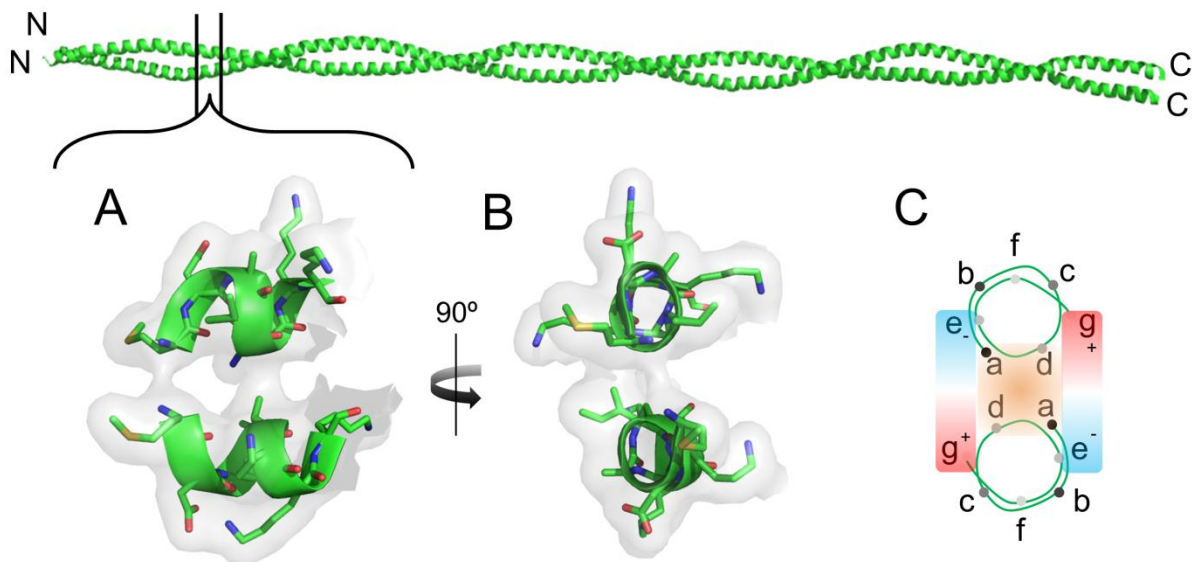


Figura 3. Superhélice de tropomiosina. Dos moléculas de tropomiosina de *Sus scrofa* (PDB: 1C1G) formando una superhélice. **A:** Vista lateral de una héptada repetitiva de aminoácidos con las cadenas laterales y la superficie. **B:** Vista frontal desde el extremo N-terminal. **C:** Representación esquemática de B con las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que estabilizan la superhélice de tropomiosina.

Los dos extremos, N-terminal y C-terminal, de la proteína presentan residuos conservados que son vitales para que se produzcan las uniones cabeza-cola (Sousa y Farah, 2002). Estos complejos de superhélices de tropomiosina unidas cabeza-cola están asociados a lo largo de los filamentos delgados de actina y juegan un importante papel en la contracción muscular permitiendo la unión de la actina a las cabezas de miosina en presencia de Ca^{2+} . La compleja interacción con esta y otras proteínas como el complejo de las troponinas (TnI, TnC y TnT) solo permite un bajo nivel de libertad en la composición aminoacídica de la tropomiosina. Es por ello que no sorprende el alto grado de homología entre todas las tropomiosinas, incluso entre especies filogenéticamente distanciadas (Barua *et al.*, 2011).

La identidad de la secuencia de la tropomiosina de *Anisakis* es elevada entre nematodos como por ejemplo *Trichostrongylus colubriformis* (93% de residuos idénticos) u *Onchocerca volvulus* (91%). El porcentaje de identidad disminuye al compararla con la de otros invertebrados: crustáceos (70%), insectos (69%) y

moluscos (63-56%). Como máximo, solo el 58% de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de las tropomiosinas de los vertebrados (humano, pollo, ratón...), aunque existe una elevadísima similitud en la estructura tridimensional (Asturias *et al.*, 2000b). El hecho de estar tan conservada hace que exista una elevada reactividad cruzada entre las tropomiosinas de los invertebrados, convirtiéndola en un panalergeno (Reese *et al.*, 1999) responsable de reacciones cruzadas entre crustáceos (camarones, gambas, langostas, cangrejos, cangrejos de río), moluscos (calamares, caracoles, ostras, mejillones), arácnidos (ácaros del polvo) e insectos (cucarachas, mosquitos, pececillos de plata) (Woo y Bahna, 2011). De las 20 familias de proteínas en las que se engloban alrededor del 50% de los alérgenos, la familia de las tropomiosinas (Pfam: [PF00261](#)) constituye aproximadamente el 8% del total de los alérgenos con un total de 217 tropomiosinas alérgicas en la base de datos Allergome (Tyagi *et al.*, 2015).

Una identidad de secuencia de más del 50% entre alérgenos es considerada necesaria para que exista reactividad cruzada (Aalberse, 2000). Las tropomiosinas de vertebrados comparten más del 50% de la secuencia con las de invertebrados pero, a diferencia de éstas, las de vertebrados no son reconocidas por el isotipo o clase IgE (Reese *et al.*, 1999). En un estudio sobre la alérgenicidad de proteínas conservadas, se encontró que cuanto más alto era el grado de identidad del alérgeno homólogo en el organismo estudiado, más baja era la prevalencia de IgE frente a esa proteína en la población. Se observó que por encima del 40% de identidad de secuencia con proteínas humanas, el número de alérgenos y su alérgenicidad disminuía (Santiago *et al.*, 2012). La tropomiosina como alérgeno es una de las pocas excepciones, ya que como se ha mencionado anteriormente, presenta una identidad de secuencia por encima del 50%. Más específicamente, las secuencias de las tropomiosinas de vertebrados tales como mamíferos, aves y peces presentan una identidad de, como mínimo, un 90% con, al menos, una isoforma humana de tropomiosina (Jenkins *et al.*, 2007). Estos datos apoyan la idea de que las tropomiosinas de vertebrados no deberían ser alérgicas. Algunos autores sugirieron que las tropomiosinas de la carne de mamíferos y aves como vaca, cerdo, pollo y conejo no son alérgenos importantes (Ayuso *et al.*, 1999).

En los años noventa la tropomiosina fue identificada como el alérgeno principal de los camarones (Shanti *et al.*, 1993), de hecho, los principales alérgenos procedentes de alimentos del mar son la parvalbúmina del pescado y la tropomiosina del marisco (Hajeb y Selamat, 2012), siendo el pescado y el marisco dos de los “ocho grandes” grupos de alimentos que ocasionan alrededor del 90% de las alergias alimentarias (leche, huevos, pescado, crustáceos-marisco, nueces, cacahuets, trigo y soja) (FDA, 2004). La prevalencia aproximada de la alergia al marisco se estima entre un 0,5 y un 2,5% de la población mundial, siendo más alta en los países asiáticos que en los países occidentales, lo que parece reflejar el consumo geográfico de marisco (Woo y Bahna, 2011).

A pesar de la concepción actual de que las proteínas de vertebrados no son alérgicas (McKenna *et al.*, 2016), se ha publicado recientemente un estudio en el que se ha caracterizado la tropomiosina de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) como alérgeno (Ore m 4). Esta tropomiosina de la tilapia presenta no más del 60% de identidad con tropomiosinas de gambas y hasta del 87,7% con la isoforma 5 de la tropomiosina humana (Liu *et al.*, 2013).

Existen varios factores que afectan a la alergenicidad de las tropomiosinas: presencia de isotipos de inmunoglobulinas protectores, el procesado de los alimentos, la estabilidad, la digestibilidad y cofactores clínicos como permeabilidad intestinal alterada o enfermedades autoinmunes concomitantes.

Los estudios sobre el parasitismo nos han ayudado a entender por qué los fenómenos alérgicos son raros incluso en situaciones de elevada tasa de producción de IgE. De hecho estudios recientes demuestran que los alérgenos comparten dominios con proteínas de parásitos helmintos contra los que nuestro sistema inmunológico, mediante la IgE, nos ha protegido durante miles de años de evolución (Bielory *et al.*, 2013; Tyagi *et al.*, 2015). El parasitismo crónico por helmintos induce no solo IgE, sino también un eje antiinflamatorio que amortigua la respuesta alérgica. Uno de los mecanismos propuestos es la producción de otros isotipos bloqueantes como la IgG4 o la IgA en cantidades mucho más elevadas. En la anisakiosis humana, la IgG4 específica se produce en paralelo a la IgE, protegiendo de las reacciones alérgicas a algunos pacientes mediante el bloqueo de los alérgenos de *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2012). Los niveles de IgG4 específica frente a paramiosina de *Schistosoma japonicum* se asocian con un aumento de la susceptibilidad a la reinfección (Jiz *et al.*, 2009). Los parásitos inducen respuestas de anticuerpos de clase IgE e IgG4 simultáneamente, pero solo un balance positivo para la IgE ofrece protección frente a los parásitos (Turner *et al.*, 2005). Algunos autores afirman que la IgA producida frente a los antígenos de *Schistosoma* podría participar en la respuesta inmune protectora frente a la esquistosomosis inhibiendo la puesta de huevos (Poulain-Godefroy *et al.*, 1996). En el caso de las alergias alimentarias, no está claro qué factores contribuyen a una producción en paralelo de otros isotipos específicos. La sensibilización por vía oral con tropomiosina purificada de la gamba *Metapenaeus ensis*, indujo niveles significativos de IgE, IgG1⁴ e IgA fecal en ratones C3H/HeJ (Capobianco *et al.*, 2008).

El procesado de los alimentos es importante cuando se quiere estudiar la relevancia clínica de los alérgenos. Dado que la tropomiosina es el alérgeno principal del marisco, se ha investigado si su potencia alérgica se modifica tras someter estos alimentos a diferentes tratamientos como altas temperaturas, altas presiones, ultrasonidos y radiación gamma (Leung *et al.*, 2014).

El tratamiento térmico ha mostrado resultados contradictorios en algunos estudios ya que parece que la tropomiosina de algunos organismos se vuelve más reactiva mientras que en otros la unión de la IgE parece disminuir tras el calentamiento del alimento. Es posible que esto se deba a que las tropomiosinas alérgicas de las gambas pueden volver a plegarse cuando el alimento se enfría después del proceso de desnaturalización por calor (Usui *et al.*, 2013). Los epitopos de unión a IgE a veces pueden estar enmascarados por otros componentes del extracto o bien pueden formarse nuevos epitopos cuando las tropomiosinas se agregan y, de este modo, inducir un perfil diferente de isotipos de inmunoglobulinas. Este hecho sucede, por ejemplo, con las dos isoformas del alérgeno principal del polen del abedul (*Betula verrucosa* hoy *B. pendula*) (Bet v 1 y Bet v 1d) que inducen niveles similares de IgE específica pero solo Bet v 1d induce IgG1, IgG2a e IgA en ratones (Zaborsky *et al.*, 2010).

El tratamiento con altas presiones fue desarrollado para mantener las propiedades organolépticas y nutricionales en los alimentos a la vez que se inactivaba el crecimiento de microorganismos. Este

⁴ Isotipo del ratón equivalente a la IgG4 humana (Wu y Zarrin, 2014).

método físico afecta a los enlaces no covalentes de las proteínas. Un reciente estudio realizado en caballa sometida a altas presiones, mostró una degradación significativa de algunas proteínas y un incremento de la intensidad de la tropomiosina tras aplicar 300 y 450 MPa (Pazos *et al.*, 2015). Este hecho podría deberse a la agregación de isoformas de diferentes pesos moleculares o de fragmentos de otras proteínas producidos tras la aplicación de presión.

Los ultrasonidos y la radiación gamma han resultado ser muy efectivos junto con la aplicación de calor para reducir la unión de la IgE de pacientes alérgicos a la tropomiosina del langostino blanco *Litopenaeus vannamei* (Leung *et al.*, 2014).

Se ha postulado que las tropomiosinas de vertebrados son degradadas más rápidamente durante la digestión que las de invertebrados y que al entrar estas últimas en el torrente sanguíneo en fragmentos más grandes podrían desencadenar los mecanismos de hipersensibilidad inmediata (Mikita y Padlan, 2007). Las principales proteasas involucradas en la digestión de la tropomiosina son las pepsinas gástricas, que tienen gran especificidad frente a péptidos moleculares grandes y rompen a la proteína preferentemente en los residuos de fenilalanina, tirosina y leucina. Una vez en el intestino delgado, actúan las enzimas secretadas por el páncreas: tripsina y quimotripsina, principalmente; y también las carboxipeptidasas y las peptidasas del borde en cepillo de los enterocitos (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2008). Estudios experimentales con la tropomiosina del cangrejo del barro *Scylla serrata* tratada con fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (*Simulated Intestinal Fluid* – SIF), demostraron que la tropomiosina del cangrejo fue resistente a la pepsina pero fue relativamente susceptible a la digestión con tripsina y quimotripsina (Huang *et al.*, 2010). Otros estudios que combinaron el hervido a altas presiones junto con ultrasonidos mostraron que la tropomiosina alérgica del cangrejo del barro *Scylla paramamosain* aceleraba su digestión y sobre todo el tratamiento con altas presiones disminuía la unión de IgE/IgG específicas de una agrupación de sueros de cinco pacientes alérgicos (Yu *et al.*, 2011).

Por último, existe un nexo común conocido entre la alteración de la permeabilidad intestinal y las enfermedades alérgicas o la enfermedad inflamatoria intestinal con presencia de IgE clínicamente relevante frente a la tropomiosina de vertebrados (Liu *et al.*, 2013). La tropomiosina alérgica de la tilapia comparte fragmentos con aminoácidos idénticos a los de la isoforma 5 de la tropomiosina humana frente a la cual, los pacientes con colitis ulcerosa tienen autoanticuerpos de isotipo IgG. De hecho, seis de los 10 pacientes estudiados para caracterizar a la tropomiosina de la tilapia como alérgeno, fueron diagnosticados con enfermedad inflamatoria intestinal (Liu *et al.*, 2013). La enfermedad inflamatoria intestinal agrupa a varias enfermedades entre las que se encuentran la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa y, en ambas, existen defectos en el sistema inmune de la mucosa intestinal y una permeabilidad incrementada (Baumgart y Carding, 2007). El nexo entre la alergenicidad y el intestino puede ser la diferencia en digestibilidad, anteriormente mencionada, de las diferentes tropomiosinas según su origen (Mikita y Padlan, 2007).

El hecho de que la tropomiosina sea considerada un alérgeno del pescado, abre las puertas a nuevas interpretaciones sobre síntomas que se observan frecuentemente en las consultas de alergología. Cuando el alergólogo es informado de efectos adversos tras la ingesta de pescado, piensa en la alergia al pescado como una posibilidad. De hecho, la alergia al pescado, aparece en las últimas revisiones como una enfermedad emergente en los países industrializados (Kuehn *et al.*, 2014; Mourad y Bahna, 2015)

con una variación en su prevalencia del 0% al 2% si se consideran los casos informados por los propios pacientes o de menos del 0,5% si se consideran solo los sujetos con síntomas y que están sensibilizados (Rona *et al.*, 2007). Otras posibilidades son intolerancias, déficit de producción de DAO o anomalías digestivas subyacentes como enfermedad inflamatoria intestinal o síndrome del intestino irritable (colon irritable) (Prester, 2015).

Las pruebas de rutina para el diagnóstico de la alergia al pescado no siempre son claras y los resultados negativos no permiten descartar mecanismos alérgicos (Barbarroja-Escudero *et al.*, 2016). Los síntomas gastrointestinales generalmente no se acompañan de pruebas cutáneas positivas o IgE sérica específica (Chikazawa *et al.*, 2015). Es por ello necesario un estudio de la tropomiosina como un posible panalergeno de pescados.

1.2.3. La hemoglobina

La hemoglobina es una proteína ubicua que, debido a su amplio estudio en vertebrados, se suele pensar que solo se encuentra en el interior de los eritrocitos transportando oxígeno. Existen buenas revisiones sobre los descubrimientos históricos acerca de la hemoglobina humana (Schechter, 2008), su estructura (Rossmann, 2009; Strandberg, 2009) y las patologías relacionadas (Thein, 2011). La hemoglobina se encontró por primera vez en la sangre simplemente por el hecho de ser muy abundante (15g/100 ml) (Hardison, 1996). Sin embargo, hoy en día conocemos que la hemoglobina es una proteína extremadamente conservada presente en cualquier eucariota, bacteria o arquea (Vinogradov *et al.*, 2006). Los primeros genes que codificaron para hemoglobinas primitivas estaban ya presentes en bacterias hace unos 1800 Ma. Posteriormente, se conservaron en levaduras, algas y protozoos al igual que cuando se produjo la separación entre plantas y animales hace unos 1500 Ma. Es muy interesante el hecho de que el gen ancestral de hemoglobina compartido por animales y plantas contenía tres intrones. Los nematodos como *Pseudoterranova decipiens* todavía conservan el intrón central presente también en las hemoglobinas de las plantas; en cambio el resto de animales solo contienen el primero y el último de los intrones (Hardison, 1996).

Esta proteína se pliega principalmente en hélice alfa conformando dominios de tipo globina de 17 kDa (Weber y Vinogradov, 2001). Estos dominios presentan un bolsillo hidrófobo en el que se encuentra el grupo hemo formado por un anillo tetrapirrólico con un átomo de hierro en el centro (Figura 4). Esta estructura terciaria es una de las de mayor nivel de conservación en cuanto a los contactos residuo-residuo de entre todas las familias de proteínas conocidas. De hecho, análisis filogenéticos empleando todas las secuencias de globinas conocidas, parecen apuntar a que la primera globina del ancestro común del que proceden todas las demás perteneció a una arquea que se desarrolló hace 3500 Ma. Además del plegamiento de la apoproteína, la utilidad de este sistema porfirina-metal para la transferencia de electrones también fue establecido muy tempranamente en la evolución, permitiendo la aparición de ficocianinas, citocromos y otras hemoproteínas (Hardison, 1996).

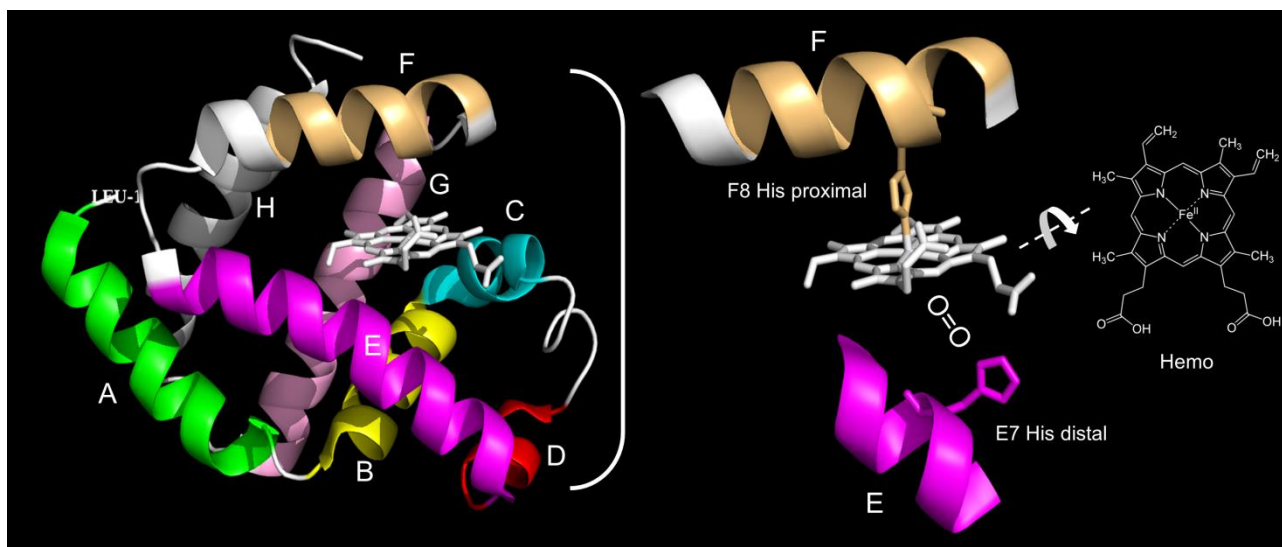


Figura 4. Estructura de la hemoglobina alergénica Chi t 1 de *Chironomus thummi* (17 kDa). Consta de ocho hélices alfa nombradas con las letras A-H. El grupo hemo se localiza en un bolsillo hidrófobo entre las hélices C, E, F y G. En todas las globinas se conserva un residuo de histidina en la posición 8 de la hélice F (His F8 proximal) necesaria para su unión directa mediante un enlace de coordinación al hierro (II) del grupo hemo. En vertebrados, excepto en la mioglobina del elefante, hay una histidina en la posición 7 de la hélice E (His E7 distal). En muchos invertebrados esta histidina se reemplaza por una glutamina incrementándose la afinidad por el oxígeno que a su vez forma el otro enlace de coordinación con el hierro del hemo (Weber y Vinogradov, 2001).

En comparación con las exhaustivamente estudiadas hemoglobinas de vertebrados, como el tetrámero de hemoglobina humana (64 kDa) o la mioglobina monomérica (17 kDa), las hemoglobinas de invertebrados muestran una amplia variedad de funciones y estructuras. Estas hemoglobinas están mucho más especializadas que las de vertebrados presentando funciones muy diversas (difusión de O_2 , regulación y metabolismo del óxido nítrico, mantenimiento del equilibrio ácido-base, eliminación de O_2 , sensor de O_2 , actividad oxidasa y peroxidasa, pigmento lumínico, *etc.*). De igual modo, con respecto a la estructura, existen hemoglobinas desde 17 kDa hasta complejos de más de 800 kDa en algunos crustáceos y moluscos bivalvos (Weber y Vinogradov, 2001).

La hemoglobina de *Ascaris* ha sido profundamente estudiada debido a su elevadísima afinidad por el oxígeno (De Baere *et al.*, 1992). Esta afinidad por oxígeno es cuatro órdenes de magnitud superior que la de la hemoglobina humana en condiciones fisiológicas (Goldberg, 1999). Como se ha explicado anteriormente en la Figura 4, esta hemoglobina presenta modificaciones en ciertos aminoácidos de los bolsillos del hemo que la hacen más afín al oxígeno. Los residuos Phe CD1 e His F8 proximal están conservados en todas las mioglobinas y hemoglobinas. Particularmente, en las de los vertebrados, exceptuando en la mioglobina del elefante, hay His E7 y Leu B10 en la región distal. En las globinas de invertebrados estos residuos se sustituyen por Gln E7 y Tyr B10 lo que les confiere mayor afinidad por el oxígeno molecular. En concreto, la hemoglobina de *Ascaris*, gracias a la Tyr B10 presenta una tasa de disociación del oxígeno unas 4500 veces más baja que la mioglobina de vertebrados, lo que le confiere una afinidad 450 veces mayor por el oxígeno que la mioglobina (Weber y Vinogradov, 2001). Con respecto a su localización, aunque los ancestros de los ascáridos simplemente presentaban una globina cuticular o unida que no circulaba por el fluido pseudocelómico (Blaxter *et al.*, 1994), la hemoglobina de *Ascaris* es secretada y circula por el fluido pseudocelómico de los adultos, no habiéndose descrito en las L3 de *Ascaris* (Hashimoto *et al.*, 2008). Finalmente, se consiguió purificar a partir de los parásitos

adultos mediante ultracentrifugación analítica y posterior cromatografía de intercambio iónico (Darawshe *et al.*, 1987).

En su estado nativo, la hemoglobina de *Ascaris*, se presenta en forma de homo-octámero de 328 kDa (De Baere *et al.*, 1992). Cada monómero de aproximadamente 40 kDa está formado por dos dominios globina, de ahí que el octámero pueda albergar hasta 16 moléculas de oxígeno (De Baere *et al.*, 1992; Darawshe y Daniel, 1991; Minning y Goldberg, 1998). Sin embargo, no todos los bolsillos deben estar ocupados por el grupo hemo (Darawshe *et al.*, 1987). Esta peculiaridad de la hemoglobina de presentar dos dominios globina unidos formando parte de la misma proteína surgió a raíz de un evento de duplicación de ese gen en un ancestro común hace 250-350 Ma que más tarde divergió en los géneros *Ascaris* y *Pseudoterranova* hace unos 150-250 Ma (Vanfleteren *et al.*, 1994). El dominio globina de la hemoglobina de *Ascaris* más próximo al extremo N-terminal (dominio I) fue cristalizado para elucidar su estructura tridimensional mediante difracción de rayos X (PDB: [1ASH](#)) (Yang *et al.*, 1995).

La hemoglobina de otro nematodo ascaridoideo, *Pseudoterranova decipiens*, posee una estructura primaria similar a la de *Ascaris* y se postula que pueda adoptar una conformación octamérica similar (Blaxter *et al.*, 1994). Sin embargo de *Anisakis*, solo se conocen las propiedades fisicoquímicas de su hemoglobina, que resultaron ser muy parecidas a las de la hemoglobina de *Ascaris* (Suzuki y Ishida, 1979). En este trabajo se purificó la hemoglobina de *Anisakis* mediante precipitación con sulfato amónico y cromatografía de intercambio iónico. Un año más tarde se empleó el mismo procedimiento de purificación y se mostró el perfil electroforético de la hemoglobina, la cual fue capaz de inducir más anticuerpos en conejos inmunizados que el extracto total de las L3 de *Anisakis* (Asaishi *et al.*, 1980b). En la actualidad, solo se conoce la secuencia de la hemoglobina madura de *A. pegreffii* (GenBank: [AFY98826.1](#)) y se ha detectado su presencia en el antígeno ES de las L3 de *A. pegreffii* gracias a un anticuerpo monoclonal específico que reconoce hemoglobinas de nematodos, el 4E8g (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013).

Aunque la sensibilización a las hemoglobinas del cerdo y del pollo han sido documentadas en un caso de alergia ocupacional (Hilger *et al.*, 2010). Solo la hemoglobina de las larvas del díptero *Chironomus thummi* ha sido caracterizada como alergeno en humanos (Baur *et al.*, 1982). Estas larvas conocidas como “gusanos rojos” o “gusanos de sangre” se consideran plagas del arroz en España (Escolano-Tercero y Tomás-Tomás, 2006) y suelen emplearse secas como comida de peces. Los restos de los adultos muertos o de las larvas secas pueden ser inhalados con facilidad ya que son organismos de distribución cosmopolita. En la base de datos oficial de alérgenos WHO/IUIS (www.allergen.org) se encuentran todas las isoformas⁵ alergénicas de la hemoglobina de las larvas de este insecto: Chi t 1, Chi t 2, Chi t 3 (que engloba a los antiguos Chi t 5, 6, 7 y 8 como isoalérgenos de Chi t 3 ya que presentan $\geq 67\%$ de identidad de secuencia, mismo peso molecular y función que Chi t 3), Chi t 4 y Chi t 9 (Radauer *et al.*, 2014). Desde los años ochenta se llevaron a cabo numerosos estudios con las larvas y los adultos de estos dípteros no hematófagos al observarse que ocasionaban reacciones alérgicas respiratorias en personas sensibilizadas (Cranston, 1988; Yong *et al.*, 1999). Además se conoce la existencia de reactividad cruzada entre las hemoglobinas de varios géneros de quironómidos de

⁵ En las larvas de *Chironomus* se han detectado más de 20 componentes o isoformas de hemoglobina monomérica de entre 14,4 a 17,3 kDa (Weber y Vinogradov, 2001).

diferentes continentes (Baur *et al.*, 1983). Sin embargo los epitopos responsables del reconocimiento inmunológico de la hemoglobina de *Chironomus* han sido localizados con mayor exactitud tras la elucidación de su estructura tridimensional (PDB: [1ECO](#)) (Steigemann y Weber, 1979). Se demostró la existencia de un epitopo lineal de unión a IgE en las posiciones 80-100 de la hemoglobina alergénica Chi t 1.01, ya que 13 de los 15 pacientes estudiados con IgE frente a este alérgeno reaccionaron con ese péptido. Las posiciones 41-60 no mostraron unión a IgE en ninguno de los sueros humanos, pero sí fueron antigénicas para la IgG obtenida experimentalmente de suero de conejo inmunizado con Chi t 1.01 y en un anticuerpo monoclonal murino (IgG1) específico (van Kampen *et al.*, 2001).

Con respecto a los nematodos, el papel de la hemoglobina como alérgeno no ha sido estudiado. Se ha demostrado la existencia de proteínas de entre 30 y 40 kDa compartidas por *Chironomus*, *Blatella germanica* y L3 de *Anisakis simplex* que ocasionaban reacciones cruzadas en pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Pascual *et al.*, 1997). Pero no se dispone de datos suficientes para afirmar o negar que la hemoglobina pueda ser un panalérgeno como lo es la tropomiosina o la arginina quinasa.

1.3. Epitopos y evolución

1.3.1. Adaptación parásito-hospedador y mimetismo molecular

Los parásitos evolucionan continuamente con sus hospedadores. Para analizar el origen evolutivo de *Anisakis* con los mamíferos marinos, cetáceos principalmente, necesitamos conocer su origen por separado. En primer lugar los nematodos surgieron hace unos 1100 Ma de un ancestro común con los artrópodos (Wang *et al.*, 1999). Taxonómicamente, los nematodos están incluidos en un grupo de organismos conocido como ecdisozoos (superfilo *Ecdysozoa*) porque mudan al igual que los artrópodos y con los cuales presentan una estrecha relación filogenética, principalmente con crustáceos e insectos (Aguinaldo *et al.*, 1997). Por otro lado, los cetáceos (ballenas, delfines y marsopas) aparecieron hace unos 50 Ma a partir de un ancestro terrestre que regresó al mar perdiendo su pelo y regulando su temperatura mediante una gruesa cubierta de grasa (Park *et al.*, 2015). De este ancestro se creía que procedían directamente los hipopótamos, pero en realidad, gracias a un esqueleto fósil se demostró que fueron los raoélidos los más próximos. Estos mamíferos extintos de vida terrestre y adaptados a la vida acuática vivieron en la India durante el Eoceno (56-34 Ma) (Thewissen *et al.*, 2007). Estos ancestros terrestres de los cetáceos probablemente se llevaron al mar a sus nematodos parásitos intestinales entre los que se encontrarían los ascáridos, que al igual que sucede hoy en día, constituyen uno de los grupos de nematodos más habituales en rumiantes o en hipopótamos (organismos terrestres más cercanos evolutivamente a los cetáceos) (Maung, 1975; Sultan *et al.*, 2015). Estos ascáridos co-evolucionaron con esos mamíferos ancestrales de vida anfibia como hospedadores definitivos surgiendo los géneros que conocemos hoy en día entre los que se encuentra *Anisakis*. La especiación dentro del género *Anisakis* se habría producido por aislamiento geográfico de sus hospedadores definitivos. Por ejemplo *A. pegreffii* está totalmente adaptado a su hospedador definitivo principal: el delfín mular *Tursiops truncatus*. Otro anisákido, *Pseudoterranova decipiens* lo está con las focas como, por ejemplo, *Phoca vitulina*. Estos fenómenos de aislamiento de poblaciones de hospedadores parecen haber ocurrido desde el mioceno (23 Ma) hasta el pleistoceno (2,6 Ma) debido a los extremos cambios climáticos ya que durante las glaciaciones el nivel del mar se encontraba en su punto más bajo y las poblaciones se quedaban

localizadas en mares cerrados más pequeños como por ejemplo el mar Báltico (Mattiucci y Nascetti, 2008).

Como ya se ha comentado, uno de los nematodos parásitos más próximos filogenéticamente a *A. simplex* es *A. lumbricoides/suum* (Blaxter *et al.*, 1998), estando implicado en la aparición de reacciones cruzadas cuando se realiza el diagnóstico serológico de la anisakiosis. De hecho, el método ImmunoCAP[®], que es el más utilizado para el diagnóstico de *A. simplex*, es muy sensible y poco específico, lo que origina falsos positivos a *Anisakis* debido a reacciones cruzadas con *Ascaris* (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014). *Ascaris* es un nematodo muy ampliamente distribuido [26% de la población mundial está infectada (de Silva *et al.*, 2003)] y con una larga historia de parasitación al ser humano, habiéndose encontrado fósiles de huevos de 30.000 años en las cuevas de Yonne, Francia (Loreille y Bouchet, 2003). En la actualidad todavía no se ha podido confirmar que *A. lumbricoides* (*Ascaris* del hombre) sea la misma especie que *A. suum* (*Ascaris* del cerdo) aunque ciertos hechos confirmarían esta hipótesis: fisiológicamente son prácticamente indistinguibles, completan el ciclo indistintamente en el hombre y en el cerdo, estos dos hospedadores aparecen como especie millones de años antes que la domesticación de los cerdos y los primeros humanos cazaban cerdos salvajes antes de su domesticación conviviendo en los mismos ecosistemas y favoreciendo el intercambio de sus parásitos (Leles *et al.*, 2012). Sin embargo, lo que está claramente confirmado es que, en la mayoría de los casos, la parasitación leve por *Ascaris* es asintomática (Chehayeb *et al.*, 2014; Kanneganti *et al.*, 2013) indicando una importante adaptación parásito-hospedador. Esto mismo sucede con otros ascáridos como *Toxocara canis* y su hospedador definitivo: el perro (*Canis lupus familiaris*). *Anisakis* también está muy adaptado a su hospedador definitivo cetáceo pero no lo está al hombre, que es su hospedador accidental. El ser humano ingiere pescado desde hace más de 100.000 años (paleolítico) según los fósiles de peces marinos encontrados en el yacimiento arqueológico de Terra Amata, Francia datados en unos 380.000 años. Si por el contrario pensamos en el *Homo erectus*, ya se encontraron fósiles de dientes de carpas de 780.000 años en un yacimiento arqueológico israelí en el valle del Jordán conocido como *Gesher Benot Ya'aqov*. Esta es la evidencia más antigua del consumo de pescado en la prehistoria (Zohar y Biton, 2011). Claramente nuestra historia evolutiva como hospedadores de *Anisakis* es insignificante frente a la de sus hospedadores definitivos. Es por ello, por lo que *Anisakis* es el único helminto parásito que se considera productor de alergias asociadas a su parasitación siendo la frontera entre la parasitología y la alergología (Daschner *et al.*, 2012).

Nuestro sistema inmunológico ha evolucionado coexistiendo con helmintos parásitos frente a los que había que luchar, siendo éstos la principal fuerza selectiva de los genes de las interleucinas (Fumagalli *et al.*, 2009). Sin embargo, las medidas sanitarias actuales que reducen las infecciones por helmintos han alterado la homeostasis inmunológica aumentando nuestra susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y alérgicas (Allen y Maizels, 2011; Rook, 2009; Yazdanbakhsh *et al.*, 2002). Son muy interesantes las cuestiones planteadas sobre el efecto de la parasitación intermitente por *A. lumbricoides* y una posible potenciación del asma y la alergia en regiones tropicales con abundantes ácaros (Caraballo y Acevedo, 2011; Caraballo y Zakzuk, 2012). A pesar de estas cuestiones, es evidente que los helmintos son capaces de modular la liberación de mediadores pro-inflamatorios favoreciendo las citoquinas inmunoregulatoras IL-10 o TGF- β , la expansión de linfocitos T reguladores y la expansión de linfocitos Th2 a

la vez que inhibiendo la expansión clonal de linfocitos T de fenotipo inflamatorio. Esto conllevaría una mejora de la alergia y de las enfermedades autoinmunes. Además, en la actualidad se sabe que los helmintos, mediante la acción de sus proteasas para penetrar por los epitelios, liberan unas citoquinas denominadas alarminas como la IL-25 e IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP), que estimulan a las células linfoides de la inmunidad innata de tipo 2 (ILC2)⁶. Estas células producen IL-4, IL-5 e IL-13 estimulando respuestas Th2 y a su vez provocan la diferenciación de las células caliciformes del epitelio, que producen mucinas y proteínas similares a la resistina tipo β (RELM- β). También se generan linfocitos B reguladores que producen IL-10 además de los linfocitos T reguladores. Estos mecanismos deprimen las células Th1 y Th17 que están implicadas en la respuesta inflamatoria inicial (Figura 5). Todos estos efectos se producen en el contexto de una predisposición genética, en la que los helmintos pueden alterar la respuesta inmune, a través de la regulación evolutiva del “immunoma”, así como la regulación epigenética en etapas clave del desarrollo, como en el periodo intrauterino y en los primeros meses de vida (Khan y Fallon, 2013; Wammes *et al.*, 2014).

Finalmente, cabe mencionar un mecanismo muy característico de los parásitos para la evasión de la respuesta inmune de su hospedador: el fenómeno de mimetismo molecular. Este fenómeno se conoce en detalle para *Trypanosoma cruzi*. Según el último informe de la OMS ([Nota descriptiva N°340, marzo 2016](#)), de los aproximadamente siete millones de personas infectadas, el 30% sufren trastornos cardiacos, que en muchos casos parecen estar derivados de problemas de autoinmunidad. El parásito imita numerosas proteínas del hospedador para no ser reconocido por su sistema inmunitario, entre las que se encuentran proteínas del tejido muscular y nervioso (Cunha-Neto *et al.*, 2006; Ferrari *et al.*, 1995). En los nematodos como *Ascaris*, se ha observado la presencia de antígenos sanguíneos P1 humanos adsorbidos durante los estadios hemáticos de su ciclo biológico (Ponce De León *et al.*, 2010). En el caso de los helmintos, los antígenos de excreción-secreción son adsorbidos en la cutícula para modificar la respuesta inmune dirigiendo una respuesta Th2 o bien para iniciar respuestas reguladoras (Harnett, 2014).

⁶ Las ILC2 (células linfoides de la inmunidad innata de tipo 2) es el nombre por el que se conoce a unos linfocitos “no B no T” que han recibido diferentes nombres particulares como: “nuocitos” por ser leucocitos con elevados niveles de expresión de IL-13 y siendo la letra griega ν (en inglés “nu”) la 13ª de este alfabeto (Neill *et al.*, 2010), “células ayudadoras naturales” o “células linfoides asociadas al tejido adiposo (FALC)” (Duerr y Fritz, 2016).

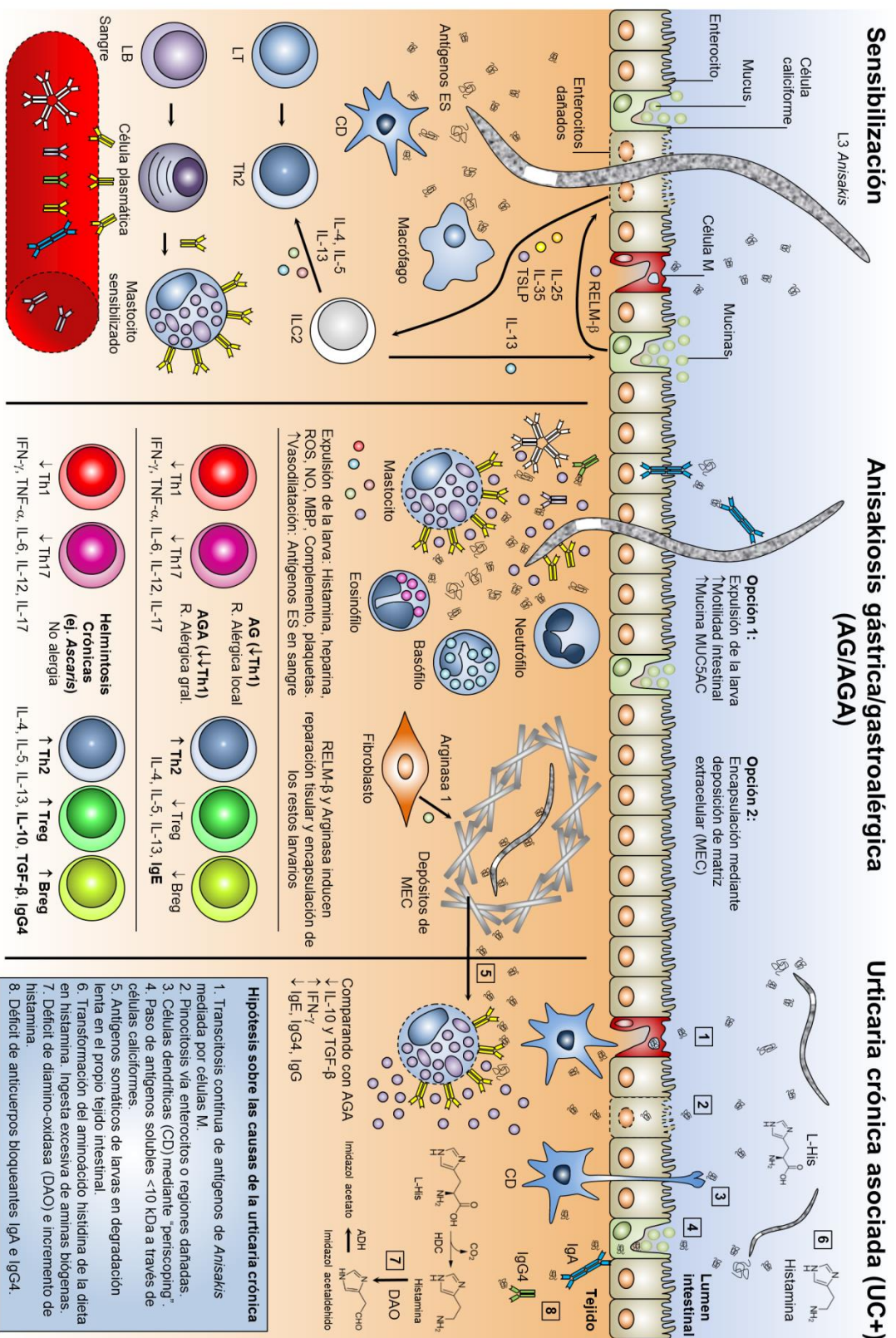


Figura 5. Patogenia de *Anisakis simplex* en el contexto del paradigma de la regulación inmunológica por helmintos. 1.3: larvas de tercer estadio, CD: Célula dendrítica, RELM-β: proteínas similares a la resistina tipo β, TSLP: linfopoyetina estromal tímica, LT: Linfocito T, LB: Linfocito B, ILC2: células inmóviles de la inmunidad innata de tipo 2, ROS: Especies reactivas de oxígeno, NO: Óxido nítrico, MBP: Proteína básica principal de los granulos de eosinófilos, ES: Excretor/Secretor, AGA: Anisakiosis gástrica, AGA: Anisakiosis gastroalérgica, R. alérgica: reacción alérgica, MEC: Matriz extracelular, L-His: Histidina, HDCC: Histidina descarboxilasa, ADH: Aldehído deshidrogenasa (Allen y Matzels, 2011; Daschner *et al.*, 2012; Khan y Fallon, 2013; Mabbot *et al.*, 2013; Wammes *et al.*, 2014).

1.3.2. Inmunoinformática

Existen hoy en día numerosas herramientas inmunoinformáticas como bases de datos de alérgenos, programas para predecir alérgenos o alérgenicidad, epítopos y reacciones cruzadas. Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos para predecir por primera vez la alérgenicidad de un antígeno. Solo se sabe que cualquier antígeno puede ser alérgénico si evita *in vivo* que se activen los mecanismos supresores de la respuesta Th2 (linfocitos Th1 y células CD8, linfocitos Treg y citoquinas como IL-10 o TGF- β). A pesar de todo esto, la principal limitación de la inmunoinformática en este momento es que no se conocen muchos de los alérgenos que no son principales (los que son reconocidos pero por menos del 50% de los pacientes sensibilizados) en las bases de datos (Aalberse y Stadler, 2006)

Los epítopos⁷ por definición son las regiones de un antígeno reconocidas por un anticuerpo o un receptor de antígenos. Un epítopo T es un péptido corto procedente de un antígeno proteico fragmentado, que se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (CPH en español o MHC en inglés) y es reconocido por un linfocito T. Por el contrario, un epítopo B es un determinante antigénico reconocido por linfocitos B y que es habitualmente discontinuo en la estructura primaria del antígeno (Janeway *et al.*, 2001). Por lo tanto, las características más importantes de un epítopo B son: su localización en la superficie de la molécula (Kringelum *et al.*, 2013) y su unión tridimensional a los anticuerpos mediante fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (van Oss, 1995). Las modificaciones postraduccionales, al producirse en los residuos superficiales de un alérgeno, pueden afectar por tanto a su alérgenicidad. Podrían inducir nuevos epítopos, afectar a su tamaño, solubilidad, estabilidad y susceptibilidad a proteasas (Aalberse, 2000; Aalberse y Stadler, 2006).

Cada vez más se están empleando métodos para predecir *in silico* los epítopos conformacionales de las proteínas porque la localización exacta de los epítopos B es esencial para aplicaciones biomédicas como el diseño de vacunas o el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e inmunoterapia (Kringelum *et al.*, 2012). Los primeros trabajos en este campo se realizaron en 2007 para demostrar mediante análisis *in silico* de superficies que la proteína no alérgénica T1 tiene una superficie diferente a la del alérgeno Bet v1 aunque ambas pertenecen a la misma familia (Ghosh y Gupta-Bhattacharya, 2008). Se estima que alrededor del 90% de los epítopos son discontinuos o conformacionales (Arnon y van Regenmortel, 1992), por ello han surgido numerosas herramientas bioinformáticas para la predicción de este tipo de epítopos (Dhanda *et al.*, 2016; Kadam *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2013). Dos de estos programas pueden predecir los epítopos simplemente a partir de la secuencia cuando no exista la posibilidad de contar con un buen modelo tridimensional: [CBTOPE](#) y [Epitopia](#). Este último también dispone de la opción de introducir una estructura tridimensional. [PEASE](#) emplea la secuencia del anticuerpo específico que se une al antígeno problema para identificar los epítopos sobre su estructura tridimensional. El resto parten simplemente de una estructura proteica tridimensional: [BEpro](#) (antiguamente PEPITO), [B-Pred](#), [CEP](#), [ElliPro](#), [EPSVR](#), [EPCES](#) y [SEPPA 2.0](#). Uno de los mejores en términos de sensibilidad/especificidad ($A_{ROC}=0,824$) y más fáciles de utilizar es Discotope. Es un programa gratuito en el que a partir de la estructura tridimensional, que el usuario introduce en la interfaz web

⁷ Los epítopos también son llamados “determinantes antigénicos”.

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>), se obtiene una puntuación para cada aminoácido (*Discotope Score*) que representa la probabilidad de ser o no epitopo. Este programa está basado en:

- 1) Las diferencias estadísticas en la composición de aminoácidos presentes en epitopos y presentes en regiones que no son epitopos, calculadas como probabilidades de un aminoácido de ser o no epitopo (propensión) a partir de datos estructurales experimentales de inmunocomplejos (antígeno-anticuerpo).
- 2) La definición de los residuos más próximos espacialmente a ese aminoácido para integrar esas probabilidades.
- 3) La medida de la superficie expuesta.

La versión mejorada de Discotope (Discotope 2.0) utiliza una redefinición del cálculo de la afectación de esos residuos cercanos a la propensión de ser o no epitopo y emplea una semiesfera hacia el exterior de la molécula como medida de la superficie expuesta (Kringelum *et al.*, 2012). Recientemente, ha sido publicado un protocolo para realizar análisis con Discotope 2.0 (Nielsen y Marcatili, 2015).

En la actualidad también disponemos de algoritmos como los descriptores 3D-Zernike, que se han empleado para realizar eficientes comparaciones entre superficies proteicas (Sael y Kihara, 2009). En estos descriptores se basa el programa 3D-Surfer que se puede utilizar gratuitamente desde la web (<http://kiharalab.org/3d-surfer/submit.php>) y permite la comparación de proteínas basándose en su superficie tridimensional (La *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico de la anisakiosis mediante el descubrimiento de nuevos alérgenos y el estudio de las reacciones cruzadas con otros organismos.
2. Descubrir nuevas posibles causas de urticaria crónica a través del estudio serológico de pacientes sensibilizados y no sensibilizados a *Anisakis simplex*.

Objetivos específicos

1. Identificar las diferencias de estructura primaria y secundaria entre las tropomiosinas de invertebrados (alérgicas) y vertebrados (no alérgicas), así como sus diferencias en digestibilidad y modificaciones postraduccionales.
2. Identificar los epitopos en la superficie de las moléculas de tropomiosina y agruparlos según su similitud topológica.
3. Establecer una metodología de análisis bioinformático de superficies moleculares para el desarrollo de nuevas herramientas orientadas a la predicción de reacciones cruzadas.
4. Medir y analizar los niveles de diamino-oxidasa sérica en pacientes con diferentes fenotipos de urticaria crónica estudiando su relación con la ingesta de pescado.
5. Estudio del papel de la tropomiosina en las reacciones cruzadas de los pacientes con anisakiosis y/o urticaria crónica.
6. Obtener y purificar nuevos posibles alérgenos de *Anisakis* como hemoglobina, miofilina y arginina quinasa para medir los niveles de IgE frente a ellos en pacientes sensibilizados al parásito y desarrollar una herramienta más sensible y específica para el diagnóstico de la anisakiosis.
7. Estudiar los epitopos y la estructura tridimensional de la hemoglobina de *Anisakis*.
8. Determinar la presencia de IgE frente a pescado en pacientes con síntomas adversos tras su ingesta y estudiar el papel de su tropomiosina como alérgeno clínicamente relevante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Análisis de laboratorio

3.1.1. Organismos y procedencia

Los organismos empleados en esta tesis se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Organismos del estudio.

Filo/Clase	Organismo	Observaciones
Chordata		
<i>Mammalia</i>	<i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	Porción de lomo
	<i>Bos Taurus</i> (Vaca)	Porción de cadera
	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	Músculo de extremidad trasera sin hueso
<i>Aves</i>	<i>Gallus gallus</i> (Pollo)	Porción de muslo sin hueso
<i>Actinopterygii</i>	<i>Lophius piscatorius</i> (Rape)	Músculo con piel y sin espinas
	<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)	Porción muscular con piel y sin espinas
	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Tilapia mozambiqueña)	Músculo sin piel y sin espinas. Congelado
	<i>Thunnus alalunga</i> (Bonito)	Músculo sin piel y sin espinas
	<i>Thunnus thynnus</i> (Atún del Atlántico)	Músculo sin piel y sin espinas
	<i>Xiphias gladius</i> (Emperador)	Músculo sin piel y sin espinas. Congelado
	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Gallo)	Músculo con piel y sin espinas
	<i>Merluccius merluccius</i> (Merluza europea)	Músculo con piel y sin espinas
	<i>Gadus morhua</i> (Bacalao del Atlántico)	Músculo con piel y sin espinas
	<i>Salmo salar</i> (Salmón del Atlántico)	Músculo con piel y sin espinas
	<i>Salmo trutta</i> (Trucha)	Músculo con piel. Con alguna espina
	<i>Engraulis encrasicolus</i> (Boquerón europeo)	Músculo con piel. Con alguna espina
<i>Chondrichthyes</i>	<i>Raja brachyura</i> (Raya)	Músculo con piel y sin espinas
Mollusca		
<i>Bivalvia</i>	<i>Ensis arcuatus</i> (Navaja)	Sin concha
	<i>Cerastoderma edule</i> (Berberecho)	Sin concha
	<i>Ruditapes philippinarum</i> (Almeja japonesa)	Sin concha
	<i>Mytilus edulis</i> (Mejillón)	Sin concha. Crudo y cocido
<i>Cephalopoda</i>	<i>Loligo vulgaris</i> (Calamar)	Porción muscular del cuerpo sin intestinos
	<i>Octopus vulgaris</i> (Pulpo)	Tentáculo y cabeza. Crudo y cocido
Arthropoda		
<i>Malacostraca</i>	<i>Palaemon serratus</i> (Camarón)	Completo. Cocido
	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Langostino blanco)	Sin cabeza
	<i>Procambarus clarkii</i> (Cangrejo de río)	Sin cabeza
	<i>Necora puber</i> (Nécora)	Extremidades
<i>Arachnida</i>	<i>Dermatophagoides</i> spp. (Ácaro del polvo)	Extracto comercial (ASAC)
	<i>Lepidoglyphus destructor</i> (Ácaro de almacén)	Sin extracto. Solo ImmunoCAP®
<i>Insecta</i>	<i>Blatella germanica</i> (Cucaracha)	Completa
Nematoda		
<i>Chromadorea</i>	<i>Anisakis simplex</i> L3 (Anisakis)	Completas
	<i>Ascaris suum</i> adultos (Ascaris)	Completos
<i>Enoplea</i>	<i>Trichinella spiralis</i> L1 (Triquina)	Completas

L1: Larvas de primer estadio, L3: Larvas de tercer estadio.

Todos se utilizaron para realizar extractos proteicos, excepto el ácaro *Lepidoglyphus destructor* que solo fue utilizado como antígeno comercial para detectar IgE específica de pacientes mediante ImmunoCAP® (Phadia AB, Uppsala, Suecia). Cabe destacar también, que el extracto de *Dermatophagoides* spp. fue suministrado y previamente preparado por los laboratorios ASAC Pharmaceutical Immunology (Alicante, España). Todas las muestras procedieron de mercados de la Comunidad de Madrid excepto: la tilapia mozambiqueña que fue adquirida en un restaurante de Alicante, las larvas de *Anisakis* que fueron extraídas de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) destinadas al consumo humano, las larvas de *Trichinella* que fueron aisladas de ratones infectados experimentalmente y cedidas por el Departamento de Parasitología de la UCM, los adultos de *A. suum* que fueron también cedidos por el Departamento y los ejemplares de *Blatella* que fueron capturados en viviendas de Madrid.

3.1.2. Extracción de proteínas

Se realizó una extracción de los antígenos mediante una homogeneización mecánica manual de los organismos del estudio (Tabla 4) en mortero o en tubos (para los organismos más pequeños) añadiendo PBS hasta formar una pasta uniforme. Tras la homogeneización, se sonicaron los extractos en hielo durante 10 segundos, seis veces con pausas en hielo para su enfriamiento y se procedió a la extracción una noche a 4°C con PBS. Al día siguiente los extractos se centrifugaron a 6700 g durante 1 min para separar los restos de tejido y los sobrenadantes se trataron con n-hexano proporción 3:7 (ml Hexano:ml Extracto) para eliminar los lípidos. Para acelerar la separación de las fases se centrifugaron de nuevo a 6700 g durante 1 min recogiendo la fase acuosa. Tras realizar una diálisis en membranas de 12-14 kDa (Medicell Intl. Ltd., London, Reino Unido) frente a PBS, se valoró el contenido proteico utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Múnich, Alemania).

3.1.3. Valoración de proteínas. El método de Bradford

Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) partiendo de una solución madre de BSA en PBS (1 mg/ml). En tubos de 1,5 ml se añadieron las siguientes cantidades de esta solución madre de BSA o del extracto sobre PBS; y finalmente se añadió el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) (Tabla 6).

Tabla 6. Curva patrón de BSA para la valoración de un extracto por el método de Bradford.

Tubo	1	2	3	4	5	6	Blanco	Extracto
BSA en PBS (1 mg/ml)	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl	0 µl	5 µl de EXTRACTO
PBS	798 µl	796 µl	792 µl	788 µl	784 µl	780 µl	800 µl	795 µl
Reactivo de Bradford	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

A continuación se invirtieron los tubos y tras cinco minutos se procedió a la lectura espectrofotométrica a 595 nm. Tras restar la absorbancia del blanco se determinó la ecuación de la recta de regresión lineal [$\text{Absorbancia} = a \cdot \text{Concentración} (\mu\text{g/ml}) + b$] considerando que la concentración de los tubos 1 al 6 fue 2, 4, 8, 12, 16 y 20 µg/ml respectivamente. Extrapolando en la ecuación de la recta obtuvimos la concentración proteica del extracto problema (µg/ml) tras la multiplicación por 200 como factor de dilución (1000 µl volumen final/5 µl volumen inicial de extracto).

3.1.4. Diálisis renaturalizante

Esta diálisis se empleó para plegar proteínas recombinantes desnaturalizadas por solubilización en urea 8M y de este modo eliminar la urea y así poder emplearlas para la inmunización de animales de laboratorio y para la realización de técnicas inmunológicas. En primer lugar se preparó el tampón de renaturalización (Tris 20mM, NaCl 500mM, Urea 8M, L-Arg 0,4~0,6M, PEG8000 al 1%, pH 8,0). Si la proteína tenía puentes de disulfuro, se añadió glutatión reducido 0,4 mM y glutatión oxidado 0,04 mM. A continuación se dializó la proteína empleando la misma membrana de 12-14 kDa (Medicell Intl. Ltd., London, Reino Unido) en el tampón de renaturalización durante 8 h. Tras este paso, se preparó el tampón de dilución (Tris 20mM, NaCl 500mM, L-Arg 0,4~0,6M, PEG8000 al 1%, pH 8,0) para conseguir concentraciones decrecientes de urea (4M, 3M, 2M, 1,5M, 1M, 0,75M, 0,5M y 0,25M) tras varias diálisis sucesivas de 8 h, para finalmente dializar en PBS.

3.1.5. Proteínas recombinantes

a) Tropomiosina recombinante de *Anisakis simplex* (rAni s 3)

Esta proteína fue proporcionada por la Dra. M^a Jesús Perteguer (ISCIII, Majadahonda, Madrid, España). Los cebadores se diseñaron en base a la secuencia de mRNA de la tropomiosina de *Anisakis* (GenBank: [Y19221.1](#)) y esta secuencia se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN complementario al ARN mensajero codificante (cDNA) de *Anisakis*. Este cDNA de *A. simplex* se preparó empleando el kit de amplificación de cDNA Marathon[®] (Clontech, Mountain View, CA) a partir de mRNA aislado de L3 de *Anisakis* con el kit FastTrack[®] (Invitrogen, San Diego, CA).

Cebador directo 5'-ATGGATGCTATCAAGAAAAAGATGCAGGC-3'

Cebador inverso 5'-TCAATATCCGGAAAGTTCTTGGGAAGGTTTG-3'

El gen de la tropomiosina fue de nuevo amplificado con cebadores con los sitios de reconocimiento (subrayados) para las enzimas de restricción BamHI en el cebador directo y HindIII en el inverso:

Cebador directo 5'-GAGAGAGAG-GATCCATGGATGCTATCAAGAAAAAGATGCA-3'

Cebador inverso 5'-TCTCTCTCA-AGCTTTCATATCCGGAAAGT-3'

Tras la digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII del inserto generado previamente y del plásmido pRSET A (Invitrogen), se expandió el plásmido recombinante en *Escherichia coli* XL1Blue MRF' (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^R)]), (Stratagene, San Diego, CA) y se transformaron con él bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS [F-, *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B) gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)] (Invitrogen) competentes para la expresión de la proteína. Posteriormente, la tropomiosina de *Anisakis* fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel inmovilizado ya que al utilizar ese plásmido, la proteína se expresó con seis histidinas adicionales en una etiqueta presente en extremo N-terminal. Durante el proceso se produjeron tres mutaciones: A110D, T170A, T185A en la tropomiosina con respecto a la secuencia de proteína para la que codifica el mRNA del GenBank citado anteriormente. Esta proteína se nombró como rAni s 3.

b) Tropomiosina recombinante de *Pandalus borealis* (rPan b 1)

Esta proteína fue proporcionada por la Dra. Maaike Dooper (Veterinærinstituttet, Oslo, Noruega) y la metodología empleada para su obtención se encuentra publicada (Myrset *et al.*, 2013). En resumen, esta proteína se obtuvo diseñando los cebadores en base a la secuencia de mRNA de la tropomiosina de *Pandalus eous* (GenBank: [AB270631.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AB270631.1)) y se amplificó la región codificante para la tropomiosina de *P. borealis* mediante PCR usando el cDNA de este crustáceo. Este cDNA de *P. borealis* se preparó empleando el kit de amplificación de cDNA SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) a partir de mRNA aislado de crustáceos de esta especie mediante el kit RNeasy® Fibrous Tissue (QIAGEN, Germantown, MD).

Cebador directo 5'-CTTTCTCAGTTCTTTTGTGG-3'

Cebador inverso 5'-AAAGTGAATAATGAGATAAAATAAGC-3'

En este caso se utilizó el plásmido pET19b (Novagen, Darmstadt, Alemania) empleando el método In-Fusion® (Zhu *et al.*, 2007) incluyendo en los cebadores ≥ 15 nucleótidos solapantes (subrayados) con el vector de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Clontech, Mountain View, CA).

Cebador directo 5'-GACGACGACGACAAGATGGACGCCATCAAGAAGAAG-3'

Cebador inverso 5'-GCTTTGTTAGCAGCCTTAGTAGCCAGACAGTTCGCTGA-3'

Posteriormente se expandió el vector con el inserto en *Escherichia coli* XL10-Gold® (Stratagene) utilizándose para transformar *Escherichia coli* Rosetta® (DE3)pLacI (Novagen) competentes para la expresión de la proteína. Posteriormente, la tropomiosina de *P. borealis* fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de cobalto inmovilizado ya que al utilizar ese plásmido, la proteína se expresó con seis histidinas adicionales presentes en una etiqueta del extremo N-terminal. Esta proteína se nombró como rPan b 1 (Myrset *et al.*, 2013).

c) Hemoglobina recombinante de *Anisakis simplex*

Esta proteína fue proporcionada por la Dra. M^a Jesús Perteguer (ISCIII, Majadahonda, Madrid, España). Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia de un contig de 999 bp. que codificaba para una hemoglobina de 332 aminoácidos, obtenido de la base de datos del transcriptoma de *Anisakis* del ISCIII que se muestra a continuación (subrayado el péptido señal).

```

1 M H S S L V A L A I V L F V A I A S A S
1 ATGCACTCGTCACTAGTAGCTTTGGCCATCGTCCTCTTCGTAGCCATCGCCTCAGCATCA
21 K T R E L C M K S L E H A K V G S S K E
61 AAAACGCGAGAGCTATGCATGAAATCGCTTGAACACGCCAAAGTTGGCTCGAGCAAAGAG
41 A K Q D G V D L Y K H M F E H Y P V M K
121 GCGAAGCAGGATGGTGTGCGACCTCTACAAGCATATGTTCGAGCACTATCCGGTGATGAAG
61 K Y F K H R E G Y T A A D V Q K D P F F
181 AAATACTTCAAACATCGCGAAGGTTATACGGCCGCTGATGTGCAGAAGGATCCCTTCTTC
81 I K Q G Q N I L L A C H I L C A T F D D
241 ATCAAGCAAGGTCAAAACATCCTGCTCGCATGCCACATCTGTGCGCCACGTTTCGATGAT
101 R E T F D A Y T H E L M A R H E R D H V
301 CGTGAAACATTTCGACGCCTACACCCACGAGCTGATGGCGCGACACGAGCGAGACCATGTC
121 R I P N D V W A H F W E H F N M Y L A E

```

361 AGAATACCCAACGACGTCTGGGCTCACTTTTGGGAGCATTTC AATATGTACCTCGCAGAG
 141 K T T M D E P T K Q A W L E I G K E F A
 421 AAGACCACGATGGACGAGCCAACCAAAACAAGCTTGGCTCGAGATCGGAAAAGAATTTCGCA
 161 Y E I N K Y G R P T V R D H C M S S L E
 481 TACGAGATCAATAAGTACGGTCGACCCACTGTTTCGTGACCATTGCATGAGCTCGTTGGAG
 181 H I A I G D E A H Q K Q N G V D L Y K H
 541 CATATCGCCATCGGAGATGAGGCACACCAGAAGCAGAATGGCGTTGATCTTTACAAGCAT
 201 M F E H Y P H M R S A F K G R E N Y T A
 601 ATGTTTGAACATTATCCACACATGAGATCGGCATTCAAGGGACGCGAGA AACTACACGGCT
 221 E D V Q K D E F F V K Q G H K I L L A L
 661 GAGGACGTGCAGAAGGACGAGTTCTTCGTTAAACAAGGACACAAGATTCTGTTGGCTCTT
 241 R M L C T S Y D D E P T F D F F V D A L
 721 CGCATGCTTTGCACGTCGTACGATGACGAGCCGACGTTTCGATTTCTTCGTTGACGCACTC
 261 L D R H I K D D I H L P Q A Q W H E F W
 781 TTGGATCGTCACATCAAAGACGACATCCATCTGCCGCAAGCGCAATGGCATGAATTCTTG
 281 K L F A E Y L D Q K S H S H L T E D E K
 841 AAATTGTTTTCGCGGAATATTTGGATCAAAAAGAGTCACAGCCATTTGACGGAGGATGAGAAA
 301 H S W T T I G E E F G H E A D K H A K A
 901 CATTCGTGGACGACGATTGGTGAGGAGTTTGGGCACGAGGCCGACAAGCACGCCAAAGCC
 321 G H H E G E H K E E H H *
 961 GGACACCACGAGGGAGAGCACAAGGAGGAACACCACTGA

Esta secuencia se amplificó mediante PCR a partir de cDNA de *Anisakis* (ver tropomiosina de *Anisakis*).

Cebador directo 5'-ATGCACTCGTCACTAGTAGCTTTGGCC-3'

Cebador inverso 5'-TCAGTGGTGTTCCTCCTTGTGCTCT-3'

Las condiciones de la reacción fueron 94°C durante 1 min, 30 ciclos de: 94°C – 5 s, 50°C – 30 s, 72°C – 2 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de la PCR fue purificado mediante electroforesis, clonado en pGEM®-T Easy cloning vector (Promega, Madison, WI) y secuenciado por el método de Sanger empleando ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA; Unidad de Genómica, CNM-ISCIH, Madrid, España).

El gen de la hemoglobina de *Anisakis* sin el péptido señal fue de nuevo amplificado con cebadores con los sitios de reconocimiento (subrayados) para las enzimas de restricción SmaI en el cebador directo y PstI en el inverso:

Cebador directo 5'-GAGAGAGACCCC-GGGTCAAAAACGCGA-3'

Cebador inverso 5'-TCTCTCTCIGCA-GTCAGTGGTGTTCCTCC-3'

La PCR (50 µl) se llevó a cabo con 3 ng de DNA molde, los cebadores (10 µM), 1,5 µl de la mezcla de desoxirribonucleósidos tri-fosfato (dNTPs) y 1 µl de polimerasa Taq⁸ (1U/µl) (Biotools, Madrid, España). Las condiciones de la reacción fueron 94°C durante 1 min, 5 ciclos de: 94°C – 30 s, 72°C – 4 min; 5 ciclos de: 94°C – 30 s, 70°C – 4 min y 25 ciclos 94°C – 20 s, 68°C – 4 min y una extensión final a 72°C durante 10 min. El vector pQE32 se digirió con las endonucleasas SmaI y PstI y posteriormente

⁸ De la bacteria *Thermus aquaticus*.

la secuencia amplificada de la hemoglobina se insertó en este vector. Los productos de la digestión se incubaron durante 30 min con la ligasa T4 a temperatura ambiente y se transformaron con el plásmido recombinante *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene) (Sambrook y Russell, 2001). Todos los plásmidos recombinantes fueron igualmente verificados por secuenciación.

Posteriormente, se transformaron cepas M15 (pREP4) de *E. coli* con los plásmidos recombinantes. Para la expresión de la proteína recombinante, una colonia positiva fue inoculada en 100 ml de medio LB con ampicilina 100 mg/l y kanamicina 25 mg/l e incubada a 37°C en agitación a 200 rpm. La expresión de proteína recombinante fue inducida con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 1 mM, a 37°C durante 4 h. Después de la expresión de la proteína, las bacterias fueron recogidas mediante centrifugación y resuspendidas en 20 ml del reactivo para la extracción de proteínas de bacterias B-PER[®] (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), siendo incubadas durante 20 minutos y posteriormente centrifugadas 20 minutos a 38280 g. El sobrenadante se desechó y el precipitado se purificó empleando columnas Ni Sepharose[®] 6 Fast Flow (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido) en condiciones desnaturizantes. La elución se realizó con un tampón de Tris 0,15M, imidazol 250 mM, pH 10,5. La hemoglobina recombinante de *Anisakis* se valoró empleando un kit de BCA (ácido bicinónico) (Pierce Biotechnology) empleando concentraciones conocidas de BSA (Smith *et al.*, 1985).

d) Miofilina de *Anisakis simplex*

El cDNA de *Anisakis* fue obtenido por la Dra. M^a Jesús Perteguer (ISCI, Majadahonda, Madrid, España). Se diluyó 1/50 en Tricina-EDTA y tras calentarlo dos minutos a 96°C se enfrió en hielo para favorecer su desenrollamiento y la unión de los cebadores. Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia del contig completo [ASIM_contig0009606](#). Todos los cebadores se encargaron a Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania). Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 7.

Cebador directo 5'-ATGGCCTCACGTGCTGAAAAGTCTGG-3'

Cebador inverso 5'-TTACATATGGCGCGTGTACCAATGTTGA-3'

Tabla 7. Condiciones para la amplificación de la miofilina de *Anisakis* mediante PCR.

PCR	Volumen (μl)	Paso	Temp. (°C)	Tiempo
H ₂ O	6,8	1. Activación KOD	95	2 min
KOD master mix	10	2. Desnaturalización	95	30 s
Cebador directo (10μM)	0,6	3. Anillamiento	61	30 s
Cebador inverso (10μM)	0,6	4. Elongación	70	2 min
cDNA <i>Anisakis</i> 1:50	2	Repetición pasos 2, 3, 4	-	40 veces
Total:	20	5. Elongación final	70	7 min
		6. Conservación	4	∞

El calentador de la tapa del termociclador se programó a 105°C. Agua ultrapura obtenida con sistemas MilliQ[®] con filtro anti polisacáridos bacterianos y libre de RNasas [< 1 (pg/ml)] y DNasas [< 5 (pg/ml)]. KOD⁹ Hot Start Master Mix cat nr. 71842-3 (Novagen-Millipore, Darmstadt, Alemania).

⁹ KOD es una enzima polimerasa procedente de *Thermococcus kodakaraensis* de alta fidelidad (introduciendo una mutación por cada 1000 bases), con una tasa de elongación de 106-138 bases/s pudiendo añadir más de 300 bases por cada ciclo de reacción y molécula de enzima.

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con GelRed® (Biotium, Hayward, CA) a una dilución 1:10000 (100 V, 70 min, tampón TAE 1x preparado a partir de una solución madre 50x Millipore, Darmstadt, Alemania) añadiendo en cada carril 5 µl del producto de la PCR mezclados con 1 µl del colorante de muestra 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se utilizaron 5 µl de O'GeneRuler® 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) como marcador (50-1000 bp). Tras observar la banda clara y única del producto de la PCR se limpió de restos de cDNA y cebadores empleando QIAquick® PCR purification Kit (QIAGEN), se valoró su concentración mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm) y su pureza mediante el ratio de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm considerándose puro si $A_{260}/A_{280} \approx 1,8$ junto con un ratio de la absorbancia a 260 nm y a 230 nm considerándose puro si $A_{260}/A_{230} = 2,0-2,2$ (ThermoScientific, 2011).

La ley de Lambert-Beer, correlaciona la absorbancia (A) de un cromóforo, en este caso DNA, con la concentración (C) expresada en mol/l (M) de ese cromóforo en base a su coeficiente de extinción molar o absorptividad molar (ϵ) expresada en $M^{-1}cm^{-1}$ con un paso óptico (l) expresado en cm:

$$A_{\lambda(nm)} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Si la concentración se mide en µg/ml entonces ϵ es el coeficiente de absorción específico expresado en $(\mu g/ml)^{-1}cm^{-1}$. El valor de ϵ para el DNA de doble cadena (dsDNA) es de $0,020 (\mu g/ml)^{-1}cm^{-1}$ y se obtiene una $A_{260}=1$ para una concentración de dsDNA=50 µg/ml. La absorbancia a 280 nm refleja contaminación de la muestra con proteínas y a 230 nm contaminación con fenol o urea; por lo tanto la presencia de dichos contaminantes reducirán esos ratios de pureza establecidos (Gallagher y Desjardins, 2007).

Posteriormente se envió una alícuota limpia de 20 µl (10-50 ng/µl) a GATC Biotech (Konstanz, Alemania) para su secuenciación.

Tras comprobar que la secuencia amplificada era la adecuada, se procedió a amplificarla pero esta vez utilizando cebadores pensados para realizar el método In-Fusion® (Zhu *et al.*, 2007) en los que se incluyen ≥ 15 nucleótidos solapantes (subrayados) con los extremos del plásmido linealizado escogido (pTriEx®-6 3C/LIC (5070 bp) (Novagen). El plásmido se linealizó mediante PCR previa empleando los cebadores:

Cebador directo (unión 2275-2293 bp): 5'-GGCTGCTAACAAAGctaagtgattaacctcagg-3'

Cebador inverso (unión 2084-2116 bp): 5'-catggtatatctcctttgattgtaataaaatg-3'

Las letras minúsculas indican que es una secuencia propia del plásmido y las mayúsculas indican que es una secuencia externa añadida con el cebador. Las secuencias subrayadas son las secuencias solapantes de ≥ 15 nucleótidos con las que se construirán (haciendo la complementaria reversa) los cebadores inverso y directo de nuestro inserto, respectivamente. Para la PCR de linealización del vector se emplearon 0,5 µl del plásmido comercial (10 ng/µl) y en un volumen final de 20 µl con los mismos reactivos que para la amplificación por PCR de la secuencia anterior. Las diferencias en las condiciones de la PCR fueron: 3 min de activación de la KOD polimerasa, el anillamiento a 58°C y 25 repeticiones con una temperatura de elongación final de 72°C durante cinco minutos.

Una vez obtenido el plásmido lineal, realizamos la PCR para amplificar el inserto con los cebadores pensados para realizar el método In-Fusion[®] mencionados anteriormente que incluían las secuencias solapantes con los extremos del plásmido linealizado y también una secuencia codificante para seis histidinas (negrita) en el cebador directo. Las condiciones de esta PCR se muestran en la Tabla 8.

Cebador directo 5'-CAAAGGAGATATACCATGAAGCATCATCATCATCATCAG-ATGGCCTCACGTGCTGAAAAGTCTGG-3'

Cebador inverso 5'-GCTTGTAGCAGCCTTACATATGGCGCGTGTACCAATGTTGA-3'

Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la miofilina de *Anisakis* mediante PCR con cebadores diseñados para su inserción en el plásmido pTriEx[®]-6 3C/LIC mediante el método In-Fusion[®].

PCR	Volumen (μl)	Paso	Temp. (°C)	Tiempo
H ₂ O	7,8	1. Activación KOD	95	2 min
KOD master mix	10	2. Desnaturalización	95	30 s
Cebador directo (10μM)	0,6	3. Anillamiento	61	30 s
Cebador inverso (10μM)	0,6	4. Elongación	70	2 min
DNA Miofilina (10 ng/μl)	1	Repetición pasos 2, 3, 4	-	40 veces
Total:	20	5. Elongación final	70	7 min
		6. Conservación	4	∞

El calentador de la tapa del termociclador se programó a 105°C. Agua ultrapura obtenida con sistemas MilliQ[®] con filtro anti polisacáridos bacterianos y libre de RNasas [< 1 (pg/ml)] y DNasas [< 5 (pg/ml)]. KOD Hot Start Master Mix cat nr. 71842-3 (Novagen-Millipore, Alemania).

Tras la PCR, se realizó otra electroforesis en las mismas condiciones para observar que se realizó satisfactoriamente la amplificación de la secuencia con los nuevos cebadores. A continuación se preparó este inserto para el método In-Fusion[®].

El método In-Fusion[®] puede unir dos fragmentos de DNA que contengan 15 bp solapantes en sus extremos. Se basa en las propiedades de la DNA polimerasa de los poxvirus. Cuando se incubaba DNA de doble cadena con finales idénticos en presencia de Mg²⁺ y concentraciones bajas de dNTPs, la actividad reparadora de esta DNA polimerasa (3'-5') quita progresivamente nucleótidos del extremo 3'. En nuestro caso esto expuso las regiones complementarias de 15 nucleótidos del plásmido pTriEx linealizado con las que introdujimos mediante los cebadores en la secuencia amplificada anteriormente. Esto conllevó un anillamiento espontáneo obteniendo el plásmido con una región híbrida mellada en ambos flancos por huecos de 1-5 nucleótidos. Esta polimerasa de poxvirus tiene baja afinidad por el DNA mellado en comparación con los extremos de doble cadena de DNA. Serán los mecanismos de reparación de las bacterias *E. coli* una vez transformadas los que reparen estos huecos de los plásmidos recombinantes (Zhu *et al.*, 2007).

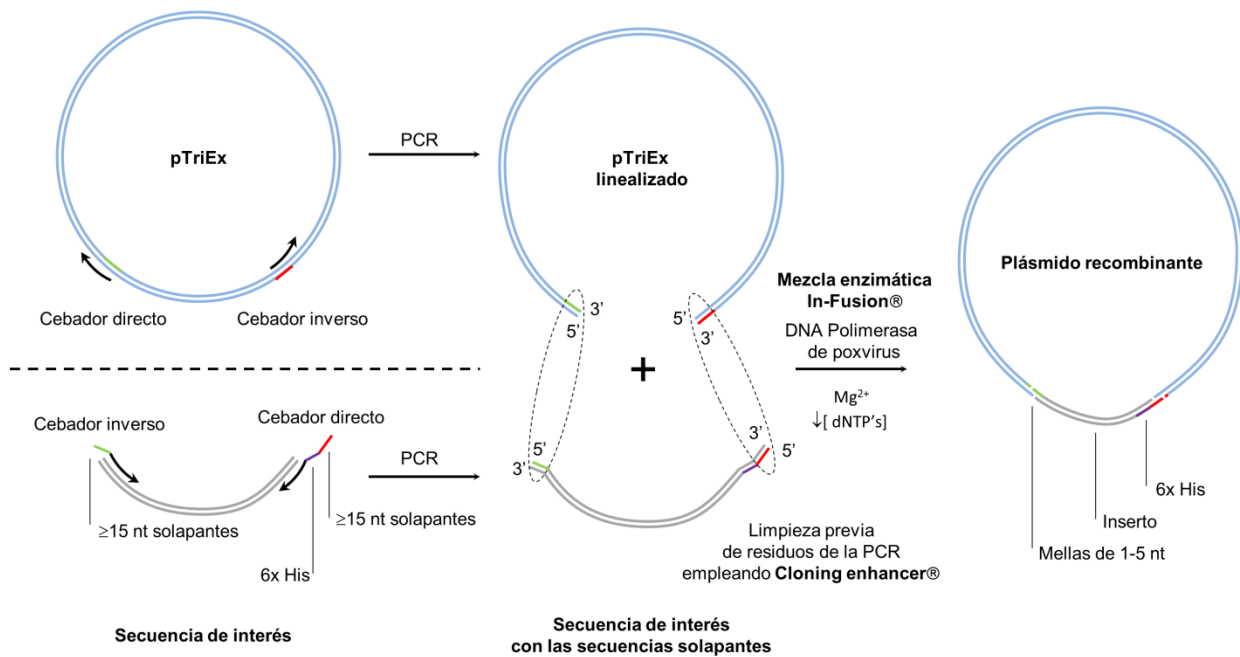


Figura 6. Síntesis de plásmidos recombinantes mediante el método In-Fusion®. Tras amplificar selectivamente un plásmido mediante PCR y obtenerlo linealizado, se fabrican unos cebadores que contengan ≥ 15 nucleótidos solapantes con los extremos del plásmido linealizado obtenido. Tras la PCR se realizó una limpieza del inserto mediante la incubación de 5 μl con 2 μl de Cloning enhancer® (Clontech) durante 15 min a 37°C y 15 min a 80°C. A continuación se mezclaron: 2 μl del plásmido linealizado, 0,5 μl del inserto limpio, 1 μl de la mezcla enzimática In-Fusion® y 1,5 μl de agua ultrapura durante 15 min a 50°C.

Posteriormente se introdujo el plásmido en *Escherichia coli* XL10-Gold® (Stratagene) mediante cambios de temperatura (hielo 30 min – baño a 42°C 30 s – hielo 2 min) y tras 1 h a 37°C en agitación se sembraron en placas de agar LB¹⁰ con ampicilina 100 mg/l ya que el plásmido pTriEx contiene el gen *bla* que codifica para la β -lactamasa y confiere resistencia a este antibiótico β -lactámico. Al día siguiente se pasaron cinco colonias a cinco tubos con el mismo medio de cultivo pero esta vez líquido y se cultivaron a 37°C durante 18 h. Al día siguiente se lisaron las bacterias para extraer los plásmidos recombinantes clonados empleando QIAprep Spin Miniprep kit® (QIAGEN). A continuación se valoró su concentración y pureza espectrofotométricamente y se envió una alícuota limpia de 20 μl (30-100 ng/ μl) a GATC Biotech (Konstanz, Alemania) para su secuenciación.

Finalmente, tras comprobar la secuencia, se transformaron con el plásmido bacterias *Escherichia coli* Rosetta® (DE3)pLacI (Novagen) competentes para la expresión de la proteína. Esta cepa ha sido diseñada para poseer ARNs de transferencia (tRNAs) que son clásicos en eucariotas pero que suelen estar ausentes en procariotas, por este motivo se utilizan para expresar proteínas de eucariotas. También es deficitaria en proteasas citoplasmáticas Lon y de membrana OmpT y es lisogénica, infectada por el fago λ DE3, el cual introduce el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control por el promotor *lacUV5*. Esta transformación se realizó igualmente mediante cambios de temperatura (hielo 5 min – baño a 42°C 30 s – hielo 2 min) y tras 1 h a 37°C en agitación se sembraron en placas de agar LB

¹⁰ Lysogeny broth: 10 g tripton, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl. Ajustar el pH a 7,5 y enrasar a 1 l con agua destilada (Bertani, 2004).

con ampicilina 100 mg/l, cloranfenicol 34 mg/l y glucosa al 0,5%. El cloranfenicol se añadió porque estas bacterias presentan en el plásmido pLacI el gen de resistencia a cloranfenicol *cat* que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa. Por lo tanto las bacterias transformadas correctamente con nuestro plásmido serán capaces de crecer en presencia de los antibióticos ampicilina (*bla* plásmido pTriEx) y cloranfenicol (*cat* plásmido pLacI). La glucosa sirve para que haya bajos niveles de AMP cíclico (cAMP) ya que la bacteria metaboliza esta fuente de carbono fácilmente a través de la glucólisis. Sin embargo, si no añadiésemos glucosa, aumentaría la concentración de cAMP que se uniría a su receptor: *cAMP receptor protein* (CRP) o también denominado *catabolite activator protein* (CAP). Este receptor activado (CAP/cAMP) se uniría al promotor *lac* y estimularía la transcripción mediante la RNA polimerasa de *E. coli*. Las cepas con el profago λ DE3 presentan el promotor *lacUV5*, que es el promotor *lac* mutado, para por un lado evitar que dependa tanto de CAP/cAMP y por otro que haya una mayor inducción por IPTG. Además, estas bacterias contienen el plásmido pLacI que contiene el gen del represor *lac*. Aunque ambos promotores *lac* y *lacUV5* están bien inhibidos en ausencia de IPTG, hay un nivel basal de actividad detectable. Este nivel de expresión basal de la RNA polimerasa del fago T7 haría que se expresase la proteína recombinante ya que se encuentra clonada a continuación del promotor T7 en el plásmido pTriEx y podría ser tóxica para las bacterias hospedadoras del plásmido. Por este motivo suplementando el medio LB con 0,5-1% de glucosa se evita esa expresión basal en ausencia de inductor (Novy y Morris, 2001).

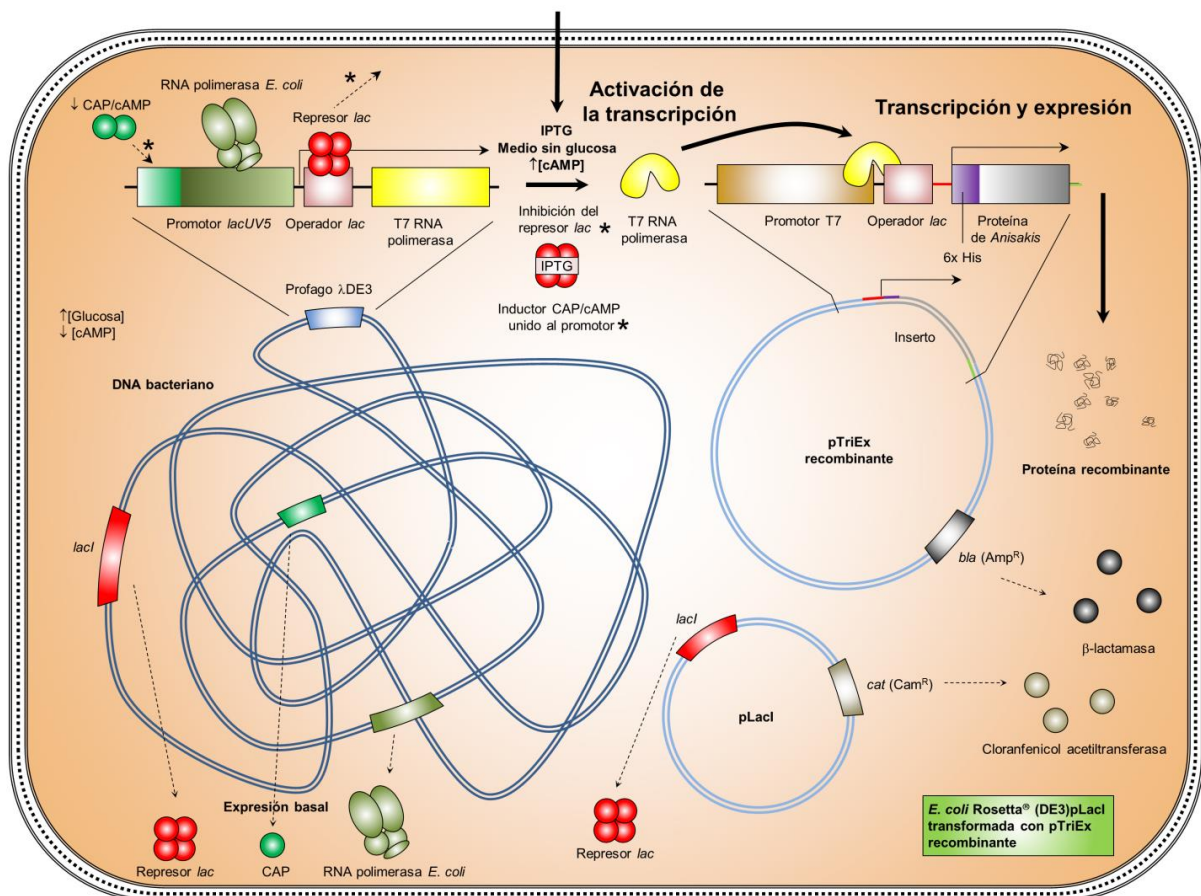


Figura 7. Regulación de la expresión de las proteínas recombinantes miofilina y arginina quinasa de *Anisakis*. CAP: *Catabolite activator protein*; IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido; Amp^R: resistencia a ampicilina; Cam^R: resistencia a cloranfenicol.

Al día siguiente, tras incubar la placa toda la noche a 37°C, se tomaron cinco colonias y se introdujeron en cinco tubos con 4 ml del mismo medio LB de la placa pero líquido (ampicilina 100 mg/l, cloranfenicol 34 mg/l y glucosa al 0,5%). Se cultivaron en agitación a 37°C hasta que se empezó a observar turbidez. En ese momento se midió la absorbancia a 600 nm y cuando se alcanzó una absorbancia de 0,5 significó que el cultivo estaba creciendo en fase exponencial. Se cogieron 200 µl de cada cultivo y se añadieron en cinco tubos de 50 ml con 20 ml de medio LB con ampicilina 50 mg/l y cloranfenicol 34 mg/l sin glucosa junto con las proporciones adecuadas de las tres soluciones del kit Overnight Express® Autoinduction System 1 (Novagen). Este kit ha sido diseñado para obtener el máximo rendimiento de expresión de la proteína sin necesidad de monitorizar el crecimiento bacteriano. El resto del cultivo en fase exponencial se guardó con glicerol al 80% en alícuotas a -80°C para su futura expresión a gran escala.

Tras una incubación de los tubos de 50 ml a 37°C en agitación toda la noche, se centrifugaron a 5100 g durante 10 minutos y se pesaron los precipitados bacterianos. Se añadieron 5 ml de tampón de lavado desnaturizante (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300mM, Urea 8M, imidazol 10 mM, pH 7,4) por cada gramo de precipitado y se congelaron los tubos a -80°C. Tras descongelarlos en agua templada se repitió la congelación/descongelación para romper todas las bacterias y disolver nuestra proteína precipitada en forma de cuerpos de inclusión centrifugándose a 6700 g durante 40 minutos. Los sobrenadantes que contenían la miofilina de *Anisakis* se introdujeron en columnas de cobalto inmovilizado HisPur® de 0,2 ml o de 3 ml (Pierce Biotechnology) para su purificación mediante cromatografía de afinidad siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando el tampón de lavado desnaturizante mencionado anteriormente, el tampón de elución desnaturizante (es igual que el de lavado pero con imidazol 150 mM) y finalmente una solución de ácido 2-morfolina-etanosulfónico 20 mM con NaCl 0,1 M a pH 5. A continuación se realizó una diálisis renaturalizante y se calculó la concentración proteína por el método de Bradford.

e) Arginina quinasa recombinante de *Anisakis simplex*

Se obtuvo de forma similar a la miofilina con algunos cambios. Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia la arginina quinasa de *T. canis* (GenBank: [AFJ95132.1](#)) en una búsqueda por similitud de secuencia en el transcriptoma de *Anisakis* de la base de datos del Instituto Sanger. Se pudieron encontrar las secuencias completas de los extremos 5' y 3' para el diseño de los cebadores. Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 9.

Cebador directo 5'-ATGGCTT*TICTCAAAAATCAAAAAGCAGTA

Cebador inverso 5'-CT*TTTCCTGTTCITCCAGTCGAAT*TAAT*TC-3'

Tabla 9. Condiciones para la amplificación de la arginina quinasa de *Anisakis* mediante PCR.

PCR	Volumen (µl)	Paso	Temp. (°C)	Tiempo
H ₂ O	6,8	1. Activación KOD	95	2 min
KOD master mix	10	2. Desnaturalización	95	30 s
Cebador directo (10µM)	0,6	3. Anillamiento	61	30 s
Cebador inverso (10µM)	0,6	4. Elongación	70	2 min
cDNA <i>Anisakis</i> 1:50	2	Repetición pasos 2, 3, 4	-	34 veces
Total:	20	5. Elongación final	70	7 min
		6. Conservación	4	∞

El calentador de la tapa del termociclador se programó a 105°C. Agua ultrapura obtenida con sistemas MilliQ® con filtro anti polisacáridos bacterianos y libre de RNasas [< 1 (pg/ml)] y DNasas [< 5 (pg/ml)]. KOD Hot Start Master Mix cat nr. 71842-3 (Novagen-Millipore, Alemania).

Tras comprobar que la secuencia amplificada era la adecuada mediante secuenciación, se procedió a amplificarla pero utilizando cebadores pensados para realizar el método In-Fusion® (Zhu *et al.*, 2007) en los que se incluyen ≥ 15 nucleótidos solapantes (subrayados) con los extremos del plásmido linealizado escogido de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Clontech). También se incluyó en el cebador directo la secuencia codificante para seis histidinas (negrita). Las condiciones de esta PCR se muestran en la Tabla 10.

Cebador directo 5'-CAAAGGAGATATACCATGAAGCATCATCATCATCATCAGATGGC-TTTTCTCAAAAATCAAAAAGCAGTA-3'

Cebador inverso 5'-GCTTTGTTAGCAGCCCTTTTCCTGTTCTTCCAGTCGAATTAATTC-3'

Tabla 10. Condiciones para la amplificación de la arginina quinasa de *Anisakis* mediante PCR con cebadores diseñados para su inserción en el plásmido pTriEx®-6 3C/LIC mediante el método In-Fusion®.

PCR	Volumen (µl)	Paso	Temp. (°C)	Tiempo
H ₂ O	6,8	1. Activación KOD	95	2 min
KOD master mix	10	2. Desnaturalización	95	30 s
Cebador directo (10µM)	0,6	3. Anillamiento	61	30 s
Cebador inverso (10µM)	0,6	4. Elongación	70	2 min
DNA Arg quinasa (5 ng/µl)	2	Repetición pasos 2, 3, 4	-	40 veces
Total:	20	5. Elongación final	70	7 min
		6. Conservación	4	∞

El calentador de la tapa del termociclador se programó a 105°C. Agua ultrapura obtenida con sistemas MilliQ® con filtro anti polisacáridos bacterianos y libre de RNasas [< 1 (pg/ml)] y DNasas [< 5 (pg/ml)]. KOD Hot Start Master Mix cat nr. 71842-3 (Novagen-Millipore, Alemania).

3.1.6. Inmunización de ratones BALB/c

Ocho ratones BALB/c hembra (Charles River Laboratories, Barcelona, España) fueron manipulados de acuerdo con el RD 53/2013 en el que se traspuso la directiva 2010/63/EU. La inmunización se realizó por vía intraperitoneal (i.p.) empleando 30 µg de proteína recombinante (200 µl) o PBS (control negativo – un ratón) (Fu *et al.*, 2012) mezclado con ACF (Adyuvante Completo de Freund, Sigma-Aldrich) el día 0 y el 21. El suero se obtuvo (procedimiento – ver siguiente apartado) exactamente los

días 21, 30, 39, 46, 53 y 64 tras la inmunización. Las proteínas purificadas recombinantes de *Anisakis* que se utilizaron para la inmunización fueron la hemoglobina (tres ratones), la miofilina (dos ratones) y la tropomiosina (dos ratones).

También se utilizaron sueros de un estudio anterior (Perteguer *et al.*, 2003a). El suero (AniM) de los ratones inmunizados con el extracto total de *Anisakis*, fue obtenido de ratones BALB/c que fueron inoculados por vía intramuscular (i.m.) con 1 mg del extracto total de *A. simplex* mezclado con ACF.

3.1.7. Sueros humanos

Todos los sueros humanos que se han utilizado para la realización de esta tesis han sido obtenidos prospectivamente con la aprobación de los pacientes y donantes sanos mediante la firma de un consentimiento informado y con la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario de La Princesa (Madrid, España) y del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (Galicia, España).

El procedimiento para la obtención del suero consistió en dejar los tubos de sangre sin anticoagulante a temperatura ambiente durante 1 h para la formación del coágulo y posteriormente centrifugarlos a 200 g recogiendo el sobrenadante (suero) y descartando el coágulo. Todos los sueros se mantuvieron congelados a -80°C hasta su uso.

Para la realización de los estudios relacionados directamente con *Anisakis* se emplearon sueros de un total de 130 pacientes, de los cuales, 63 estaban diagnosticados de sensibilización a *A. simplex* (Tabla 11).

Del grupo de los positivos a *Anisakis*, 21 fueron diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA) y 42 de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+). La AGA se diagnosticó por el Dr. Alvaro Daschner (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España) en los pacientes que acudieron a la consulta de alergia del Hospital Universitario de La Princesa con una historia típica (urticaria aguda/angioedema o anafilaxia de duración inferior a 48 h dentro de las 48 h de la ingesta de pescado crudo o poco cocinado) – estando acompañada por pruebas cutáneas positivas (*Skin Prick Test* – SPT) e IgE específica frente a *Anisakis* determinada mediante ImmunoCAP®. El SPT se realizó con extracto de *A. simplex* (Lab. ALK-Abelló, Madrid, España) siguiendo los protocolos estandarizados y se consideró positivo con un diámetro medio de habón ≥ 3 mm. Como control positivo y negativo se utilizó histamina al 1% y solución salina al 0,9% de NaCl, respectivamente. Dentro de los pacientes UC+ se incluyeron aquellos que presentaban habones recurrentes al menos dos veces por semana durante al menos seis semanas y presentaban SPT positivo, así como IgE específica frente a *Anisakis* $>0,35$ kU/l. Los pacientes fueron excluidos de este estudio si la reacción urticarial que presentaban se suscitó fundamentalmente por estímulos físicos y si estaban en tratamiento con corticoides u otros fármacos inmunomoduladores. Sin embargo, cabe mencionar que algunos de estos pacientes tomaban hasta cuatro dosis diarias de antihistamínicos de segunda generación como por ejemplo: cetirizina, levocetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, rupatadina, bilastina o ebastina; recomendados, según los protocolos más modernos, como primera línea de tratamiento de la urticaria (Zuberbier *et al.*, 2014).

El grupo de los individuos no sensibilizados a *Anisakis* se subdividió clínicamente en 42 pacientes con urticaria crónica sin SPT ni IgE específica frente a *Anisakis* (UC-) y en 25 controles que no presentaban urticaria en ese momento ni síntomas asociados a la parasitación por *Anisakis* (C).

Tabla 11. Características clínicas de los sujetos cuyos sueros han sido utilizados para la realización de los experimentos relacionados directamente con *Anisakis*.

Número	Edad	Sexo	Patología	Número	Edad	Sexo	Patología	Número	Edad	Sexo	Patología
1	19	H	UC-	62	40	H	AGA	214	65	M	UC+
2	65	H	AGA	63	37	M	UC-	215	26	M	UC+
3	38	H	AGA	64	64	M	AGA	216	76	H	UC+
5	68	H	AGA	65	60	M	AGA	217	57	M	UC+
7	31	H	UC-	66	60	M	UC+	218	57	M	UC+
9	28	M	UC+	68	29	M	UC-	219	47	M	UC+
10	18	M	UC-	69	51	H	AGA	220	74	M	UC+
12	29	H	UC-	70	70	H	UC+	221	52	H	UC+
13	74	M	UC+	71	75	M	AGA	222	42	M	UC-
14	53	M	UC-	72	21	M	UC-	223	63	M	UC-
15	52	H	UC+	73	37	M	UC-	224	19	H	UC-
16	42	M	UC-	74	39	M	UC+	225	63	M	UC+
17	29	H	UC-	75	27	H	UC-	226	51	M	UC+
19	63	M	UC-	76	54	H	UC+	227	44	M	UC+
20	19	H	UC-	77	58	M	AGA	228	43	M	UC+
21	63	M	UC+	78	52	H	AGA	229	43	M	UC-
22	29	M	UC+	79	52	H	AGA	301	29	M	C
23	51	M	UC+	80	43	M	AGA	302	42	M	C
24	60	H	AGA	82	36	M	UC-	303	39	M	C
25	33	H	UC-	83	43	M	UC+	304	42	H	C
27	65	M	UC+	84	53	M	UC+	306	42	H	C
28	44	M	UC+	87	53	H	UC-	307	44	H	C
29	70	M	UC+	88	67	M	UC+	308	50	M	C
30	43	M	UC+	91	70	M	UC+	309	61	M	C
31	25	M	UC-	92	54	H	AGA	310	44	H	C
32	36	M	AGA	93	32	M	AGA	311	50	M	C
33	51	M	UC+	95	50	M	UC-	312	57	H	C
35	35	H	AGA	97	60	M	UC-	313	32	M	C
36	30	M	UC+	98	46	M	UC+	315	45	M	C
38	25	M	UC+	99	36	H	AGA	316	45	H	C
40	65	M	UC+	186	34	M	UC-	317	35	M	C
41	43	M	UC-	201	61	M	UC-	318	32	H	C
43	40	M	UC+	202	36	M	UC-	319	48	M	AGA
44	42	H	AGA	203	66	M	UC-	320	31	M	C
45	43	M	UC-	204	21	M	UC-	321	35	H	C
46	65	M	UC+	205	66	M	UC-	322	35	H	C
47	65	H	UC-	206	60	M	UC-	323	23	M	C
48	26	H	UC-	207	46	M	UC+	324	23	M	C
51	34	H	UC-	208	47	M	UC+	325	23	M	C
53	66	H	UC+	209	49	M	UC+	326	32	H	C
55	49	M	UC-	210	67	H	UC+	327	23	H	C
56	28	H	UC-	211	63	M	UC-	329	23	M	C
58	66	M	UC-	212	58	M	UC-				
60	46	H	AGA	213	42	M	UC-				

H: Hombre, M: Mujer, AGA: Anisakiosis gastroalérgica, UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*, UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*, C: Control.

A todos los pacientes con urticaria crónica se les preguntó si habían presentado al menos dos episodios de urticaria importantes en las 6 h después de la ingesta de pescado con el fin de asignar la exacerbación de la urticaria asociada a la ingesta de pescado (*Fish Intake Associated Exacerbation* – FIAE). También se determinó la actividad urticarial (*Urticaria Activity Score* – UAS) (Mlynek *et al.*, 2008). La medida del UAS consistió en retirar durante cinco días la medicación antihistamínica a estos pacientes y en los cuatro últimos días se calculó la media de la puntuación diaria obtenida según el número de habones (entre 1-9 habones: 1 punto; 10-50 habones: 2 puntos; y >50 habones 3 puntos), y la intensidad del prurito (suave: 1 punto; moderado: 2 puntos; o severo: 3 puntos) preguntándoles además el número de dosis semanales de antihistamínicos necesarias para aliviar los síntomas.

A todos los pacientes se les preguntó el número de porciones de pescado ingerido por semana y si era fresco/ultracongelado, azul/blanco o en lata siguiendo un cuestionario estandarizado descrito previamente (Daschner *et al.*, 2013) (Tabla 12).

Tabla 12. Cuestionario estandarizado sobre hábitos de ingesta de pescado.

Preguntas	Observaciones
1. ¿Cuáles son los nombres de los pescados que usted consume habitualmente?	Esta es una pregunta necesaria para controlar la diferenciación entre pescados azules y blancos.
2. ¿Cuántas veces por semana consume pescado blanco?	Con estos datos calculamos la ingesta total de pescado: 2+3.
3. ¿Cuántas veces por semana consume pescado azul?	
4. Cuántas veces por semana consume pescado enlatado	
5. ¿Cuántas veces al mes o al año consume boquerones en vinagre?	

Tabla obtenida parcialmente de Daschner *et al.*, (2013).

Por otro lado, para la realización de un estudio de reactividad cruzada de *Anisakis* con posibles alérgenos comunes presentes en gambas, reclutamos a 12 nuevos pacientes sensibilizados con una IgE específica frente a crustáceos >0,35 kU/l medida mediante ImmunoCAP® (el antígeno incluye una mezcla de los crustáceos hervidos: *Pandalus borealis*, *Penaeus monodon*, *Metapenaeopsis barbata* y *Metapenaeus joyneri*) (Tabla 13).

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes alérgicos a crustáceos.

Suero	Edad	Sexo	Pruebas cutáneas	Síntomas tras la ingesta de crustáceos	IgE (kU/l) crustáceos	IgE (kU/l) <i>Anisakis</i>
G1	26	Hombre	Ácaros	SAO	13,50	2,50
G2	19	Hombre	Ácaros, cucaracha y alimentos ^a	SAO y asma	160**	7,02
G3	33	Mujer	Polen y caspa animal	Urticaria	0,80	2,80
G4	32	Mujer	Ácaros y polen	SAO y asma	70,00	14,70
G5	28	Mujer	Ácaros	SAO	1,10	0,00
G6	46	Hombre	Ácaros y polen	Urticaria crónica*	2,10	0,70
G7	33	Mujer	Ácaros, polen y caspa animal	Urticaria	1,20	0,00
G8	58	Mujer	Ácaros	Urticaria	1,60	0,80
G9	72	Mujer	Ácaros	Anafilaxia y urticaria crónica	22,20	6,20
G10	24	Mujer	Ácaros, polen y caspa animal	SAO y urticaria crónica	0,40	0,00
G11	18	Mujer	Ácaros	SAO	0,70	0,00
G12	58	Mujer	Ácaros	Urticaria	1,60	1,00

SAO: Síndrome de alergia oral. ^a Alimentos: rape, pulpo y langostino blanco. * Tolera la ingesta de gambas. ** Unidades ISU-E frente a nPen m 1 del crustáceo *Penaeus monodon* medido mediante ImmunoCAP® ISAC.

Del mismo modo, se incluyeron de forma consecutiva durante tres años (2012-2015) 19 pacientes para el estudio del origen de las reacciones adversas que presentaban tras la ingesta de pescado. Estos pacientes fueron seleccionados por presentar una historia clínica de al menos dos reacciones adversas tras la ingesta de pescado. Los pacientes que afirmaban presentar recurrentemente síntomas alérgicos tras el consumo de pescado y que ya presentaban síntomas alérgicos concomitantes frente al marisco también fueron incluidos. También se incluyeron los pacientes que presentaban síntomas gastrointestinales recurrentes en varias ocasiones tras la ingesta de, al menos, dos especies distintas de peces (Tabla 14).

Con la excepción del estudio de la tropomiosina alergénica de la tilapia mozambiqueña (Liu *et al.*, 2013), las pruebas cutáneas con extractos de pescado no han dado lugar a la sospecha de que la tropomiosina sea un alergeno de pescados. Por lo tanto, solo se incluyeron pacientes con pruebas cutáneas negativas frente a extractos comerciales de pescado, lo que sugiere que el hecho de que no se haya sospechado de la tropomiosina como un alergeno relevante del pescado, también se debe a que las pruebas cutáneas no son lo suficientemente sensibles para detectar anticuerpos IgE frente a ella.

En nuestra región la sensibilización a *Anisakis* es frecuente, por lo que si los pacientes estaban sensibilizados frente a *Anisakis*, se excluyó la posibilidad de que los síntomas tras la ingesta de pescado se debieran a un parasitismo agudo (anisakiosis gástrica o gastroalérgica) mediante una cuidadosa revisión de la historia clínica, así como mediante la medición de los niveles IgE, tal y como se propuso anteriormente (Daschner *et al.*, 1999). Además, aunque se ha demostrado que la tropomiosina es un alergeno potencial de *Anisakis*, es solo un alergeno minoritario que representa según Asturias *et al.*, (2000) solo el 0-13% de la tasa de reconocimiento en pacientes sensibilizados (Asturias *et al.*, 2000a). Por lo tanto, la sensibilización frente a *Anisakis* debida a un episodio anterior de anisakiosis gastroalérgica no fue un criterio de exclusión, si los nuevos efectos adversos tras el consumo de pescado, en ningún caso crudo, no se debieron a nuevos episodios de parasitación. Además, la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis* también es frecuente, por lo que los pacientes con esta patología fueron incluidos si cumplían los criterios especificados anteriormente y si la urticaria que estaban sufriendo fue exacerbada por el consumo de pescado pero no por el parasitismo de *Anisakis*, ya que consumían únicamente pescado congelado o bien cocinado.

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes con efectos adversos tras la ingesta de pescado.

Suero	Sexo	Edad	Síntomas por marisco	IgE crustáceos >0,35 kU/l	Síntomas por pescado	UC	<i>Anisakis</i>	
							Sensibilización	AGA
1	Mujer	40	URT		URT		X	X
2	Hombre	67	PRU		PRU		X	
3	Mujer	44	URT		URT		X	X
4	Hombre	23	URT		URT		X	
5	Mujer	33	URT+GI	X	URT+GI+SAO			
6	Mujer	30	URT+AB	X	URT		X	
7	Mujer	60	URT		URT		X	
8	Mujer	46	URT	X	URT	X _f	X	
9	Mujer	47	URT		URT	X	X	
10	Mujer	49	URT	X	URT	X	X	X
11	Mujer	73	URT	X	URT		X	
12	Mujer	22	URT		URT	X _f	X	X
13	Mujer	45	URT		PRU	X		
14	Mujer	62	URT		GI			
15	Hombre	48			GI		X	
16	Mujer	58			PRU+GI	X		
17	Mujer	46		X	URT+GI			
18	Mujer	36			GI			
19	Mujer	65			GI	X	X	

UC: urticaria crónica; AGA: anisakiosis gastroalérgica; URT: urticaria; PRU: prurito; GI: molestias gastrointestinales; SAO: síndrome de alergia oral; AB: Asma bronquial; subíndice “P” indica urticaria al frío. La alergia al marisco se confirmó mediante pruebas cutáneas o IgE específica medida mediante ImmunoCAP® frente a camarones y langostinos (*Pandalus borealis*, *Penaeus monodon*, *Metapenaeopsis barbata* y *Metapenaeus joyneri*), cangrejo de río (*Astacus astacus*) o almeja (*Ruditapes* spp.).

3.1.8. Determinación de inmunoglobulinas mediante ImmunoCAP®

El sistema ImmunoCAP® es una técnica de rutina realizada en los laboratorios de análisis clínicos hospitalarios que consiste en la medición automatizada de la concentración de IgE total, IgE, IgA, IgG e IgG4 específicas u otras proteínas séricas del paciente mediante la lectura espectrofluorimétrica de un fluoroenzimoimmunoensayo sándwich realizado sobre unas cápsulas de un polímero derivado de celulosa. Los resultados cuantitativos son precisos en el rango de 0,1 a 100 kU/l y se pueden expresar en clases: CAP de clase 0 si la concentración de IgE específica es <0,35 kU/l, clase 1 (0,35–0,69 kU/l), clase 2 (0,70–3,49 kU/l), clase 3 (3,50–17,49 kU/l), clase 4 (17,50–49,99 kU/l), clase 5 (50–100 kU/l) y clase 6 (>100 kU/l).

Por otro lado existe una variante que se denomina ImmunoCAP® ISAC (Phadia AB). Esta variante, es un biochip en el que se pueden probar hasta 112 alérgenos de 51 organismos de forma miniaturizada empleando únicamente 30 µl de suero del paciente. Los valores se pueden ofrecer en kU/l o en ISU-E (Unidades estandarizadas ISAC: Niveles >15 ISU-E son considerados extremadamente elevados; 1-14,9 elevados; 0,3-0,9 bajos y <0.3 indetectables).

En los pacientes utilizados para el estudio, la IgE total fue analizada mediante ImmunoCAP® (Phadia AB). La IgE específica anti-*Anisakis*/*Ascaris* y la IgG4 anti-*Anisakis* fue igualmente analizada mediante ImmunoCAP® (Phadia AB) frente a los extractos antigénicos de ambos parásitos.

3.1.9. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y proliferación *in vitro*

La sangre se obtuvo de los pacientes después de que se les retiraran los antihistamínicos durante cinco días. El suero se almacenó a -80°C hasta su uso y la sangre fresca se procesó inmediatamente para realizar los estudios de proliferación. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), linfocitos y monocitos, se separaron por centrifugación (400 g, durante 20 min, a 20°C y con rotor oscilante) en gradiente de densidad empleando Histopaque-1077[®] (Sigma-Aldrich), que es una mezcla comercial de Ficoll 400 y diatrizoato de sodio. Se recogieron las PBMCs con una pipeta de la capa intermedia entre el plasma (superior) y los granulocitos y eritrocitos (inferior) y tras un lavado mediante centrifugación (100 g, 5 min) en medio RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD) sin suero, se contaron y se valoró su viabilidad mediante la exclusión del colorante azul tripán. Las células se sembraron en pocillos por triplicado a una concentración de $1,25 \cdot 10^6$ células/ml en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Fetal Bovine Serum 10270-106, Invitrogen) inactivado por calor, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM y gentamicina 0,06 g/l. Las células se cultivaron y fueron estimuladas con: 1) el mitógeno Concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2) el extracto proteico de L3 de *A. simplex* a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 3) con medio de cultivo solo como control. Las células se incubaron durante 72 h a 37°C en una incubadora humidificada en presencia de CO_2 al 5%. Los sobrenadantes de los cultivos se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. La proliferación tras la estimulación con ConA o *Anisakis* se determinó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] por las células que respiran. Tras retirar el medio por centrifugación se añadieron 20 μl de MTT (2,5 mg/ml en PBS, pH 7,2) (Sigma-Aldrich) a todos los pocillos y la placa se incubó a 37°C en una incubadora humidificada en presencia de CO_2 al 5%. Después de 6 h, se añadieron 100 μl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% en HCl 0,001 N a todos los pocillos para romper las membranas celulares y disolver los cristales de formazán. La densidad óptica (D.O.) se midió después de 24 horas a 595 nm en un lector de microplacas (ELx808 (Biotek, Winooski, VT). El porcentaje de la proliferación (%P) se calculó a partir de la fórmula:

$$\%P = \frac{\text{D. O. pocillo con células estimuladas} \cdot 100}{\text{D. O. pocillo con células no estimuladas}} - 100$$

3.1.10. Medida de la producción de citoquinas

Empleando los sueros humanos y los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica de los mismos individuos se midieron los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A empleando el kit BD[®] Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, CA). Por otro lado, los niveles de TGF- β se midieron empleando un kit individual BD[®] Cytometric Bead Array (CBA) Human TGF- β 1 Single Plex Flex Set (BD Biosciences).

Estos métodos de cuantificación mediante microesferas para citometría de flujo (CBA), se basan en la presencia de un anticuerpo, específico para cada citoquina, conjugado a unas microesferas para la determinación de cada citoquina. Cada grupo de microesferas marcado con un anticuerpo específico,

presenta diferentes intensidades de fluorescencia (isotiocianato de fluoresceína – FITC). Una vez incubadas con el suero o los sobrenadantes, para la cuantificación de las citoquinas, se añade a la mezcla un conjunto de anticuerpos específicos para cada citoquina que, en este caso, van conjugados con ficoeritrina (PE) uniéndose del mismo modo que en un ELISA sándwich. Además el kit ofrece unos estándares con citoquinas recombinantes valoradas, para realizar rectas patrón y así poder cuantificar cada citoquina en la muestra problema. Todas las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences – CAI Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM, Madrid, España) y los resultados se expresaron en pg/ml empleando el programa FCAP Array® (BD Biosciences).

3.1.11. Determinación de diamino-oxidasa (DAO) sérica

Los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en muestras humanas se midieron empleando el kit IDK® DAO ELISA (Immundiagnostik AG, Bensheim, Alemania). Cada placa de 96 pocillos tapizada con un anticuerpo policlonal de conejo anti-DAO humana, se incubó con los sueros de los pacientes y los siete controles estándar para la elaboración de la recta patrón, junto con dos muestras valoradas que también contenía el kit. A continuación, las placas se incubaron con un anticuerpo policlonal biotilado anti-DAO y en el siguiente paso se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa. El revelado se realizó con una solución de tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de la peroxidasa que se desnaturalizó con la solución ácida de frenado. Las placas se leyeron a 450 nm y se realizó una recta patrón con los valores de D.O. obtenidos de los controles y los estándares de concentración conocida proporcionados por la casa comercial para poder calcular la concentración de DAO sérica de los pacientes.

3.1.12. Purificación de la hemoglobina nativa de *Anisakis*

La preparación de la hemoglobina a partir del extracto proteico de las L3 de *Anisakis*, se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada para purificar hemoglobina a partir de adultos de *Ascaris suum* (Darawshe *et al.*, 1987) con algunas modificaciones. Aproximadamente 200 L3 de *Anisakis* fueron recogidas manualmente de vísceras de bacaladillas parasitadas (*Micromesistius poutassou*). Tras un lavado en profundidad de 12 h empleando agua bidestilada, las L3 se secaron y se almacenaron a -20°C hasta el día de su homogeneización manual en mortero con PBS a 4°C. A continuación, se centrifugó el extracto a 6.700 g durante 15 min para eliminar los restos celulares y se recogió el sobrenadante resultante para ser filtrado a través de filtros de 0,22 µm. Esta solución de extracto de *Anisakis* estéril se centrifugó a 175.000 g durante 6 h y se descartó el sobrenadante (S1). El tubo de ultracentrífuga, con el precipitado sin resuspender, se guardó en posición vertical durante 12 h a 4°C en contacto con agua fría destilada apirógena. El contenido del tubo, fue centrifugado a 63.000 g durante 30 minutos para separar la solución roja de hemoglobina (sobrenadante) del material insoluble blanco (precipitado). Tras la centrifugación, recogimos la solución de hemoglobina (sobrenadante) y la volvimos a centrifugar a 175.000 g durante 6 h descartando el sobrenadante (S2). El precipitado rojo se disolvió en tampón de carga (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5).

Esta solución se cargó en columnas Poly-Prep® (Bio-Rad, Hercules, CA) con DEAE-Sephacel® (GE Healthcare) equilibradas con tampón de carga. La elución, se realizó por etapas en fracciones de 2 ml empleando concentraciones crecientes de sal en el tampón: 50, 100, 150, 200, 250, 500 mM y 2 M de

NaCl con Tris 25 mM a pH 7,5. Las fracciones eluidas que contenían la hemoglobina, de acuerdo con la absorbancia del grupo hemo medida a 415 nm, se centrifugaron por última vez a 175.000 g durante 6 h para obtener una solución con mayor concentración de hemoglobina. El contenido de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Múnich, Alemania). La hemoglobina nativa purificada se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.1.13. Caracterización estructural de la hemoglobina de *Anisakis*

3.1.13.1. Análisis mediante ultracentrifugación analítica

Las celdas de ultracentrifugación analítica se cargaron con 400 µl de la muestra de hemoglobina purificada de *Anisakis* a concentraciones desde 0,25 hasta 1,0 mg/ml, en Tris 25 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5. Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C y 48.000 rpm en una ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman-Coulter, Brea, CA) equipada con un sistema de detección de absorbancia ultravioleta-visible, usando un rotor An-50Ti y piezas centrales estándar de doble sector de epon-carbón, con un paso óptico de 12 mm. Los perfiles de sedimentación se registraron a 280 nm y 415 nm. El análisis de los perfiles de sedimentación, obtenidos a intervalos de tiempo regulares, se realizó mediante el ajuste directo de soluciones numéricas a la ecuación de Lamm por mínimos cuadrados a dichos perfiles de sedimentación mediante el programa SEDFIT (Schuck, 2000). El mejor ajuste obtenido de los perfiles de sedimentación experimentales a las soluciones de la ecuación de Lamm proporciona una distribución $c(s)$ que representa la concentración de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación S .

El valor de coeficiente de sedimentación se corrigió a las condiciones estándar de agua y 20°C con el programa SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992), obteniéndose los valores correspondientes de $S_{20,w}$ (van Holde, 1985).

3.1.13.2. Microscopía electrónica y procesamiento de imagen

La hemoglobina nativa a una concentración de 100 nM, se adsorbió sobre una rejilla de 400 mesh cubierta de una película de carbón. Las moléculas fueron teñidas negativamente utilizando acetato de uranilo al 2% y observadas usando un microscopio electrónico JEOL-1230 operado a 100 kV. Las imágenes de moléculas individuales se capturaron de forma automática usando una cámara TVIPS F416 CMOS con un aumento nominal de $\times 40.000$. Éstas se seleccionaron y se extrajeron automáticamente de las micrografías resultando un total de 18.531 imágenes a 5,68 Å por píxel. A continuación se clasificaron y promediaron utilizando métodos implementados en los programas EMAN2 (Tang *et al.*, 2007) y XMIPP (De la Rosa-Trevín *et al.*, 2013). La clasificación de las imágenes permitió, en primer lugar, eliminar imágenes contaminantes o agregados seleccionados de forma errónea y, en segundo lugar, agrupar aquellas imágenes similares para poder ser promediadas y aumentar así su relación señal-ruido. La clasificación y los promediados de las imágenes fueron realizados utilizando el algoritmo CL2D (Sorzano *et al.*, 2010).

3.1.14. ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

3.1.14.1. ELISA indirecto

El ELISA indirecto se empleó para la determinación de inmunoglobulinas en suero. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) con 100 μ l/pocillo de antígeno a una concentración de 10 μ g/ml en tampón bicarbonato/carbonato 0,1M (pH 9,6). En el caso de las proteínas recombinantes la concentración fue de 5 μ g/ml. Tras la sensibilización de los pocillos durante una noche a 4°C, se realizaron tres lavados con Tween 20 al 0,05% en PBS (PBS-Tween) y se realizó el postapizado con 200 μ l/pocillo de BSA al 0,1% durante 1 h a 37°C. Tras realizar de nuevo tres lavados con PBS-Tween se añadieron por duplicado 100 μ l/pocillo de los sueros humanos o murinos diluidos 1:100 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PTB). Para la determinación de IgE, los sueros humanos se diluyeron 1:2 debido a su baja concentración sérica. A continuación, se incubaron durante 2 h a 37°C o una noche a 4°C. Luego se realizó el paso de lavado y se añadieron 100 μ l/pocillo del anticuerpo correspondiente:

-Para la determinación de IgG: anti-IgG humana obtenida en cabra conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Biosource, Camarillo, CA) diluida 1:8000 en PTB. Incubación durante 1 h a 37°C.

-Para la determinación de IgA: anti-IgA humana obtenida en cabra HRP (Biosource) diluida 1:3000 en PTB. Incubación durante 1 h a 37°C.

-Para el marcaje de la IgG1 de ratón: anti-IgG1 de ratón obtenida en cabra HRP (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) diluida 1:1000 en PTB. Incubación durante 1 h a 37°C.

-Para la determinación de IgG4: anti-IgG4 humana HRP de ratón (Clon HP6025) (SouthernBiotech, Birmingham, AL) diluida 1:1000 en PTB. Incubación durante 1 h a 37°C.

-Para la determinación de IgE: anti-IgE humana (IgG1 κ , E21A11) de ratón (INGENASA, Madrid, España) diluida 1:1000 en PTB. Se incubó durante 2 h a 37°C y tras el paso de lavado, se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpos de cabra anti-IgG1 de ratón HRP (Molecular Probes) diluidos 1:1000 en PTB incubándose durante 1 h a 37°C.

Los anticuerpos marcados con HRP se detectaron mediante la incubación con o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) al 0,04% disuelta en tampón citrato-fosfato (Citrato monosódico 0,1 M, Fosfato disódico dodecahidratado 0,1 M, pH 5) con peróxido de hidrógeno al 0,04%. La reacción, tras 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se frenó con 50 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 3N. Las D.O. a 490 nm se calcularon restando a los valores de D.O. de cada suero la D.O. resultante de la fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Todas las determinaciones para cada suero se realizaron por duplicado (Figura 8).

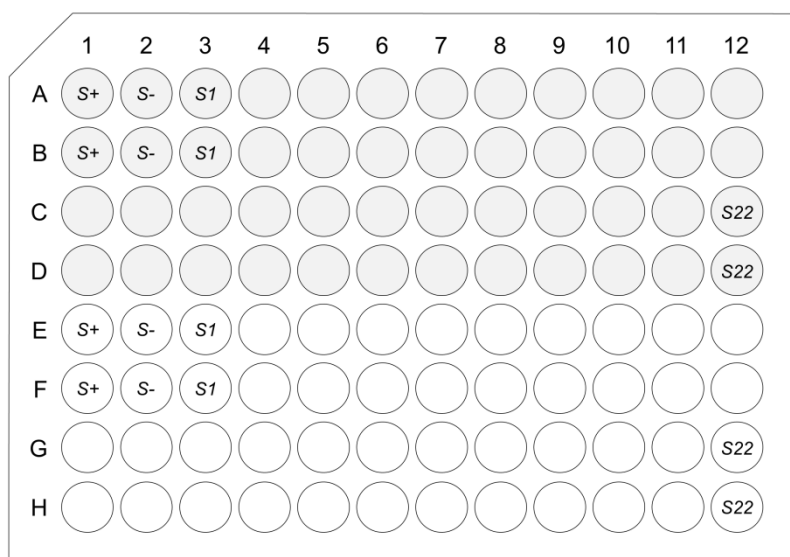


Figura 8. Esquema de una placa para ELISA indirecto. En gris se indican los pocillos tapizados con el antígeno y en blanco sin tapizar, solo con la BSA utilizada en el postapizado. S+: Suero control positivo. S-: Suero control negativo. Se analizaron 22 sueros/placa (S1-S22), añadiéndose por duplicado para hacer la media de la D.O. a 490 nm de los pocillos con antígeno y restar la media de la D.O. a 490 nm de los pocillos sin antígeno para cada suero.

Finalmente, cabe destacar que para la determinación de los niveles de IgE humana frente a Anisakis 1 y t-Anisakis 7 empleando las placas comerciales Trisakis 170[®] proporcionadas por el Prof. Dr. Florencio Martínez Ubeira (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España), se procedió de la misma manera descrita anteriormente pero empezando directamente por la incubación de los sueros diluidos 1:2 con PTB.

3.1.14.2. ELISA captura

El ELISA captura se empleó para la determinación de inmunoglobulinas específicas en suero frente a un antígeno capturado por un anticuerpo monoclonal previamente fijado a la placa. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar) con 100 μ l/pocillo que contenían 1,5 μ g de anticuerpo monoclonal empleando como diluyente PTB y se incubaron toda la noche a 4°C. Tras el paso de lavado, todos los pocillos se incubaron con 200 μ l de BSA al 0,1% en PBS durante 1 h a 37°C. Después, las placas se lavaron y se incubaron toda la noche a 4°C conteniendo cada pocillo, marcado en gris en la Figura 9, 500 μ g de proteína total del extracto proteico del organismo de estudio empleando como diluyente PTB hasta 100 μ l y en caso de que la concentración de extracto fuera menor de 5 μ g/ μ l (mínimo 2,5 μ g/ μ l) para alcanzar la cantidad necesaria de proteína total nunca se rebasaron los 200 μ l/pocillo. De ese extracto antigénico total, fue capturado un antígeno específico por el anticuerpo monoclonal que se encontraba fijado a la placa. Los pocillos marcados en blanco en el esquema de la Figura 9 fueron incubados con 100 μ l/pocillo de PTB pero sin los extractos, como control de corrección de absorbancia (Figura 9).

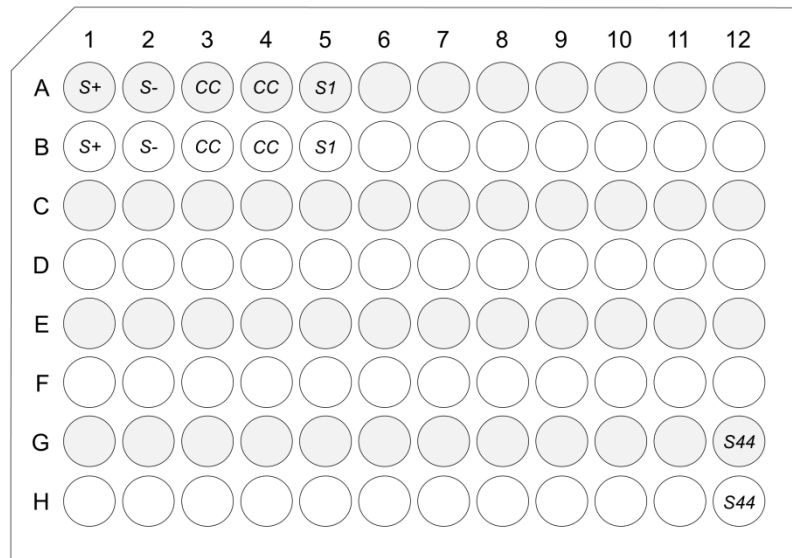


Figura 9. Esquema de una placa para ELISA captura. Todos los pocillos están tapizados con anticuerpo monoclonal. En gris se indican los pocillos que contienen el antígeno capturado. S+: Suero control positivo. S-: Suero control negativo. CC: Pocillos control de conjugado con y sin antígeno, por duplicado, en los que no se añadió suero. Las placas se realizaron por duplicado para calcular las medias de las D.O. a 490 nm de los pocillos con antígeno y restar la media de la D.O. a 490 nm de los pocillos sin antígeno para cada suero (S1-S44).

Tras lavar las placas, se añadieron 100 μ l/pocillo de los sueros humanos diluidos 1:2 y se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween y se añadieron 100 μ l/pocillo de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana HRP (Clon B3102E8) (SouthernBiotech) diluido 1:1500 con PTB para ser incubado toda la noche a 4°C.

En el caso de la determinación de IgG4, la dilución de los sueros humanos fue 1:100 y el anti-anticuerpo fue anti-IgG4 humano obtenido en ratón HRP (Clon HP6025) (SouthernBiotech) diluido 1:1000 con PTB.

El revelado, el frenado y la lectura espectrofotométrica a 490 nm se realizaron igual que en ELISA indirecto. Todas las determinaciones para cada suero se realizaron por duplicado.

3.1.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó de acuerdo a un método desarrollado previamente (Hames, 1986; Laemmli, 1970) empleando cubetas Mini-PROTEAN[®] 3 (Bio-Rad). Los geles de 0,75 mm estaban formados por un gel de apilamiento al 4% en la parte superior y por otro de resolución al 12% de acrilamida. Se cargaron 25 μ g/carril para los geles con varios pocillos o 400 μ g para los geles de pocillo único de cada antígeno empleando tampón de muestra como diluyente (Tris 50 mM, conteniendo SDS al 2%, glicerol al 20% y azul de bromofenol al 0.02%, pH 8,6) diluido 1:1 en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 1%, pH 8,3). Para establecer las condiciones reductoras, las muestras se cargaron con el mismo tampón de muestra pero con un 5% de β -mercaptoetanol y fueron calentadas a 95°C durante 5 min. La electroforesis se realizó a 100 V en el mismo tampón Tris-glicina, pH 8,3 (ver arriba). Cuando el propósito de la electroforesis era realizar una inmunotransferencia posterior, se utilizó el marcador de peso molecular preteñido de 10-250 kDa Precision Plus Protein Kaleidoscope[®] (Bio-Rad). Sin embargo, si el objetivo era una tinción de las proteínas con azul Coomassie, se utilizó el

marcador de peso molecular no teñido de amplio rango 6,5-200 kDa (Bio-Rad). Estos marcadores se incorporaron a cada gel en un carril independiente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Transcurridas aproximadamente 1,5 h, el frente con azul de bromofenol salió de los geles y se detuvo la electroforesis para extraer los geles y utilizarlos para tinción con azul Coomassie o para inmunotransferencia.

3.1.15.1. Tinción con azul Coomassie

El gel se depositó en una caja cerrada con la solución de teñido [metanol al 50% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v) y azul Coomassie R-250 al 0,1% (p/v)] en agitación oscilante durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se aplicó sobre el gel una solución decolorante (metanol al 10% y ácido acético glacial al 10%) dejándola actuar en agitación durante 1 h en presencia de fragmentos de espuma de poliuretano para fijar los restos del colorante. Se repitió el lavado a intervalos de 1 h hasta que se observaron las bandas azules sobre fondo transparente.

Para la conservación de los geles, se humedecieron dos papeles de celofán transparente con agua destilada y se colocó uno de ellos sobre un cristal de unos 20 x 20 cm. Tras estirarlo bien sobre el cristal, se colocó el gel teñido y previamente lavado con agua destilada para eliminar cualquier resto de solución decolorante. A continuación se colocó el segundo papel encima del gel y se retiraron las burbujas manualmente. Este cristal se dejó en posición vertical a 4°C durante tres días y una vez seco se cortó el gel con un margen amplio de unos 5 cm empleando un cúter para ser escaneado y rápidamente ser prensado entre papeles de filtro.

3.1.15.2. Inmunotransferencia

Esta técnica se realiza tras una electroforesis en gel de poliacrilamida y consiste en la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa sobre la que serán aplicados diferentes anticuerpos con el objetivo de determinar la presencia de una determinada proteína en la membrana o bien para observar la presencia de anticuerpos en suero frente a determinadas proteínas que sabemos que están presentes en la membrana.

La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente se realizó a 100 V durante 1 h sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond[®] ECL 0,22 μ m (GE Healthcare) en una cubeta Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad) con tampón de electrotransferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% v/v, pH 8,3). A continuación, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS durante la noche y al día siguiente, antes de ser incubada con los anticuerpos o sueros correspondientes, se lavaron tres veces durante 5 min con PBS-Tween (todos los lavados de la membrana de nitrocelulosa se realizaron de esta forma) y se cortaron en tiras de unos 2 mm de ancho con un bisturí. Todos los sueros y anticuerpos se incubaron sobre cada tira con un volumen constante de 800 μ l/tira y todas las diluciones se realizaron empleando PBS-Tween con leche descremada al 1%.

Los sueros o anticuerpos primarios no conjugados con peroxidasa, fueron incubados en agitación a temperatura ambiente durante 3 h o durante toda la noche a 4°C. Las concentraciones o diluciones empleadas se detallan a continuación:

-Sueros humanos y murinos 1:25 (para la determinación de IgE la dilución fue 1:10). Tras los lavados con PBS-Tween, cada tira se incubó con un anticuerpo secundario específico para detectar aquellas bandas reconocidas por inmunoglobulinas específicas presentes en el suero:

-Para el marcaje de la IgG: anti-IgG humana obtenida en cabra HRP (Biosource) diluida 1:4000. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación.

-Para el marcaje de la IgA: anti-IgA humana obtenida en cabra HRP (Biosource) diluida 1:1500. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación.

-Para el marcaje de la IgG1 de ratón: anti-IgG1 de ratón obtenida en cabra HRP (Molecular Probes Inc.) diluida 1:500. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación.

-Para el marcaje de la IgG4: anti-IgG4 humana HRP de ratón (Clon HP6025) (SouthernBiotech) diluida 1:500. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación.

-Para el marcaje de la IgE: anti-IgE humana (IgG1 κ , E21A11) de ratón (INGENASA, Madrid, España) diluida 1:500. Se incubó al igual que los sueros durante 3 h a temperatura ambiente en agitación o durante toda la noche a 4°C y después de los lavados con PBS-Tween, se incubaron finalmente con anticuerpos de cabra anti-IgG1 de ratón HRP (Molecular Probes Inc.) diluidos 1:500 durante 2 h a temperatura ambiente y agitación.

-Anticuerpo monoclonal murino anti-hemoglobina de *A. pegreffii* 4E8g (IgG1) (2 μ g/ml). Tras los lavados con PBS-Tween, se incubaron las tiras de nitrocelulosa durante 2 h con anti-IgG1 de ratón HRP (Molecular Probes Inc.) diluida 1:1000.

-Anticuerpo monoclonal murino anti-tropomiosina (Clon: TM311) (Sigma-Aldrich) diluido 1:1000. Tras los lavados con PBS-Tween, se incubaron las tiras de nitrocelulosa durante 2 h con anti-IgG1 de ratón HRP (Molecular Probes Inc.) diluida 1:1000 para tropomiosinas de vertebrados y de 1:500 para las de invertebrados.

-Anticuerpo policlonal de conejo anti-arginina quinasa (Åkerström, 2002) (Veterinærinstituttet, Oslo, Noruega) diluido 1:8000. Tras los lavados con PBS-Tween, se incubaron las tiras de nitrocelulosa durante 2 h con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo HRP (Molecular Probes Inc.) diluida 1:1000.

Para el revelado de las tiras de nitrocelulosa, se lavaron con PBS-Tween y se trataron con una solución de 3,3'-diaminobencidina 0,5 mg/ml (DAB) (Sigma-Aldrich) con peróxido de hidrógeno al 0,05% en PBS.

3.1.15.3. Inhibición de la IgG1 de ratones inmunizados con hemoglobina y miofilina recombinantes de *Anisakis*

Se mezclaron por un lado, los sueros de los ratones inmunizados con la hemoglobina y por otro los de aquellos inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* para ser diluidos 1:5 empleando PBS-Tween con leche descremada al 1%. A continuación, se incubaron durante la noche a 4°C con 10 μ g de hemoglobina o miofilina recombinantes; o con 40 μ g de BSA (control) por cada ml de disolución de suero. Esta cantidad de proteínas recombinantes se seleccionó para estar en exceso en comparación con los anticuerpos específicos IgG1 de los sueros. Al día siguiente, se centrifugaron durante 20 minutos a

6700 g y se descartó el precipitado con los inmunocomplejos, empleándose los sobrenadantes para ser incubados sobre tiras de nitrocelulosa con extracto total de *Anisakis* previamente transferido, siguiéndose el proceso para la detección de IgG1 de ratón mediante inmunotransferencia mencionado anteriormente.

3.1.15.4. Tratamiento con peryodato de la hemoglobina nativa purificada de *Anisakis* y de los extractos totales de *Anisakis* y *Ascaris*

Las tiras de nitrocelulosa con la hemoglobina nativa de *Anisakis* y los extractos totales de *A. simplex* y *A. suum*, fueron tratadas con peryodato siguiendo un método descrito previamente para oxidar los hidratos de carbono de los epitopos y detectar si los epitopos glicosilados son importantes para el reconocimiento por parte de los anticuerpos (Woodward *et al.*, 1985). Las tiras se incubaron con una solución de acetato sódico 50 mM, pH 4,5 con y sin peryodato sódico (NaIO₄) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h. Se realizaron los lavados con PBS-Tween (3 x 5 min) y se continuó con las incubaciones de los sueros o anticuerpos correspondientes como se ha descrito en el apartado de inmunotransferencia.

3.1.16. Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó en primer lugar el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Si los valores no se ajustaban a una distribución normal, se llevaron a cabo tests estadísticos no paramétricos. Se calcularon los valores de las medianas y los rangos intercuartiles de los niveles de anticuerpos específicos y se compararon empleando la prueba U de Mann-Whitney. En el caso de que los valores se ajustaran a una distribución normal, se calcularon las medias y se compararon mediante el test de la *t* de Student. La edad y el UAS en los distintos grupos, se compararon mediante ANOVA. Las prevalencias se calcularon para cada sexo en los pacientes del grupo UC+ y UC- y se compararon mediante el test de la Chi-cuadrado. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y se realizó un modelo de regresión lineal para el estudio de las correlaciones. Todos los cálculos fueron realizados empleando el programa IBM SPSS Statistics v20. La significación estadística se estableció en $P < 0,05$, bilateral (2 colas).

3.1.17. Análisis proteómico de alta resolución mediante nanoLC-ESI-orbitrap-MS/MS

Las bandas de interés teñidas con azul Coomassie fueron cortadas del gel de SDS-PAGE y colocadas en tubos de microcentrífuga. A continuación, fueron troceadas y desteñidas con acetonitrilo y bicarbonato amónico 50 mM en proporción 1:1 a temperatura ambiente y en agitación durante 10 minutos. Se descartó el líquido y se repitió dos veces el mismo proceso. Después de secarlas en un concentrador por vacío y centrifugación (Heto, Allerød, Dinamarca) durante aproximadamente 10 minutos, las proteínas escindidas del gel se redujeron con ditiotreitól (Sigma-Aldrich) a 1,5 mg/ml en bicarbonato amónico 25 mM a 56°C durante 1 h en un calentador de tubos de microcentrífuga Dri-Block® (Techne, Duxford, Reino Unido). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante tras realizar una centrifugación a 13.000 g durante dos minutos.

Las proteínas fueron alquiladas mediante incubación con yodoacetamida a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) en bicarbonato amónico 25 mM a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad y agitación.

A continuación, se descartó el sobrenadante y los fragmentos del gel se lavaron una vez con bicarbonato amónico y dos veces con acetonitrilo y bicarbonato amónico 50 mM en proporción 1:1 a temperatura ambiente y agitación durante 10 minutos cada vez para posteriormente ser secadas en el concentrador por vacío y centrifugación.

Las proteínas se digirieron *in situ* en los fragmentos de gel mediante la adición de unos pocos microlitros de una solución de tripsina 0,1 µg/ml Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade® (Promega) que fue preparada diluyendo tripsina a 1 mg/ml en acético 50 mM y bicarbonato amónico 25 mM. Los fragmentos de gel fueron cubiertos con una solución de acetonitrilo y bicarbonato amónico 10 mM en proporción 1:9 e incubados a 37°C durante toda la noche.

Los fragmentos de la ruptura enzimática se obtuvieron del sobrenadante, se concentraron hasta un volumen de 7 µl y se mezclaron con ácido fórmico concentrado y ácido trifluoroacético al 0,1% hasta un volumen final de 15 µl para ser analizados usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con ionización por nanoelectrospray (ESI) empleando un analizador de trampa de iones Orbitrap para llevar a cabo un análisis de secuenciación mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El sistema consiste en dos bombas binarias Agilent 1200 (nano y capilar) con toma de muestra automática, calentador de columna y válvula de conmutación integrada (Agilent, Waldbronn, Alemania) acoplada a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL® (Thermo Fisher Scientific). Las soluciones con los péptidos (4 µl) fueron bombeadas a una columna de 5 mm × 0,3 mm (5 µm) Zorbax® 300SB-C18 (Agilent) con un 97% de una disolución de ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo al 3% con un flujo de 4 µl/min aportado por la bomba capilar. Transcurridos 7 min, la válvula de conmutación fue activada y los péptidos se eluyeron en una columna de 150 mm × 0,075 mm con resina C18 (3 µm) GlycproSIL® C18 80 Å (Glycpromass, Stove, Alemania). La separación cromatográfica fue realizada con un gradiente del 5% al 55% de acetonitrilo usando un gradiente binario de acetonitrilo/agua (ácido fórmico 0,1%) durante 70 min y un flujo de 0,2 µl/min aportado por la bomba de nanoflujo. Los espectros de masa se obtuvieron empleando el modo positivo en la ionización aplicando el cambio automático entre espectros exploratorios o espectros de masas en tándem (MS/MS) dependiendo de los datos obtenidos. Las muestras peptídicas fueron analizadas mediante disociación inducida por colisión de alta energía (HCD) como método de fragmentación, adquiriendo un escaneo exploratorio del Orbitrap en el rango de m/z 300-2000 seguido por un MS/MS de los tres iones más intensos en el Orbitrap. El número de iones en el LTQ Orbitrap fue de $1 \cdot 10^6$ para realizar los escaneos exploratorios a una resolución de $3 \cdot 10^4$ para m/z 400 empleando masas fijas para recalibrar y así mejorar la precisión de las masas de los iones precursores. La fragmentación inducida por colisión se realizó cuando se alcanzaron 5000 iones. Los iones fueron seleccionados cuando se contaron, al menos, 500 unidades del mismo ion. Los iones seleccionados que ya fueron secuenciados se excluyeron dinámicamente durante 180 s.

Los datos espectrométricos de masas fueron en primer lugar analizados mediante la generación de archivos msf a partir de los espectros crudos de MS y MS/MS empleando el programa Proteome Discoverer 1.0 (Thermo Fisher Scientific). Las búsquedas se realizaron en la base de datos del NCBI aplicando un filtro taxonómico para proteínas de nematodos a pesar de que disponíamos de las

secuencias teóricas obtenidas a partir de la secuenciación del gen amplificado y superpusimos los péptidos secuenciados alineándolos con ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Se utilizó el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science Inc. Boston, MA) con los siguientes criterios: *enzyme name* (*trypsin*), *fixed modifications* (*carbamidomethyl*), *variable modifications* (*oxidation*), *mass values* (*monoisotopic*), *protein mass* (*unrestricted*), *peptide mass tolerance* (± 7 ppm), *fragment mass tolerance* ($\pm 0,6$ Da) y *maximum missed cleavages* (1). Se consideraron significativas para un *Score* > 30 (MASCOT).

3.2. Análisis bioinformáticos

3.2.1. Secuencias y estructuras proteicas tridimensionales

Todas las secuencias en formato FASTA se obtuvieron de la base de datos de proteínas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). En primer lugar se escogieron tropomiosinas de vertebrados e invertebrados de 284 aminoácidos completas para un análisis de estructura primaria y secundaria en ambos grupos de organismos. Posteriormente, se amplió el número de organismos para realizar un estudio piloto virtual de reactividad cruzada basado en el análisis de su estructura tridimensional (Tabla 15). Las estructuras tridimensionales experimentales fueron descargadas directamente de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>) y los modelos de algunas tropomiosinas se descargaron de la base de datos de alérgenos *Structural Database of Allergenic Proteins* (SDAP) (<https://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>).

Tabla 15. Secuencias y estructuras tridimensionales de tropomiosina.

Filo/Clase	Organismo	Nombre común	Secuencia	Estructura 3D
Chordata				
<i>Mammalia</i>	<i>Sus scrofa</i>	Cerdo*	NP_001090952.1	1C1G
	<i>Bos Taurus</i>	Vaca*	NP_001013608.1	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo*	NP_001099158.1	2TMA
	<i>Homo sapiens</i>	Hombre*	AAB59509.1	
<i>Aves</i>	<i>Gallus gallus</i>	Pollo*	NP_990732.1	
<i>Actinopterygii</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia mozambiqueña	AFV53352.1	
	<i>Thunnus thynnus</i>	Atún Atlántico*	BAJ11924.1	
Mollusca				
<i>Bivalvia</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra del pacífico	BAH10152.1	
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Almeja japonesa*	BAH10157.1	
	<i>Mytilus edulis</i>	Mejillón*	AAA82259.1	
<i>Cephalopoda</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Pulpo*	BAE54433.1	
Arthropoda				
<i>Malacostraca</i>	<i>Pandalus borealis</i>	Camarón nórdico	CBY17558.1	
	<i>Homarus americanus</i>	Bogavante	O44119.1	Modelo 163 SDAP
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	Camarón marrón*	AAZ76743.1	Modelo 284 SDAP
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Langostino blanco*	ACB38288.1	
	<i>Procambarus clarkii</i>	Cangrejo de río*	ACN87223.1	
<i>Arachnida</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Ácaro del polvo*	O18416.1	Modelo 122 SDAP
<i>Insecta</i>	<i>Blatella germanica</i>	Cucaracha*	AAF72534.1	

Nematoda				
<i>Chromadorea</i>	<i>Anisakis simplex</i> L3	Anisakis*	CAB93501.1	Modelo 26 SDAP
	<i>Ascaris suum</i> adultos	Ascaris*	ADY44806.1	
	<i>Onchocerca volvulus</i>	Oncocerca	AAC28900.1	
	<i>Loa loa</i>	Loa	EJD75137.1	
<i>Enoplea</i>	<i>Trichinella spiralis</i> L1	Triquina*	AAL14704.1	
Platyhelminthes				
<i>Cestoda</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Tenia del zorro	CAC85552.1	
<i>Trematoda</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>	Duela hepática china	AAA70373.1	
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosoma	AAA29942.1	

*Secuencias de tropomiosinas de vertebrados e invertebrados empleadas para el estudio filogenético y de estructura primaria/secundaria. SDAP: *Structural Database of Allergenic Proteins* (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>).

Del mismo modo se obtuvieron secuencias y estructuras de hemoglobinas de distintos nematodos parásitos y sus hospedadores definitivos, y de las larvas de los mosquitos *C. thummi* (Tabla 16). Para la identificación del péptido señal se utilizó el servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). El editor y visualizador de alineamientos GeneDoc v2.7 (Nicholas y Nicholas Jr., 1997) fue utilizado en el análisis de aminoácidos cargados y en la búsqueda y representación gráfica de los motivos existentes en las proteínas analizadas. Las representaciones gráficas de la conservación de cada aminoácido en los alineamientos se realizaron con WebLogo v3.5.0 (Crooks *et al.*, 2004).

Tabla 16. Secuencias y estructuras tridimensionales de hemoglobina.

Filo/Clase	Organismo	Nombre común	Secuencia	Estructura 3D
Chordata				
<i>Mammalia</i>	<i>Tursiops truncatus</i> (Hb α)	Delfín mular	XP_004322167.1	
	<i>Tursiops truncatus</i> (Hb β)		XP_004330646.1	
	<i>Phoca vitulina</i> (Hb α)	Foca moteada	P09908.1	
	<i>Phoca vitulina</i> (Hb β)		P09909.1	
	<i>Homo sapiens</i>	Hombre		2DN1
	<i>Sus scrofa</i>	Cerdo		1QPW
	<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro		3GOU
Arthropoda				
<i>Insecta</i>	<i>Chironomus thummi</i>	Mosquito		1ECO
Nematoda				
<i>Chromadorea</i>	<i>Anisakis pegreffii</i>	Anisakis	AFY98826.1	
	<i>Ascaris suum</i>	Ascaris	AAA29374.1	1ASH dominio I
	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Pseudoterranova	CAA77743.1	
	<i>Toxocara canis</i> (dominio I)	Toxocara	AAL58704.1	

Hb: Hemoglobina.

3.2.2. Análisis de secuencia y filogenético de las tropomiosinas

Las tropomiosinas marcadas con el asterisco (*) en la Tabla 14, se alinearon empleando ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). El archivo generado (.msf) fue editado con GeneDoc v2.7 (Nicholas y Nicholas Jr.,

1997). Las tropomiosinas de *A. simplex* (modelo 26 SDAP) y la de *S. scrofa* (1C1G) fueron empleadas como modelo de tropomiosina de invertebrado o vertebrado, respectivamente, para identificar sobre sus estructuras tridimensionales mediante el programa PVS (*Protein Variability Server*, <http://imed.med.ucm.es/PVS/>) (García-Boronat *et al.*, 2008) las regiones más variables del alineamiento de las secuencias de tropomiosinas de invertebrados o de vertebrados analizadas.

Las predicciones de estructura secundaria fueron realizadas empleando el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) desde el servidor NPS@ (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) (Combet *et al.*, 2000).

Los análisis filogenéticos se realizaron con MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) y los árboles de máxima verosimilitud con PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). Se construyeron 5 árboles filogenéticos que fueron evaluados mediante el test de Bootstrap (Felsenstein, 1985) de 1000 repeticiones. El test de Bootstrap, o *bootstrapping* no paramétrico es una técnica estadística de remuestreo con reemplazamiento en la que se generan pseudo-réplicas a partir del alineamiento original de las secuencias incluyéndose columnas al azar en cada repetición. Se considera como valor 1 si la topología del siguiente árbol que se plantea en cada repetición coincide con la anterior y como valor 0 si no coincide. Por este motivo, en cada nodo interno del árbol se muestra un valor que es el porcentaje de valores “1” que aparecen en cada repetición. Este test refleja el porcentaje de fiabilidad de la topología (distribución de ramas y nodos) del árbol consenso representado. Las distancias evolutivas (los árboles se dibujaron a escala) fueron calculadas usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkanndl y Pauling, 1965). Los métodos más habituales de reconstrucción filogenética se esquematizan en la Figura 10.


		Tipo de datos	
		Distancias	Caracteres
Fundamento	Algoritmo de agrupamiento	UPGMA Neighbor Joining	
	Criterios de optimización	Mínima Evolución	Máxima Parsimonia Máxima Verosimilitud Inferencia Bayesiana

Figura 10. Métodos de reconstrucción filogenética. UPGMA: Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages. Los cinco métodos empleados para calcular la filogenia a partir de nuestro alineamiento de tropomiosinas fueron: UPGMA (*Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages*), *Neighbor Joining* (NJ) y *Mínima Evolución* (ME: *Minimum Evolution*); todos ellos basados en distancias y además *Máxima Parsimonia* (MP: *Maximum Parsimony*) y *Máxima verosimilitud* (ML: *Maximum Likelihood*) basados en caracteres.

Los métodos basados en distancias, son más rápidos y muy útiles para análisis preliminares pero no son tan fiables como los métodos basados en caracteres porque emplean un valor numérico (distancia observada) que es el total de diferencias que hay en cada posición del alineamiento de las secuencias. El problema es que cuanto más diferentes sean las secuencias la probabilidad de que existan cambios superpuestos es mayor. Los cambios superpuestos esconden mutaciones previas que hayan podido

ocurrir en esa posición y así la distancia observada es una subestimación de la real (Abascal *et al.*, 2014). Por ejemplo, si la tropomiosina de un organismo ancestral presentaba en la posición 87 un aminoácido 1 (aa_1), que tras mutaciones sucesivas se sustituyó de la siguiente manera en la evolución: $aa_1 \rightarrow aa_2 \rightarrow aa_3 \rightarrow aa_4$, hasta convertirse en la tropomiosina del organismo de la especie actual, la distancia observada es simplemente la mutación de $aa_1 \rightarrow aa_4$ en cambio la distancia evolutiva real es mayor.

UPGMA es uno de los métodos más sencillos computacionalmente y sigue un algoritmo de agrupamiento a partir de las secuencias que tienen más similitud, suponiendo que la tasa de sustitución de un aminoácido es idéntica para todos los linajes evolutivos. Genera un árbol enraizado (Sneath y Sokal, 1973).

El método NJ (Saitou y Nei, 1987) es una versión simplificada del método ME (Rzhetsky y Nei, 1992). La topología del árbol obtenido con este método se basó en el menor valor de la suma de todas las ramas (S) como una estimación del árbol correcto. El valor S no se calcula para todas las topologías y el examen de diferentes topologías va embebido en el algoritmo. Solo se produce un árbol final.

El método ME es la evolución del método NJ y escoge igualmente el árbol más corto (menor valor de S) pero seguidamente se examinan todos los árboles con las topologías más parecidas al árbol obtenido por el método NJ y se valora con un criterio de optimización por mínimos cuadrados cuál de estos árboles es el más adecuado (Rzhetsky y Nei, 1992).

En relación a los métodos probabilísticos basados en caracteres, éstos consideran los cambios concretos de aminoácidos que ocurren en cada posición del alineamiento y se fundamentan en criterios de optimización: en primer lugar se generan árboles mediante algoritmos heurísticos y a continuación se evalúan estos árboles utilizando una función objetiva para elegir el mejor de los generados en el paso anterior (Abascal *et al.*, 2014).

El método MP se desarrolló originalmente para caracteres morfológicos y hay varias versiones. Para construir un árbol se utilizan solo las posiciones en las que hay, al menos, dos tipos diferentes de aminoácidos, cada uno de ellos representados, al menos, dos veces (posiciones informativas de parsimonia). Las otras posiciones variables del alineamiento no se utilizan para construir un árbol MP, aunque sí que son informativas para los métodos basados en distancias y para el método de máxima verosimilitud. En nuestro análisis, el árbol MP se obtuvo empleando el algoritmo CNI (*Close Neighbor Interchange*) (Nei y Kumar, 2000) con nivel de búsqueda 1 en el que los árboles iniciales se obtuvieron con adición aleatoria de secuencias realizándose 10 réplicas.

Finalmente, el árbol ML se construyó generando un árbol inicial con el método rápido NJ y se ajustó la longitud de las ramas para alcanzar una topología con la máxima probabilidad de haber dado lugar a los datos observados (alineamiento de secuencias). A continuación, se crearon variantes en la topología de ese árbol mediante el método NNI (*Nearest Neighbor Interchange*) para buscar topologías que se adecuaban mejor a los datos. Las longitudes de las ramas se calcularon para todas las variantes y al igual que anteriormente, la de mayor probabilidad se consideró la mejor opción. Esta búsqueda continúa hasta que no se encuentre ningún árbol con una probabilidad más alta que el anterior. Nuestro árbol ML fue deducido empleando un modelo matricial LG+G (Le y Gascuel, 2008). Los árboles iniciales de la búsqueda heurística fueron obtenidos automáticamente usando un algoritmo NJ mejorado,

denominado BIONJ (Gascuel, 1997). El parámetro +G se utilizó para modelar la variación de tasas de evolución en diferentes partes del alineamiento (cuatro categorías; +G=3,058). La proporción de sitios invariables (0,210) y el modelo de sustitución evolutiva de aminoácidos (LG+G) fueron escogidos mediante el criterio BIC (*Bayesian Information Criterion*) empleando ProtTest v2.4 (Abascal *et al.*, 2005).

3.2.3. Modelado por homología

Las visualizaciones tridimensionales de las proteínas se realizaron con el software de visualización molecular PyMOL (Delano, W. L. The PyMol Molecular Graphics System, www.pymol.org) y las gráficas con GraphPad Prism v6.0. (GraphPad Software Inc., San Diego, California).

Se trabajó con la tropomiosina de 26 especies de organismos, siete de ellas de vertebrados y 19 especies más de invertebrados. Si atendemos al modo de vida, ocho de las 26 especies son de parásitos. Las tropomiosinas objeto de estudio figuran en la Tabla 15.

Por otro lado, se trabajó de manera similar con 10 hemoglobinas maduras (sin péptido señal) de cuatro nematodos parásitos y sus cuatro hospedadores definitivos junto con la hemoglobina humana y la hemoglobina alergénica de las larvas de los mosquitos de la especie *C. thummi* (Tabla 16).

La tropomiosina del cerdo y la del conejo no se modelaron ya que se encontraban sus estructuras experimentales en la base de datos Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) *Sus scrofa*, 1C1G y *Oryctolagus cuniculus*, 2TMA.

Lo mismo sucedió con las estructuras tridimensionales de las hemoglobinas del hombre, cerdo, perro y *Chironomus* que se descargaron directamente de la base de datos PDB: 2DN1 (Hemoglobina humana, subunidades alfa y beta), 1QPW (hemoglobina del cerdo, subunidades alfa y beta), 3GOU (hemoglobina del perro, subunidades alfa y beta), 1ECO (hemoglobina alergénica Chi t 1 de *Chironomus thummi*, cadena única).

Las secuencias aminoacídicas de aquellas tropomiosinas y hemoglobinas de las que no se disponía de estructura tridimensional experimental, se sometieron a un modelado por homología a través del servidor *Protein Model Portal* (Haas *et al.*, 2013) mediante HHpred-MODELLER (Söding *et al.*, 2005). La función del programa HHpred es la identificación de proteínas homólogas como posibles plantillas o moldes para el modelado estructural. En primer lugar, el programa construye un alineamiento de la secuencia de tropomiosina o hemoglobina con sus homólogas mediante el algoritmo PSI-BLAST de la base de datos NCBI. Este alineamiento es anotado con predicciones de estructura secundaria y a continuación se genera un perfil HMM (*Hidden Markov Model*) y se compara con cada uno de los perfiles HMM existentes en varias bases de datos de alineamientos de familias de proteínas. Una vez seleccionadas como plantillas las estructuras con las puntuaciones más altas, se construye finalmente el modelo tridimensional mediante el programa MODELLER (Söding *et al.*, 2005).

Además, las estructuras tridimensionales de las tropomiosinas de *Anisakis simplex*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Homarus americanus* y *Dermatophagoides pteromyssinus*; cuyos modelos ya figuraban en la base de datos de alérgenos SDAP, fueron utilizadas para comparar la calidad de nuestros modelos.

Para estimar la calidad de los modelos predichos utilizamos QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>) (Benkert *et al.*, 2008, 2009). QMEAN nos ofrece

un valor, comprendido entre 0 y 1 (QMEAN-Score), elaborado a partir de la combinación lineal de seis descriptores estructurales: cuatro de ellos estadísticos (energía de interacción de los carbonos beta, energía de todos los átomos emparejados, energía de solvatación, energía según ángulo de torsión) y otros dos que representan: la similitud entre la estructura secundaria predicha y calculada; y otro, la accesibilidad del solvente. Un QMEAN-Score=1 indica que nuestro modelo tiene la máxima calidad hipotética posible en todos los descriptores. El Z-Score que figura al lado de los cuatro descriptores estadísticos y del QMEAN-Score, refleja el grado de naturalidad del modelo. El Z-Score indica el número de desviaciones estándar de cada descriptor para nuestro modelo con respecto a la media de las estructuras elucidadas experimentalmente (Z-Score=0) existentes en las bases de datos.

3.2.4. Predicción de epitopos

Para la predicción de los epitopos se usó Discotope 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) (Kringelum *et al.*, 2012). Este programa predice epitopos B conformacionales a partir de estructuras proteicas tridimensionales. Modificando el valor umbral de *Discotope Score* se modifican la especificidad y la sensibilidad para la detección de los epitopos. En nuestro caso, utilizamos el umbral de detección -3,7 para maximizar la sensibilidad manteniendo una alta especificidad (Krawczyk *et al.*, 2014). De este modo, todos aquellos residuos que presentaron puntuaciones mayores a -3,7 fueron considerados como parte de un epitopo.

3.2.5. Cálculo del potencial electrostático

Los cálculos de potencial electrostático se realizaron desde la web <http://www.poissonboltzmann.org/> (Unni *et al.*, 2011). Se transformaron los archivos con las estructuras tridimensionales de las hemoglobinas del formato (.pdb) a (.pqr) en el servidor web PDB2PQR v1.9.0 (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/) (Dolinsky *et al.*, 2004) y se analizó el potencial electrostático mediante el programa APBS (Baker *et al.*, 2001). Se estudiaron los pI (puntos isoeléctricos) teóricos de las hemoglobinas plegadas mediante PROPKA 3.0 (Olsson *et al.*, 2011) y todos los resultados se visualizaron con PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

3.2.6. Comparación de superficies

Para la comparación y el análisis de las superficies se hizo uso de la herramienta web 3-D Surfer 2.0 (<http://dragon.bio.purdue.edu/3d-surfer/>). El cálculo comienza con la voxelización de la superficie de la proteína previamente triangulada para formar una malla, que se discretiza para generar una red cúbica. Con los vóxeles de cada proteína se generaron vectores de 121 coordenadas que se denominan descriptores 3D-Zernike y representan su superficie. De esta manera, cada superficie es representada como un vector de 121 coordenadas y se pueden comparar mediante el cálculo de las distancias euclidianas entre los vectores (La *et al.*, 2009).

Como ejemplo, para $A = (a_1, a_2, \dots, a_{121})$ y $B = (b_1, b_2, \dots, b_{121})$ la distancia euclidiana (d_E) en un espacio de 121 dimensiones se calculó del siguiente modo:

$$d_E(A, B) = \sqrt{(a_1 - b_1)^2 + (a_2 - b_2)^2 + \dots + (a_{121} - b_{121})^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^{121} (a_i - b_i)^2}$$

En nuestro caso, comparamos las distancias euclidianas entre los vectores de cada una de las tropomiosinas y de cada dominio globina de las hemoglobinas, empleando el paquete estadístico SPSS v20 para Windows realizando un análisis de conglomerado jerárquico. El análisis de conglomerados jerárquicos es una técnica aglomerativa que parte del cálculo de una matriz de distancias entre cada elemento y todos los restantes de la muestra para formar grupos por proximidad, es decir, los más similares en términos de distancia. De esta forma podemos representar en forma de árbol la similitud entre las superficies de los dominios globina estudiados.

3.2.7. Digestión enzimática *in silico*

El programa Peptidecutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) fue utilizado para la simulación *in silico* de la digestión enzimática de las tropomiosinas con potencialidad para entrar por vía oral y se realizaron los cortes con las enzimas digestivas tripsina, pepsina (pH 1.3 y pH>2) y quimotripsina (de alta y baja afinidad) (Gasteiger *et al.*, 2005).

3.2.8. Predicciones de sitios de glicosilación

El análisis de las glicosilaciones se ha realizado con los programas disponibles gratuitamente en la web <http://www.cbs.dtu.dk/services/> (Center for Biological Sequence Analysis – Technical University of Denmark). En concreto, los servidores para la predicción de modificaciones postraduccionales en proteínas que hemos utilizado son: [NetCGlyc 1.0](#), [NetGlycate 1.0](#), [NetNGlyc 1.0](#), [NetOGlyc 4.0](#), [NetPhos 2.0](#), [YingOYang 1.2](#).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis *in silico* de la alergenicidad de la tropomiosina de *Anisakis simplex*

4.1.1. Resumen

La tropomiosina de los organismos invertebrados es una proteína panalergénica con un plegamiento extremadamente sencillo. Esto la convierte en la diana perfecta para investigar las diferencias en su estructura con respecto a las tropomiosinas de los organismos vertebrados que no son consideradas alérgicas. En primer lugar, se realizaron análisis filogenéticos y de secuencias para explorar las diferencias en la estructura primaria entre 17 tropomiosinas y de este modo promover el desarrollo de experimentos en el campo de la alergia alimentaria basados en el estudio de la tropomiosina. Los análisis filogenéticos mostraron que la tropomiosina a nivel de secuencia aminoacídica es un valioso marcador evolutivo y aunque los árboles construidos no fueron siempre filogenéticamente correctos, constituyen una primera aproximación a su utilización por parte de pacientes alérgicos a la tropomiosina, pudiendo usar estos árboles filogenéticos para intentar evitar la ingestión de aquellos alimentos cuyas tropomiosinas estén más próximas a la del organismo implicado en la aparición de las manifestaciones alérgicas. Los análisis de la estructura secundaria revelaron que la probabilidad de plegamiento en hélice alfa de las tropomiosinas de invertebrados estudiadas fue más baja que en las de los vertebrados analizados excepto la del atún del Atlántico (*Thunnus thynnus*). Esto sugirió que la falta de plegamiento en hélice alfa podría estar relacionada con la inmunogenicidad de las tropomiosinas. En particular, las regiones adyacentes a las posiciones 133-135 y 201 de las tropomiosinas de invertebrados presentaron una menor probabilidad de plegamiento en hélice alfa que las de vertebrados y son candidatas a ser las responsables de su alergenicidad.

Tras el análisis piloto general de estructura primaria y secundaria de tropomiosinas se realizó un análisis posterior, más amplio, aplicado a intentar predecir las frecuentes reacciones cruzadas atribuidas al diagnóstico inmunológico de la infección por *Anisakis* spp. mediante la identificación de epitopos B conformacionales en 26 estructuras tridimensionales de tropomiosinas y su posterior agrupamiento por similitud superficial. Del mismo modo, se realizó una fragmentación enzimática digestiva *in silico* y se estudió su afectación por modificaciones postraduccionales. Los modelos estructurales generados resultaron válidos para el análisis de la superficie tridimensional y tras la predicción de epitopos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados (vertebrados, parásitos e invertebrados no parásitos). La región 115-183, la zona en la que se encuentra el epitopo central de la tropomiosina, demostró similitud en los dos ascáridos estudiados: *Anisakis simplex* y *Ascaris suum*. Asimismo, se observó una elevada similitud en las tropomiosinas de crustáceos productores de alergias como son *Farfantepenaeus aztecus*, *Pandalus borealis* y *Litopenaeus vannamei* con la correspondiente de *A. simplex*. Finalmente, los motivos LExxL/LExxN podrían, junto con las glicosilaciones en diferentes partes de la molécula, ser responsables de la diferente alergenicidad de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados. Estos resultados confirman que la novedosa metodología de análisis utilizada (obtención de la secuencia, modelado, análisis de epitopos, comparación de superficies de epitopos) es adecuada para la predicción de reacciones cruzadas.

4.1.2. Análisis filogenético

Los árboles obtenidos mediante los métodos UPGMA (*Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages*), NJ (*Neighbor Joining*), ME (*Minimum Evolution*) y ML (*Maximum Likelihood*) presentaron aproximadamente la misma topología (Figuras 11, 12, 13 y 15) lo que indica que simplemente comparando las secuencias aminoacídicas de las tropomiosinas es posible construir árboles filogenéticos similares a aquellos construidos empleando secuencias nucleotídicas u otros marcadores evolutivos (Wang *et al.*, 2011).

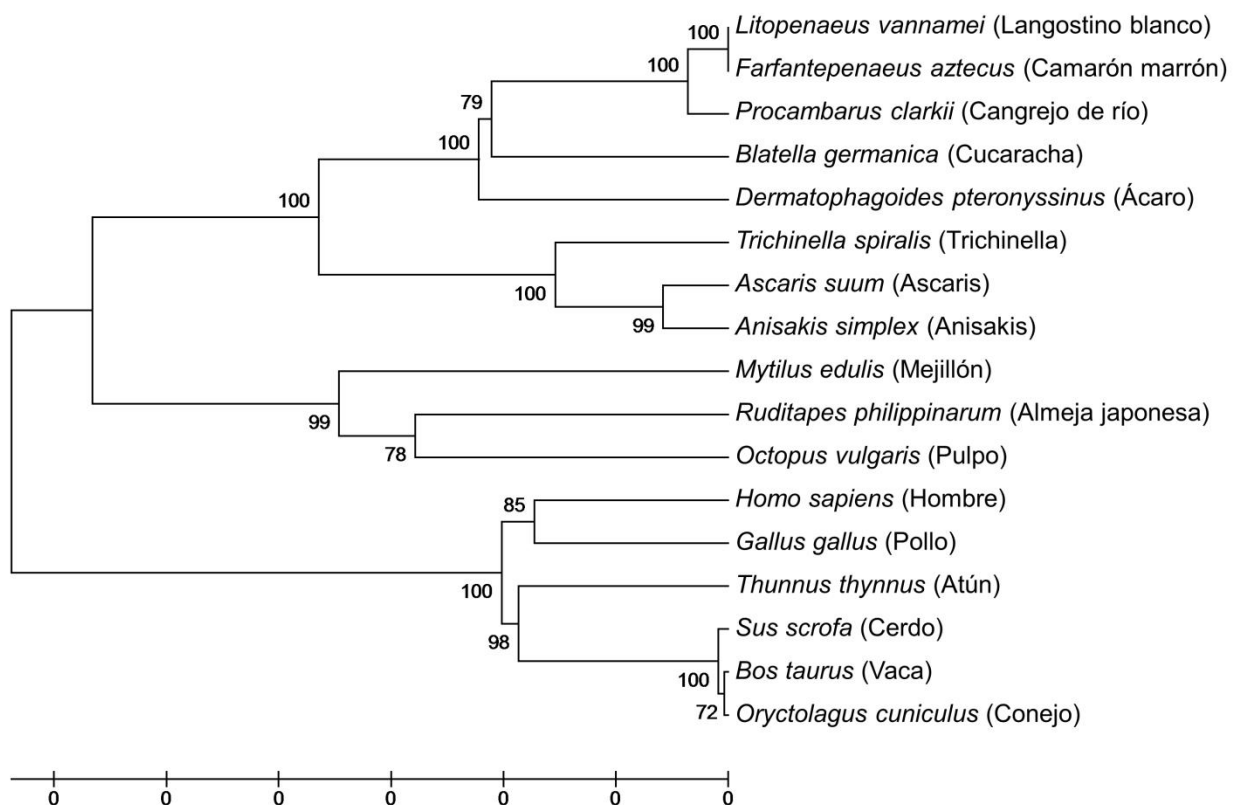


Figura 11. Relaciones evolutivas obtenidas con el método *Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages* comparando 17 tropomiosinas.

Ver apartado [3.2.2.](#) y Figura 10 de Material y Métodos.

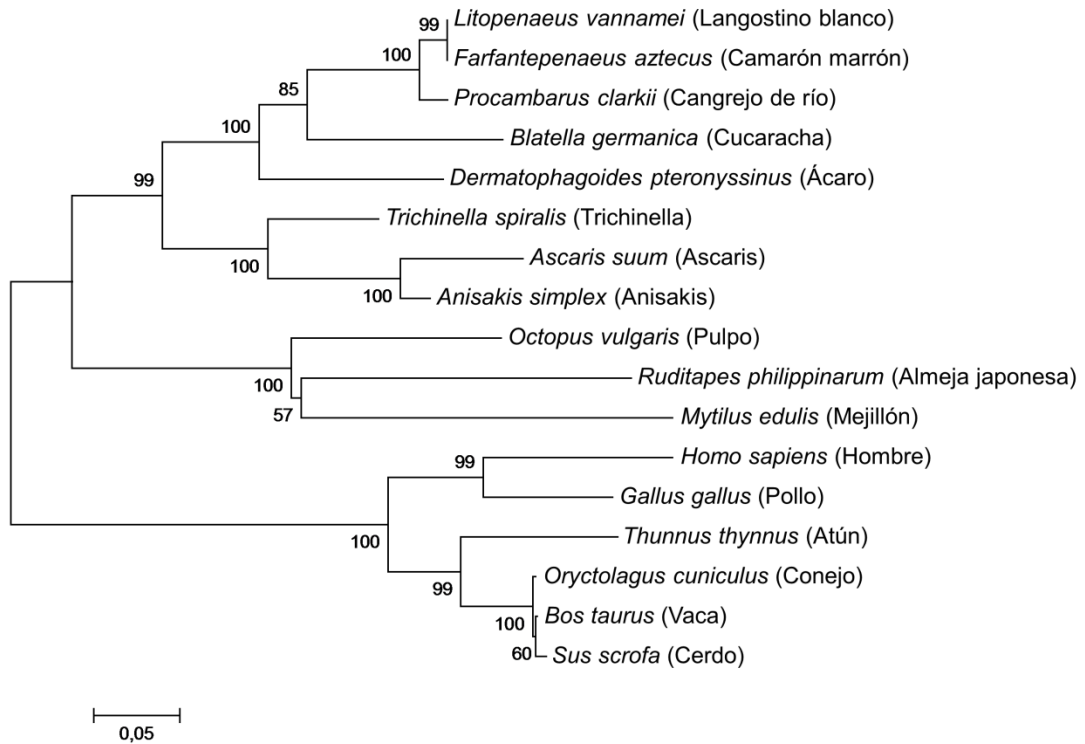


Figura 12. Relaciones evolutivas obtenidas con el método *Neighbor Joining* comparando 17 tropomiosinas.

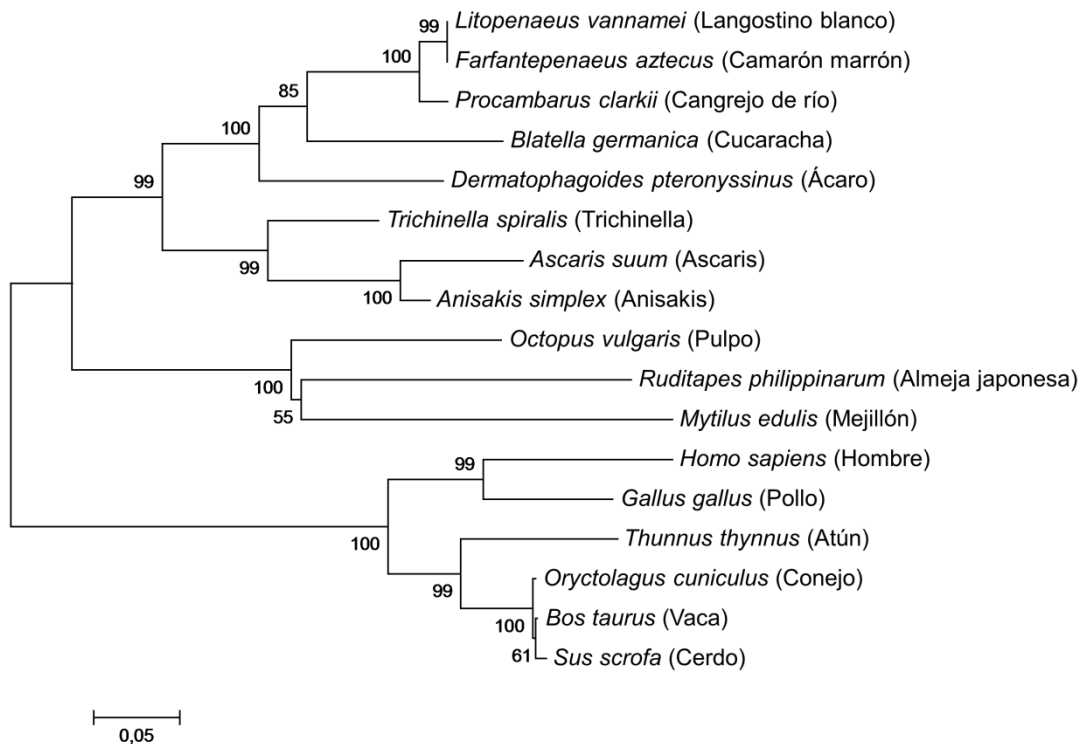


Figura 13. Relaciones evolutivas obtenidas con el método *Minimum Evolution* comparando 17 tropomiosinas.

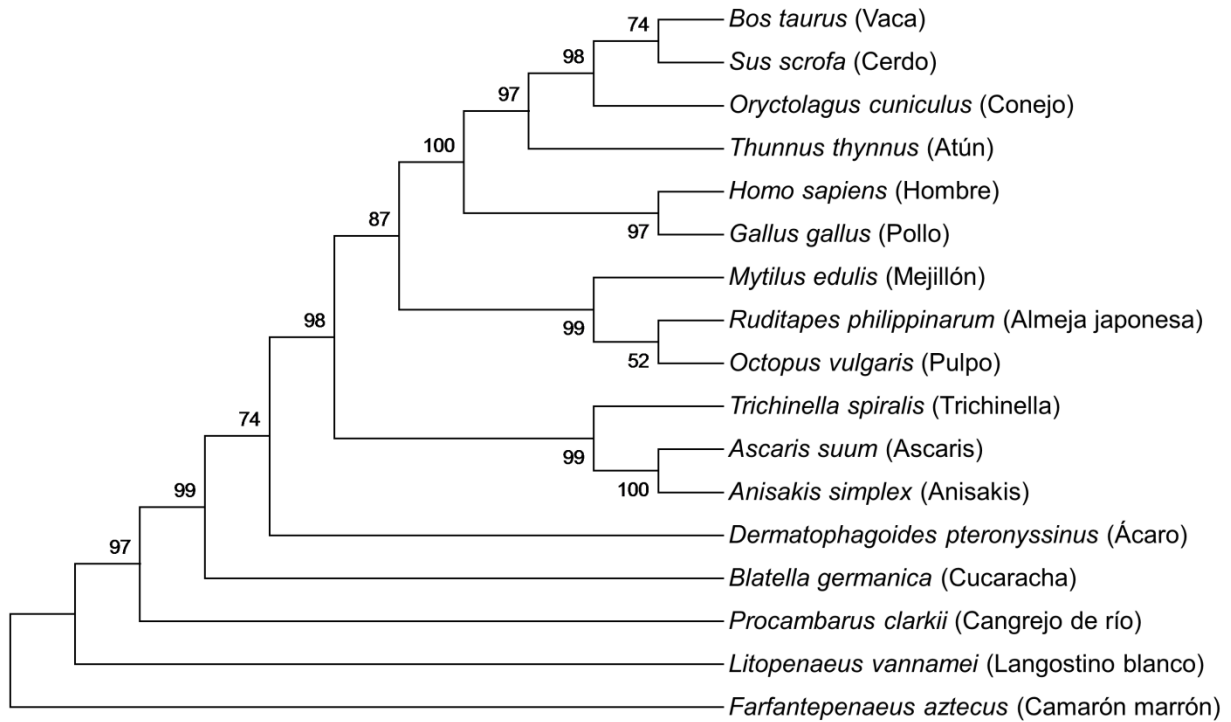


Figura 14. Relaciones evolutivas obtenidas con el método *Maximum Parsimony* comparando 17 tropomiosinas.

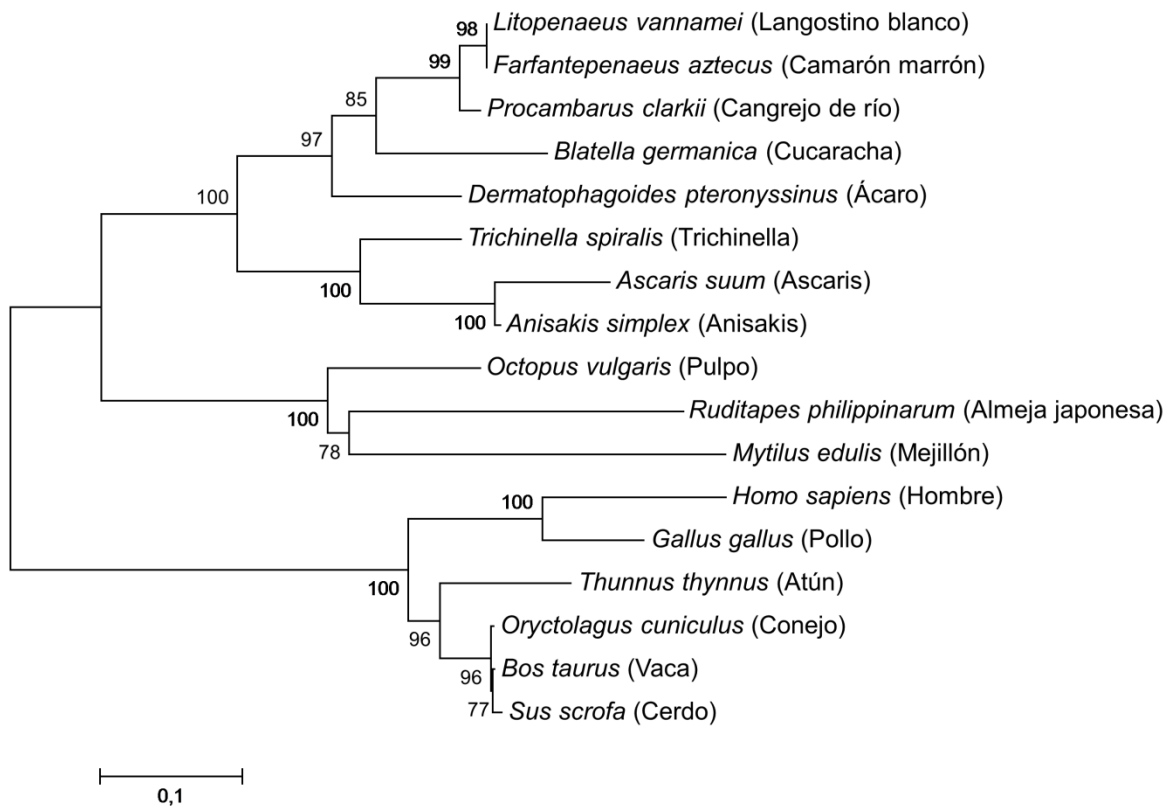


Figura 15. Relaciones evolutivas obtenidas con el método *Maximum Likelihood* comparando 17 tropomiosinas.

4.1.3. Análisis de secuencias

Hasta el momento, las tropomiosinas de vertebrados no son consideradas como alergénicas en humanos, por esta razón las diferencias existentes entre ellas no deberían ser las responsables de la alergenicidad. Esas diferencias se localizan en el último tercio de la molécula, en cambio las de invertebrados son más variables en el primer tercio (Figuras 16 y 17).

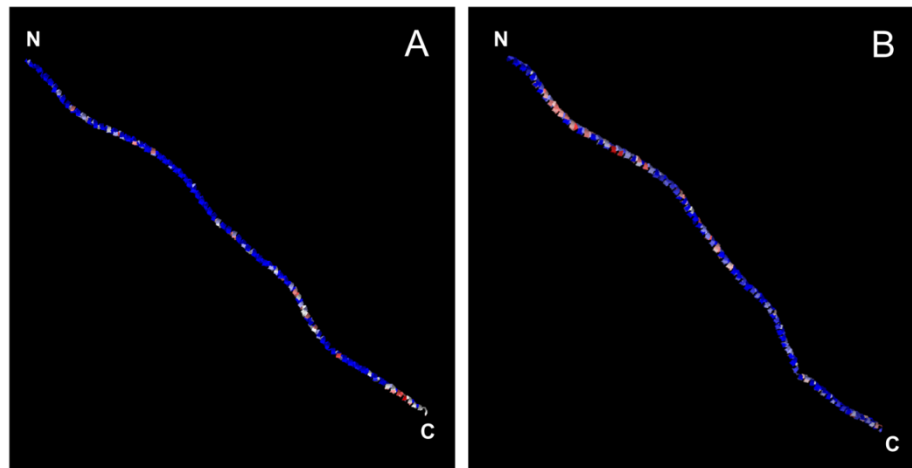


Figura 16. Variabilidad de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados. A: Estructura tridimensional de la tropomiosina de *Sus scrofa* superponiendo el alineamiento de las tropomiosinas de vertebrados. B: Estructura tridimensional de la tropomiosina de *Anisakis simplex* superponiendo el alineamiento de las tropomiosinas de invertebrados. Azul indica conservación. Rojo indica variabilidad.

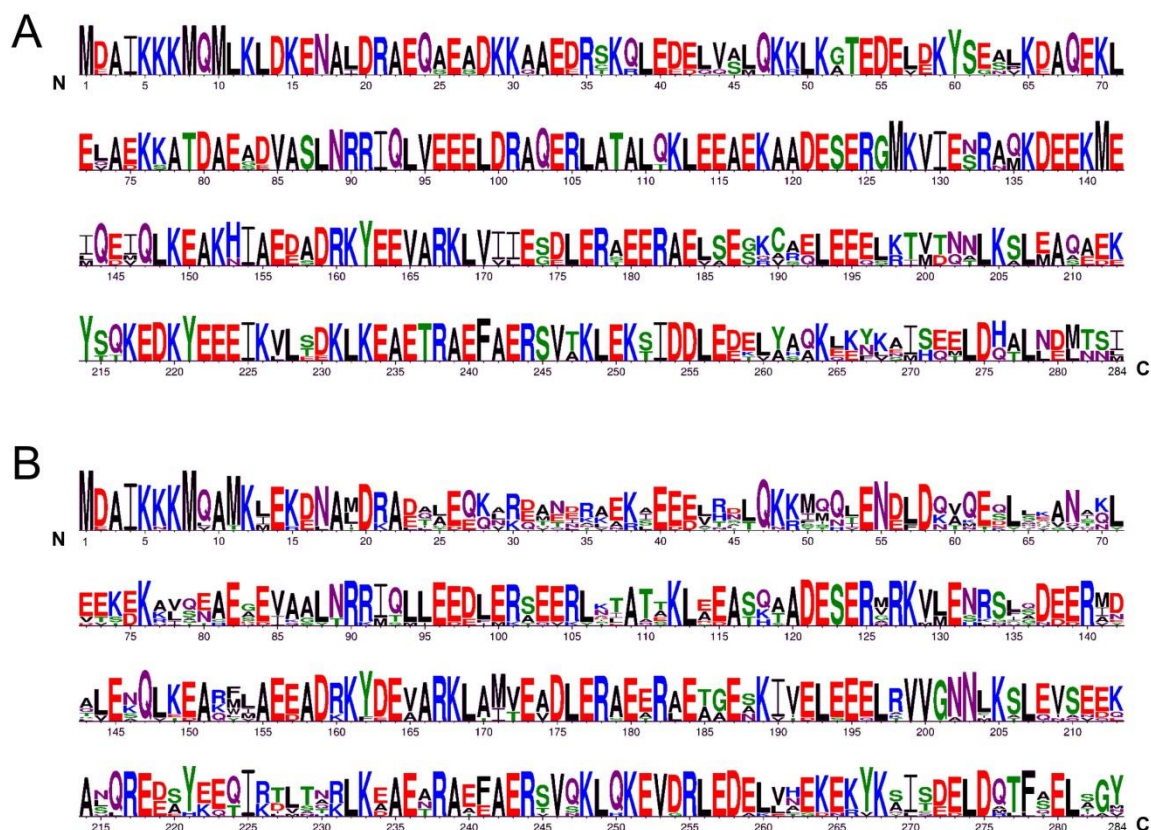


Figura 17. Conservación y variabilidad aminoacídica de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados. Análisis realizado con [WebLogo v3.5.0](https://weblogo.thirdmill.org/). A: Tropomiosinas de vertebrados (N=6). B: Tropomiosinas de invertebrados (N=11).

El siguiente paso fue analizar la variabilidad de secuencia entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados. Comparando las secuencias con GeneDoc (Figuras 18 y 19), se identificaron las posiciones con importantes diferencias aminoacídicas (Tabla 17). También se observaron diferencias significativas en la proporción de los aminoácidos lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F) y asparagina (N) entre los grupos de vertebrados e invertebrados (Figura 20). El porcentaje de lisina (K) fue más alto en las tropomiosinas de vertebrados comparado con el observado en las de invertebrados (13,13% *vs* 9,97%). Los porcentajes de arginina (R) (5,33% *vs* 7,56%), asparagina (N) (2,2% *vs* 4,35%) y fenilalanina (F) (0,45% *vs* 0,95%), fueron significativamente mayores en las tropomiosinas de invertebrados comparados con los de las de vertebrados.

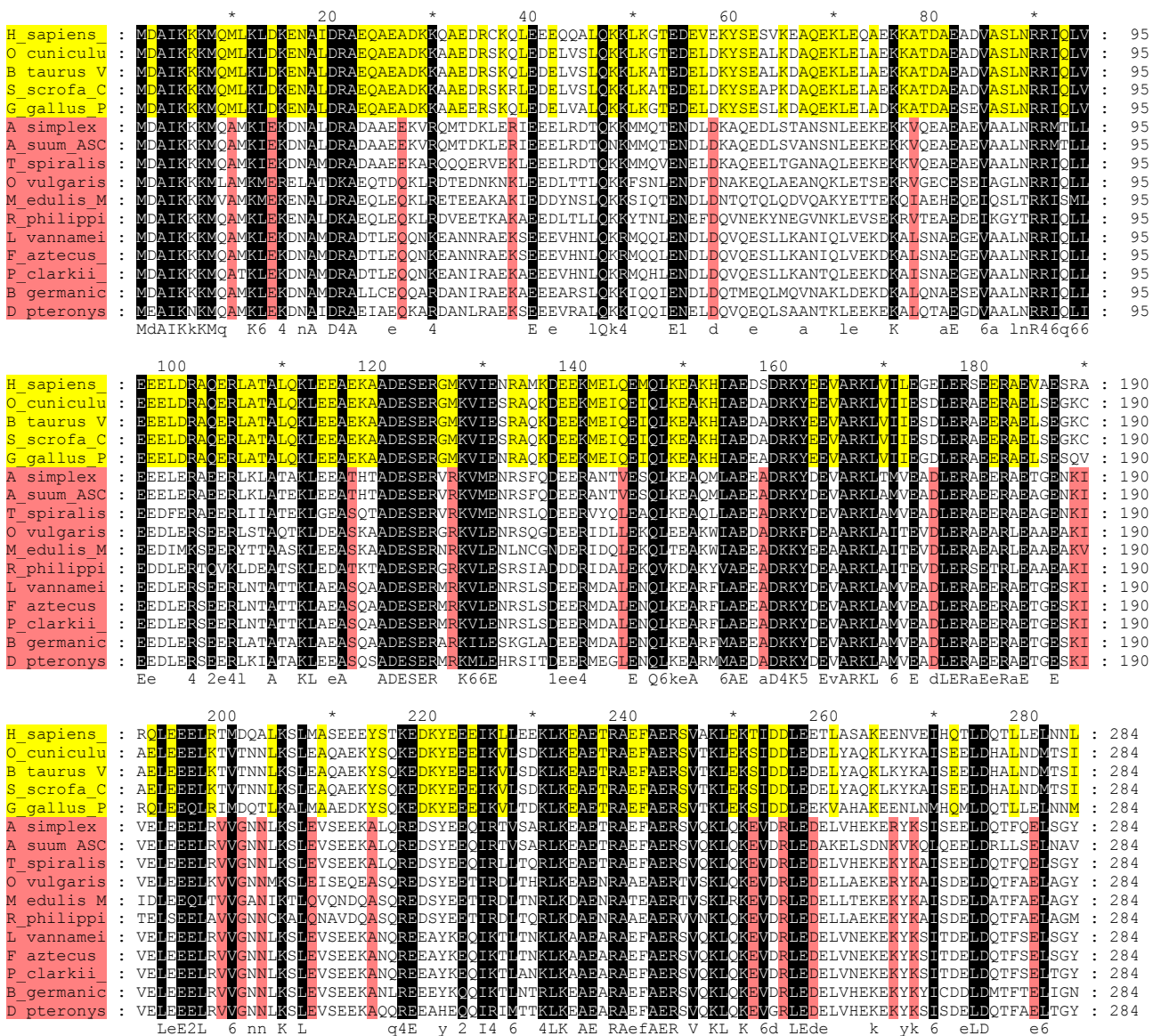


Figura 18. Análisis de las secuencias de tropomiosina por grupos; vertebrados *vs* invertebrados. Se muestran en amarillo (vertebrados), en rojo (invertebrados), en negro aminoácidos conservados en ambos.



Figura 19. Alineamiento de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados. Se muestran las diferencias aminoacídicas más importantes entre los grupos de tropomiosinas de vertebrados (amarillo) y de invertebrados (rojo).

Tabla 17. Diferencias aminoacídicas entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.

Posición	10	60	110	127	144	201	214	255
Vertebrados	Met ^{np}	Tyr ^a	Leu ^{np}	Met ^{np}	Gln ^p	Asp, Thr ^p	Tyr ^a	Asp ^{ac}
Invertebrados	Ala ^{np}	Ala, Val ^{np} , (Thr)	Thr ^p , (Gln, Ala)	Arg ^{ba}	Leu, Val ^{np}	Gly ^{np}	Ala ^{np}	Arg ^{ba}

^a aromático, ^p polar, ^{np} no polar, ^{ac} ácido, ^{ba} básico. Los aminoácidos menos frecuentes se muestran entre paréntesis.

En relación al análisis de estructura secundaria, se calculó en primer lugar el porcentaje de hélice alfa para todas las tropomiosinas. Sorprendentemente, la probabilidad de plegamiento en hélice alfa en las tropomiosinas de invertebrados fue más baja que en todas las tropomiosinas de los vertebrados estudiados exceptuando la del atún (*T. thynnus*) (Figura 21).

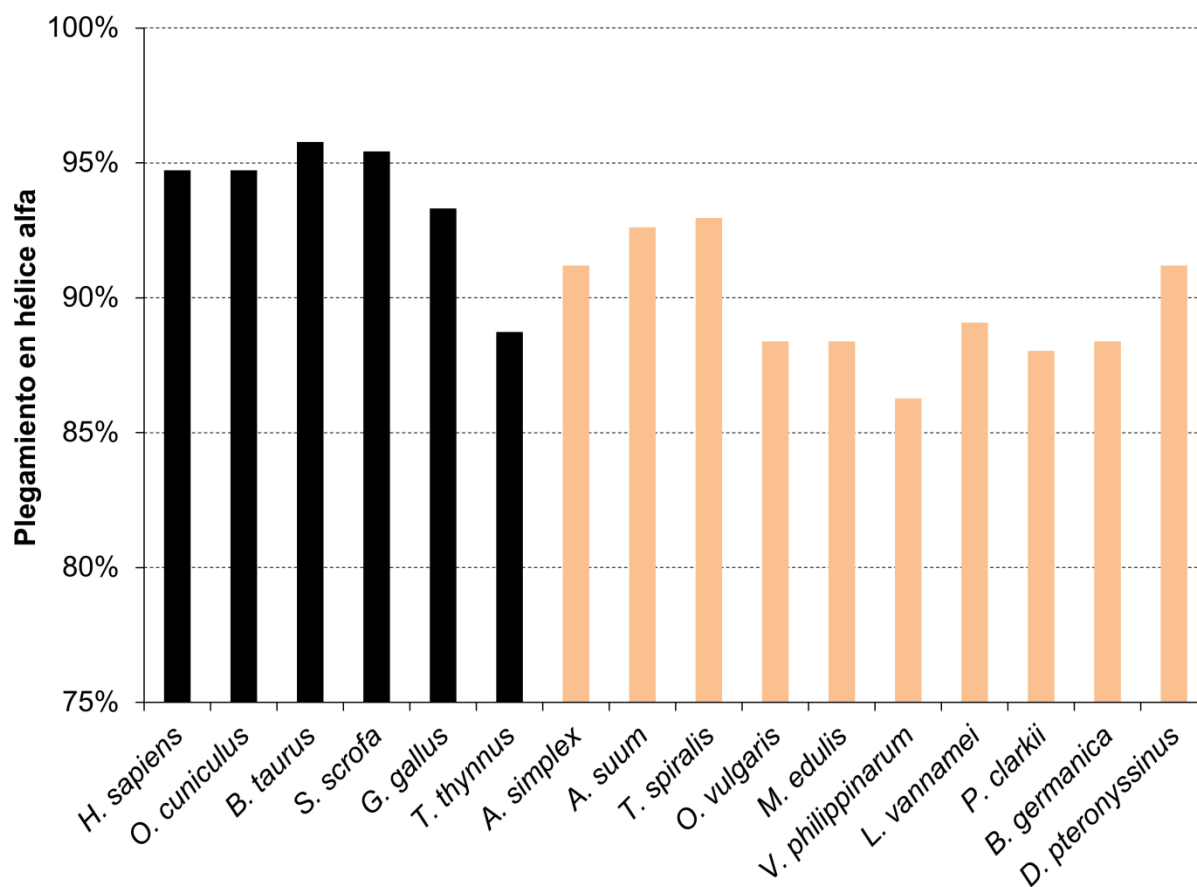


Figura 21. Probabilidad de plegamiento en hélice alfa en las tropomiosinas de vertebrados (negro) e invertebrados (naranja).

Esto sugiere que la falta de plegamiento en hélice alfa está relacionada con la inmunogenicidad de las tropomiosinas; por este motivo, se estudiaron en detalle las probabilidades de plegamiento en hélice alfa de cada residuo aminoacídico en cada tropomiosina empleando predicciones GOR de estructura secundaria (Figura 22).

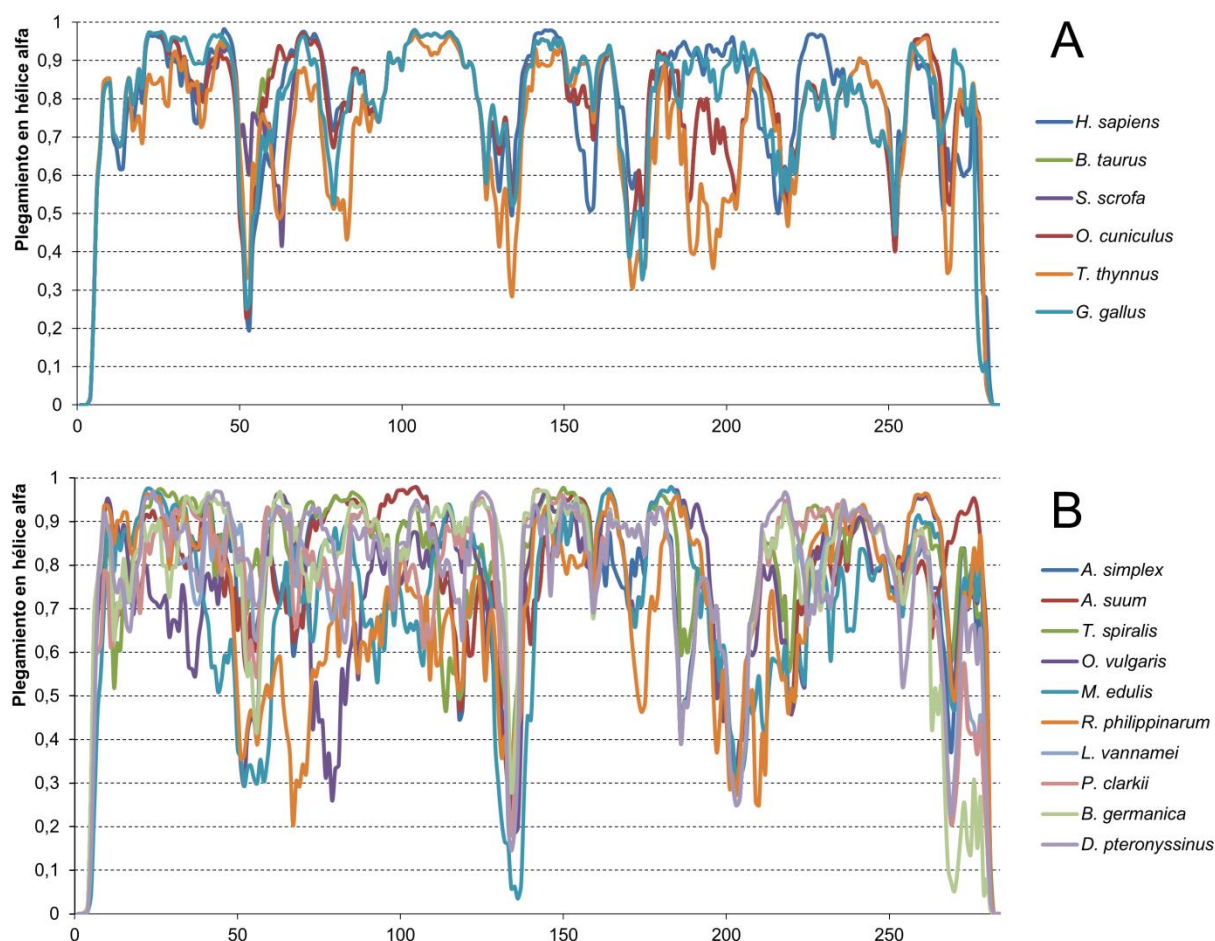


Figura 22. Probabilidad de plegamiento en hélice alfa por posición. A: Vertebrados. **B:** Invertebrados. El eje x representa los 284 aminoácidos de la tropomiosina.

Con respecto a los vertebrados, las posiciones 1-5 y 279-284 (posiciones de los extremos N y C terminales) presentaron una estructura secundaria aperiódica aleatoria junto con hebra extendida. En las posiciones 51-54, la predicción indicó la ausencia de hélice alfa (estructura secundaria aperiódica aleatoria) exceptuando las tropomiosinas de *S. scrofa* y *G. gallus*. Además las posiciones 83, 133-135, 174-175, 189-198, 219 y 268-269 también fueron predichas con ausencia de hélice alfa para *T. thynnus* (Figura 22).

Con respecto a los invertebrados, todas presentaron más del 86% de hélice alfa. Los parásitos *A. simplex*, *A. suum*, *T. spiralis* y el ácaro *D. pteronyssinus* tuvieron un mayor porcentaje de hélice alfa que las tropomiosinas de los demás invertebrados (91,20%, 92,61%, 92,96% y 91,20%, respectivamente) (Figura 20). Las posiciones 1-5 y 279-284 (posiciones de los extremos N y C terminales) también presentaron estructura secundaria aperiódica aleatoria junto con hebra extendida, al igual que sucedió en las siguientes regiones: 133-135 en todas las tropomiosinas, 50-60 en las de *O. vulgaris*, *M. edulis*, *R. philippinarum* (*B. germanica* solo en la posición 56); 118 en las de los parásitos *A. simplex*, *A. suum* y *T. spiralis*; 186-188 en *L. vannamei*, *P. clarkii*, *B. germanica*, *D. pteronyssinus* y *A. simplex*. Ninguno de los invertebrados mencionados anteriormente presentó plegamiento en hélice alfa en la región 201-206 (Figura 21).

4.1.4. Modelos tridimensionales

En primer lugar se realizaron los modelos de las 24 tropomiosinas de las que no había estructura 3D experimental disponible (Figura 23).

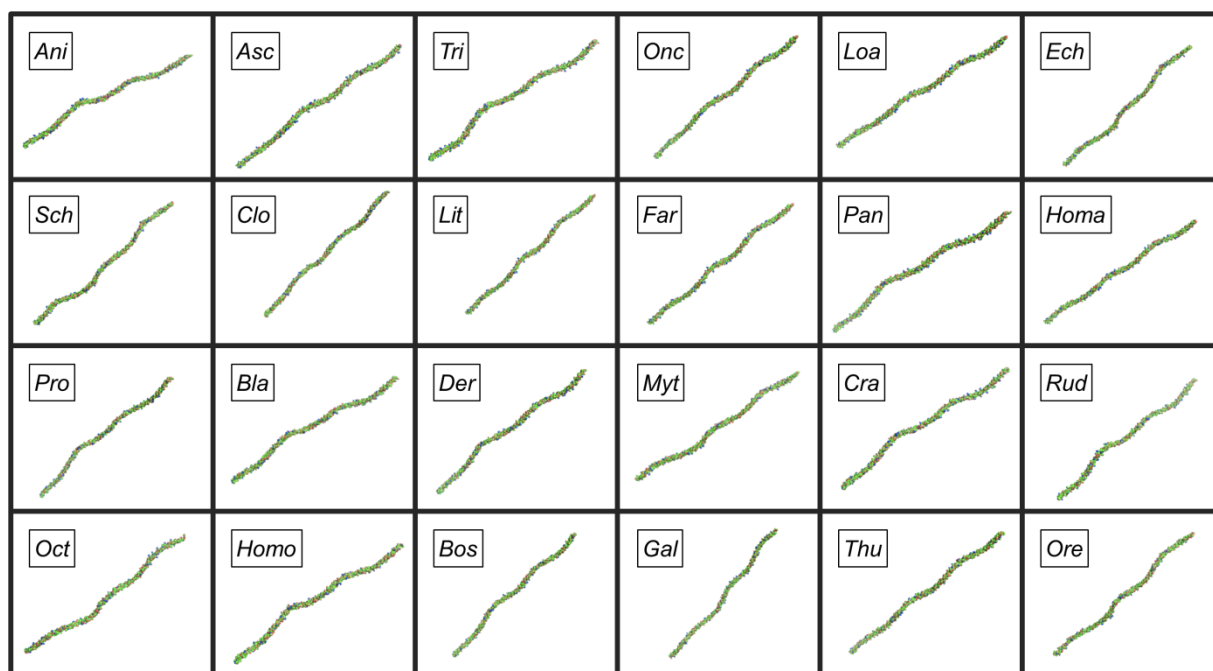


Figura 23. Visualización tridimensional de los modelos de tropomiosina realizados. *Ani: Anisakis, Asc: Ascaris, Tri: Trichinella, Onc: Onchocerca, Loa: Loa, Ech: Echinococcus, Sch: Schistosoma, Clo: Clonorchis, Lit: Litopenaeus, Far: Farfantepenaeus, Pan: Pandalus, Homa: Homarus, Pro: Procambarus, Bla: Blatella, Der: Dermatophagoides, Myt: Mytilus, Cra: Crassostrea, Rud: Ruditapes, Oct: Octopus, Homo: Homo, Bos: Bos, Gal: Gallus, Thu: Thunnus, Ore: Oreochromis.*

A continuación se evaluó la calidad de los modelos obteniéndose los descriptores de cada uno de los modelos de tropomiosina analizados (Tabla 18). Como ejemplo se muestra la tropomiosina de *Anisakis simplex*:

Nombre del modelo:	Ani s 3_from_HHpred.pdb
Energía de interacción C beta	-47,81 (Z-Score: 4,30)
Energía de todos los átomos emparejados	-3317,22 (Z-Score: 7,59)
Energía de solvatación	-17,54 (Z-Score: -1,18)
Energía según ángulo de torsión	-45,15 (Z-Score: -1,87)
Aceptación de estructura secundaria	97,5% (Z-Score: 2,91)
Aceptación de accesibilidad del solvente	68% (Z-Score: -2,28)
Total QMEAN-Score	0,676 (Z-Score: -1,03)

De algunas especies: *A. simplex*, *F. aztecus*, *H. americanus* y *D. pteronyssinus*; ya existían en la base de datos de alérgenos SDAP, estructuras tridimensionales de sus tropomiosinas. Estos modelos se sometieron al mismo proceso de evaluación de calidad con QMEAN. Como se observa en la Tabla 18, la calidad de los modelos existentes (Modelos SDAP) no superó en ningún caso a la de nuestros modelos nuevos (Modelos UCM), motivo por el cual, a partir de ese momento, se utilizaron nuestros modelos para los estudios posteriores.

El valor medio de calidad (QMEAN-Score) calculado, resultó similar para todas nuestras tropomiosinas modeladas y fue de 0,686 con una desviación estándar de 0,02.

Tabla 18. QMEAN-Score de los modelos tridimensionales de las tropomiosinas.

Espece	Nombre común	QMEAN-Score Modelos UCM	QMEAN-Score Modelos SDAP
Vertebrados		M=0,700 SD=0,007	
<i>Bos Taurus</i>	Vaca	0,701	
<i>Homo sapiens</i>	Hombre	0,697	
<i>Gallus gallus</i>	Pollo	0,698	
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia mozambiqueña	0,708	
<i>Thunnus thynnus</i>	Atún del Atlántico	0,689	
Invertebrados no parásitos		M=0,687 SD=0,014	
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra del pacífico	0,682	
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Almeja japonesa	0,672	
<i>Mytilus edulis</i>	Mejillón	0,695	
<i>Octopus vulgaris</i>	Pulpo	0,670	
<i>Pandalus borealis</i>	Camarón nórdico	0,684	
<i>Homarus americanus</i>	Bogavante	0,676	0,651
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	Camarón marrón	0,699	0,653
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Langostino blanco	0,699	
<i>Procambarus clarkii</i>	Cangrejo de río	0,670	
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Ácaro del polvo	0,705	0,656
<i>Blatella germanica</i>	Cucaracha	0,704	
Parásitos		M=0,673 SD=0,027	
<i>Anisakis simplex</i> L3	Anisakis	0,645	0,645
<i>Ascaris suum</i> adultos	Ascaris	0,699	
<i>Onchocerca volvulus</i>	Oncocerca	0,668	
<i>Loa loa</i>	Loa	0,699	
<i>Trichinella spiralis</i> L1	Triquina	0,705	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Tenia del zorro	0,636	
<i>Clonorchis sinensis</i>	Duela hepática china	0,652	
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosoma	0,679	
Invertebrados no parásitos+Parásitos		M=0,681 SD=0,021	

Modelos UCM: Tropomiosinas modeladas en esta tesis. Modelos SDAP: modelos existentes en SDAP (*Structural Database of Allergenic Proteins*). M: Media aritmética. SD: Desviación estándar.

4.1.5. Predicción de epitopos

Se obtuvo el *Discotope Score* para cada uno de los 284 aminoácidos que constituyen cada tropomiosina analizada. En la Figura 24 se muestran los perfiles de *Discotope Score* de la tropomiosina de un representante de los vertebrados (*Sus scrofa*), escogido porque de él disponemos de una estructura tridimensional no modelada; de *Litopenaeus vannamei*, escogido como representante de los invertebrados

y sobre el que disponemos de los estudios de epitopos más recientes en tropomiosina (Ayuso *et al.*, 2010) y por último el perfil de la tropomiosina de *A. simplex*, objeto de estudio en esta tesis.

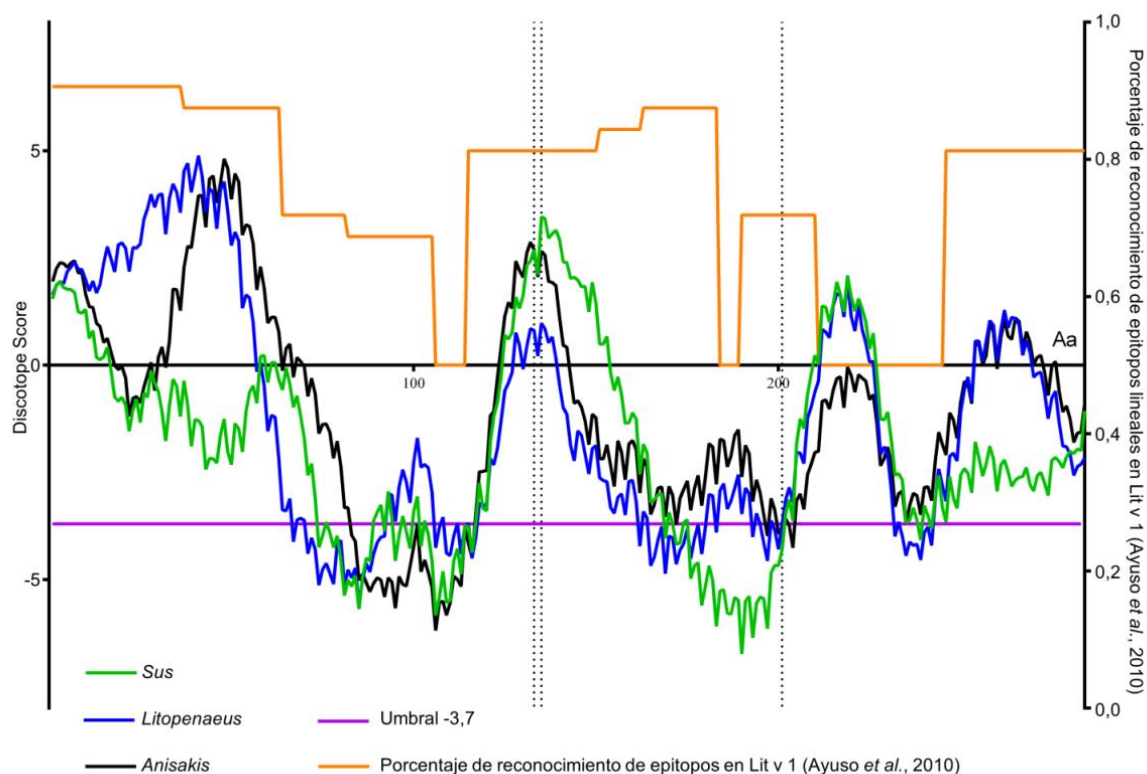


Figura 24. Representación de los valores de *Discotope Score* de las tropomiosinas de langostino blanco (Lit v 1) (*Litopenaeus vannamei*), cerdo (*Sus scrofa*) y *Anisakis simplex* y su comparativa con el nivel umbral de predicción (*Discotope Score*=-3,7) y con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1 (Ayuso *et al.*, 2010). Aa: aminoácidos (leyenda del eje x). Líneas discontinuas en las posiciones 133, 135 y 201 correspondientes con los dos valles de baja probabilidad de plegamiento en hélice alfa obtenidos tras el análisis de secuencias previo.

Debido al elevado número de tropomiosinas y por tanto de gráficas superpuestas, decidimos realizar el estudio de las medias de esos valores de *Discotope Score* agrupándolos en vertebrados, invertebrados no parásitos y parásitos (Figura 25). Las mayores desviaciones estándar en los valores de *Discotope Score* se produjeron en el último tercio de la molécula en tropomiosinas de vertebrados mientras que en invertebrados se encontraron en el primer tercio de la molécula.

Los valores medios de *Discotope Score* en las tropomiosinas de vertebrados, invertebrados no parásitos y parásitos fueron -1,676, -1,372, -1,403 respectivamente; siendo el grupo de los parásitos el que presentó unos *Discotope Score* intermedios entre vertebrados e invertebrados. Los datos atendieron a una distribución normal $P < 0,001$ según el test de Kolmogorov-Smirnov. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,001$) según el test de la *t* de Student.

En particular, se observó la existencia de un epitopo en torno a la posición 40 con un *Discotope Score* menor en las de los vertebrados. En el epitopo central, en torno a las posiciones 133-135 (dos líneas discontinuas), los *Discotope Score* de las tropomiosinas de vertebrados fueron mayores que en los invertebrados. Finalmente, en el extremo C-terminal, los *Discotope Score* fueron menores en las de vertebrados como puede observarse en la Figura 25.

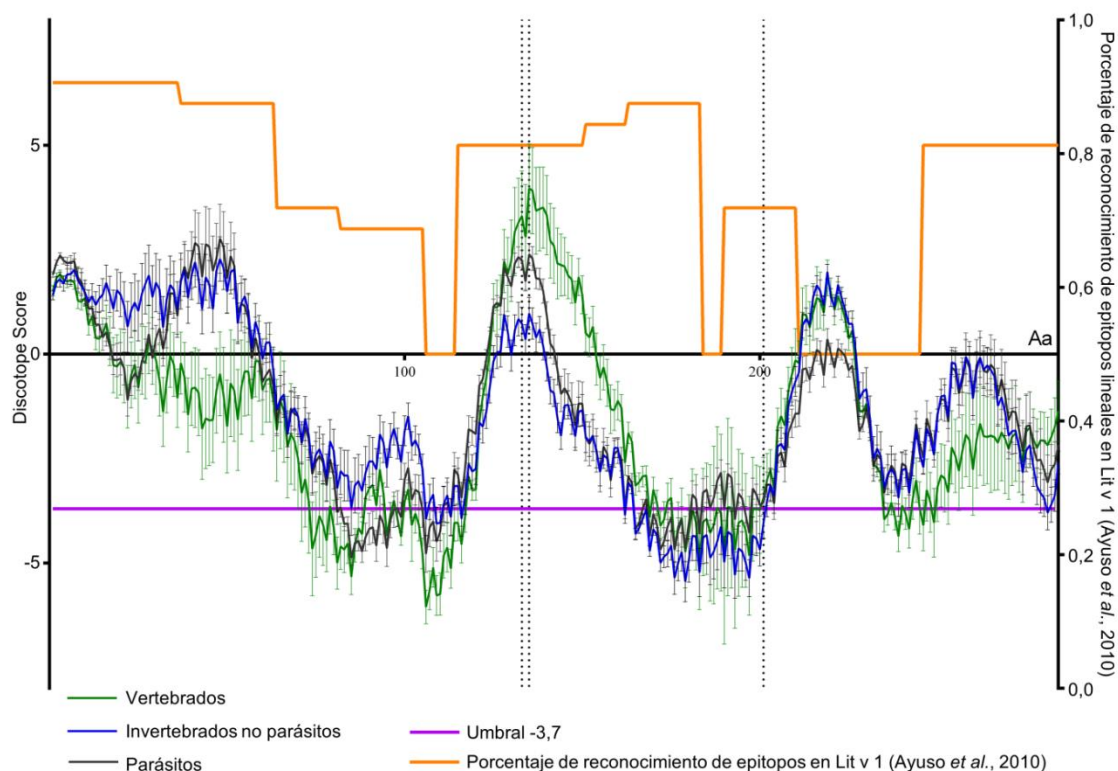


Figura 25. Representación de los valores medios de *Discotope Score* de las tropomiosinas de vertebrados, parásitos e invertebrados no parásitos; así como su comparativa con el nivel umbral de predicción (*Discotope Score*=-3,7) y con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1 (Ayuso *et al.*, 2010). Las barras de error muestran la desviación estándar. Aa: aminoácidos (leyenda del eje x). Líneas discontinuas en las posiciones 133, 135 y 201 correspondientes con los dos valles de baja probabilidad de plegamiento en hélice alfa obtenidos tras el análisis de secuencias previo.

4.1.6. Dendrogramas de similitud estructural

Tras la obtención de los vectores de 121 coordenadas que representan la estructura de cada una de las tropomiosinas, se realizaron los cálculos de las distancias euclidianas entre los vectores generados a partir de los modelos de tropomiosinas enteras y fragmentadas en tres segmentos para un estudio en detalle de las regiones predichas previamente como posibles epitopos mediante *Discotope 2.0*.

Estas regiones analizadas fueron:

-1^a región: desde el aminoácido 25 al 105. Este último, es el aminoácido donde se hace cero la probabilidad experimental obtenida por Ayuso *et al.*, (2010) y coincide con uno de los descensos de *Discotope Score* de nuestra predicción anterior.

-2^a región: 115-183

-3^a región: 195-270

Obtuvimos los árboles que agrupaban aquellas tropomiosinas/fragmentos más parecidos pero no a nivel de secuencia, sino a nivel tridimensional (Figuras 26 y 27).

El árbol que compara la similitud estructural de las tropomiosinas enteras (Figura 26) mostró la proximidad de las tropomiosinas de *L. vannamei* y *F. aztecus* que nos sirvieron como control ya que

poseen la misma secuencia, por lo que sus modelos fueron idénticos. La tropomiosina de *A. simplex* presentó una estructura general similar a la de los helmintos parásitos *Schistosoma mansoni* y *Trichinella spiralis*. La tropomiosina de *A. suum* es similar en la totalidad de su estructura a la de *Homo sapiens*, pero no lo es a la de su también posible hospedador definitivo *S. scrofa*.

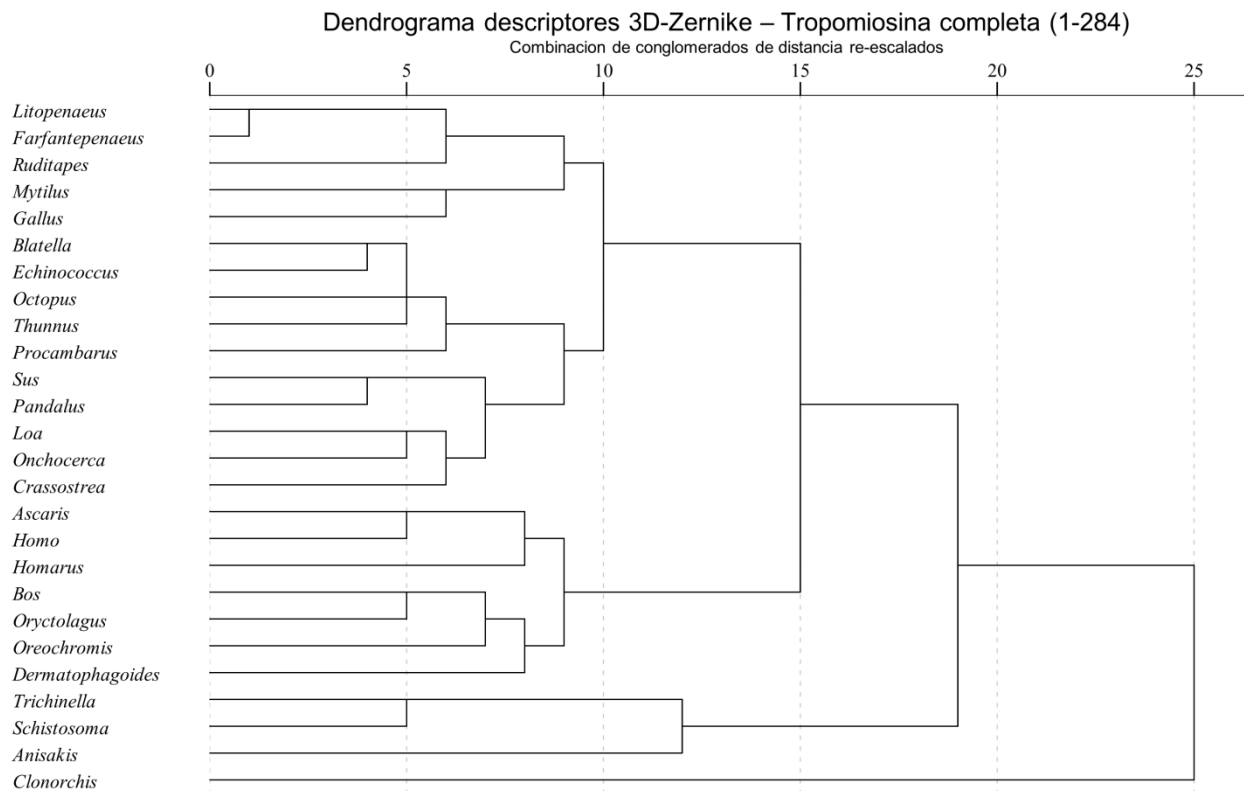


Figura 26. Dendrograma estructural de las tropomiosinas completas de todas las especies analizadas.

El análisis por fragmentos se realizó para evitar que tropomiosinas que poseen solamente una región muy diferente y que en general son prácticamente idénticas sean agrupadas como similares desde el punto de vista de las reacciones cruzadas. Para este análisis se seleccionaron las tropomiosinas de vertebrados con estructura experimental (cerdo y conejo) junto con el modelo de la tropomiosina humana. También se escogieron las tropomiosinas de *L. vannamei* y *F. aztecus* como control y otras de organismos que frecuentemente producen reacciones cruzadas con *Anisakis* spp.

Por ello, nos centramos en la 2ª región (115 a 183) ya que nuestra predicción (perfil de *Discotope Score*) coincidía con los epitopos experimentales de Ayuso *et al.*, (2010) y con las posiciones 133-135 candidatas a generar alergenicidad descritas previamente en el análisis de estructura secundaria (Figura 25). Se observó que este epitopo era similar en la tropomiosina de *A. simplex* y en la de *A. suum*. En las gambas y langostinos (*F. aztecus*, *Pandalus borealis* y *L. vannamei*) este epitopo central fue similar al de la tropomiosina de *A. simplex*. Por otro lado, el cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), el ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y la cucaracha (*Blatella germanica*) se situaron en el siguiente nivel siendo los más diferentes los de la tropomiosina del bogavante (*H. americanus*), la humana (*H. sapiens*), la del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y por último la del cerdo (*S. scrofa*) (Figura 27).

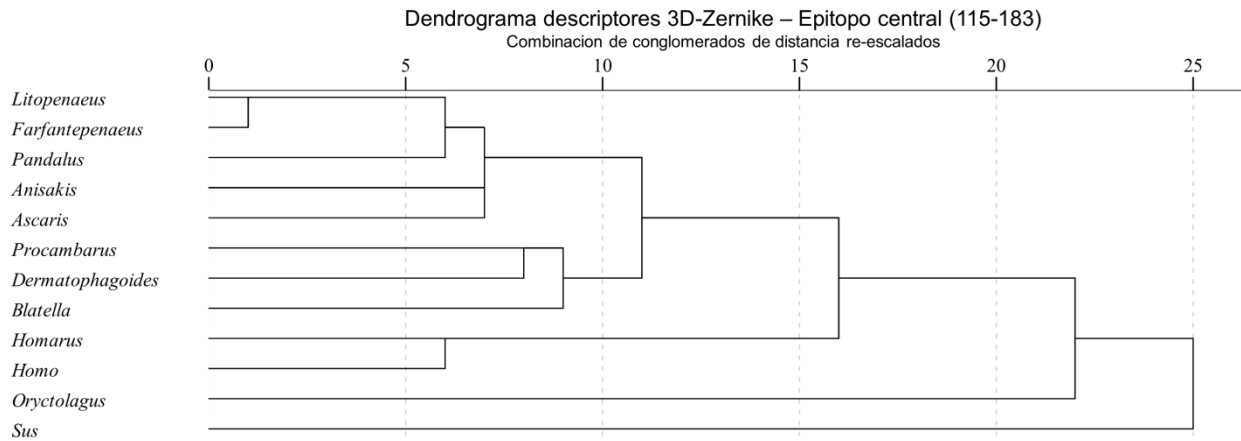


Figura 27. Dendrograma estructural del epitopo central de la tropomiosina (posiciones 115-183) de las principales especies que provocan fenómenos de reacción cruzada en el diagnóstico de *Anisakis*.

4.1.7. Digestión enzimática

Realizando la digestión enzimática *in silico* de las tropomiosinas pudimos comprobar que las tropomiosinas de invertebrados no parásitos y parásitos poseen un mayor número de fragmentos mayores a siete aminoácidos con respecto a las de los vertebrados, los cuales podrían ser procesados por las células del sistema inmune y activar una respuesta alérgica.

Tampoco se observó gran diferencia en el número de fragmentos de las tropomiosinas de los distintos nematodos estudiados, los cuales son interesantes ya que en alguna fase de su ciclo pasan por el intestino. Lo que si se observó fue la falta de péptidos largos en las tropomiosinas de invertebrados en la región próxima al extremo N-terminal. También existe una completa degradación de la región C-terminal en todas las tropomiosinas analizadas menos la humana (Figura 28).

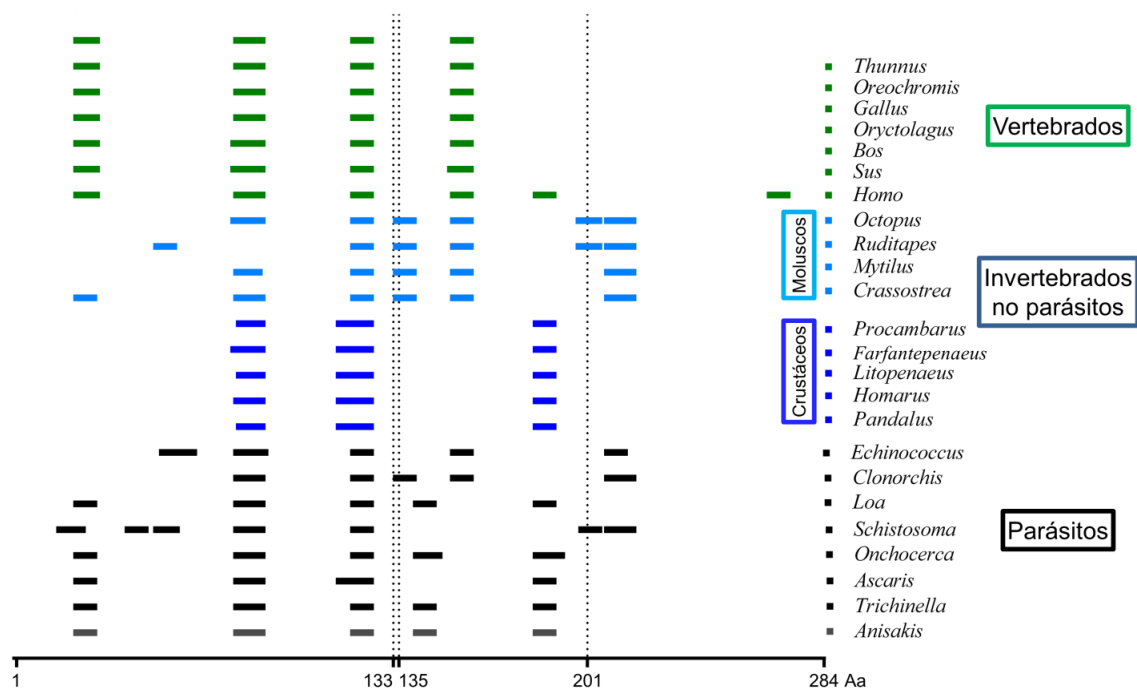


Figura 28. Posición relativa de los fragmentos generados de más de siete aminoácidos tras la digestión enzimática *in silico* de las tropomiosinas. Aa: aminoácidos.

4.1.8. Análisis de motivos LExxL y LExxN

Los motivos LExxL son más numerosos que los motivos LExxN en las tropomiosinas analizadas. Existen motivos LExxL conservados en prácticamente todas las tropomiosinas en las posiciones 193-197 y 256-260. Los motivos LExxL en las posiciones 95-99 y 144-148 solo se encuentran en invertebrados, esto mismo sucede con el motivo LExxN de la posición 13 a 17 del extremo N-terminal. No aparecen motivos LExxN en tropomiosinas de vertebrados a excepción de los existentes en las posiciones 279-283 del extremo C-terminal de las tropomiosinas de *H. sapiens* y *G. gallus* (Figura 29).

4.1.9. Predicción de glicosilaciones y fosforilaciones

Atendiendo a los resultados observados anteriormente en el análisis *in silico* de estructura secundaria, nos centramos en las regiones adyacentes a los residuos 133-135 y 201 para observar las diferencias entre las tropomiosinas de vertebrados *vs* invertebrados. Los sitios de N-glicosilación aparecieron en las asparaginas de las posiciones 133 y 135 en la mayoría de las tropomiosinas de invertebrados excepto en las de *Blatella*, *Dermatophagoides*, *Ruditapes*, *Mytilus*, *Clonorchis* y *Echinococcus*. *Onchocerca* y *Loa* presentaron la posición 132 como candidata de N-glicosilación. Esta modificación postraduccional no se predijo en ninguna de las tropomiosinas de vertebrados. Únicamente en vertebrados se predijeron N-glicosilaciones en las posiciones 136 y 140, mientras careció de N-glicosilación la posición 128, tanto en invertebrados como en parásitos.

Del mismo modo se observaron frecuentes sitios de O-glicosilación en las regiones adyacentes a los residuos 133-135 en todas las tropomiosinas. Sin embargo, cabe destacar que en la posición 141 existe una O-glicosilación única en el grupo de invertebrados, al igual que ocurre en la posición 201 de vertebrados. En líneas generales, se observaron abundantes sitios de fosforilación genéricos, aunque existe una mayor frecuencia en esta región de la molécula (Figura 30).

4.1.10. Distribución de aminoácidos cargados

Analizando los residuos de aspártico (D), glutámico (E), arginina (R) y lisina (K), el porcentaje medio de aminoácidos con carga negativa (aspártico+glutámico) en todas las tropomiosinas analizadas fue de 27,11% con una desviación estándar de 1,14% y el de aminoácidos con carga positiva (arginina+lisina) fue de 17,59% una desviación estándar de 0,77%. Se observó que en general no existían diferencias entre las tropomiosinas de los distintos organismos. En el alineamiento de todas las tropomiosinas, se observó que en las regiones en las que existía una mayor probabilidad de ser epítopos predichas anteriormente no hubo diferencias observables en la distribución de aminoácidos cargados entre los grupos de vertebrados *vs* invertebrados.

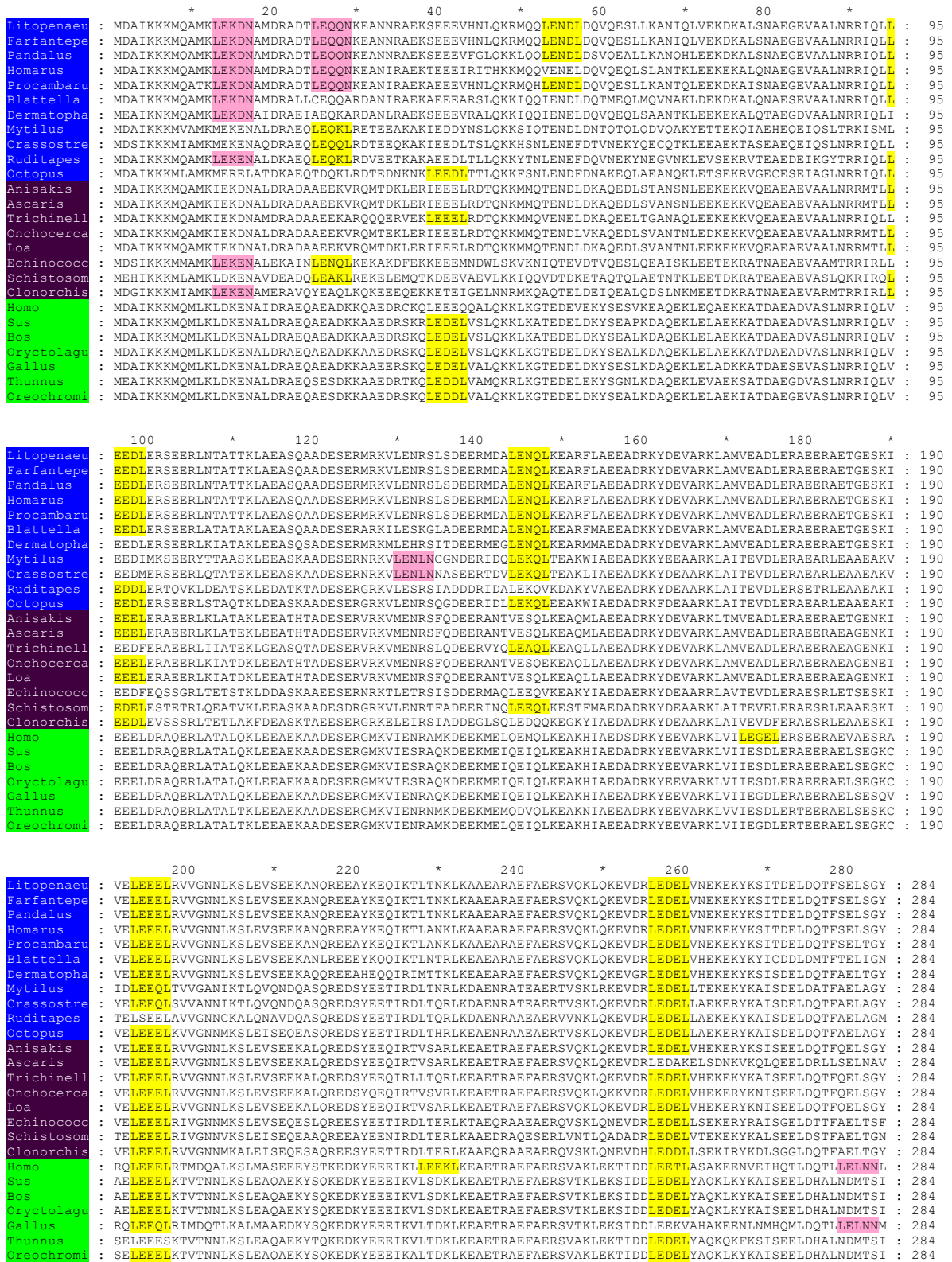


Figura 29. Alineamiento de las tropomiosinas con los motivos identificados en los epitopos de unión a IgE de pacientes alérgicos al langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Ayuso et al., 2010). LExxL resaltado en amarillo, LExxN resaltado en rosa. “x” cualquier otro aminoácido.

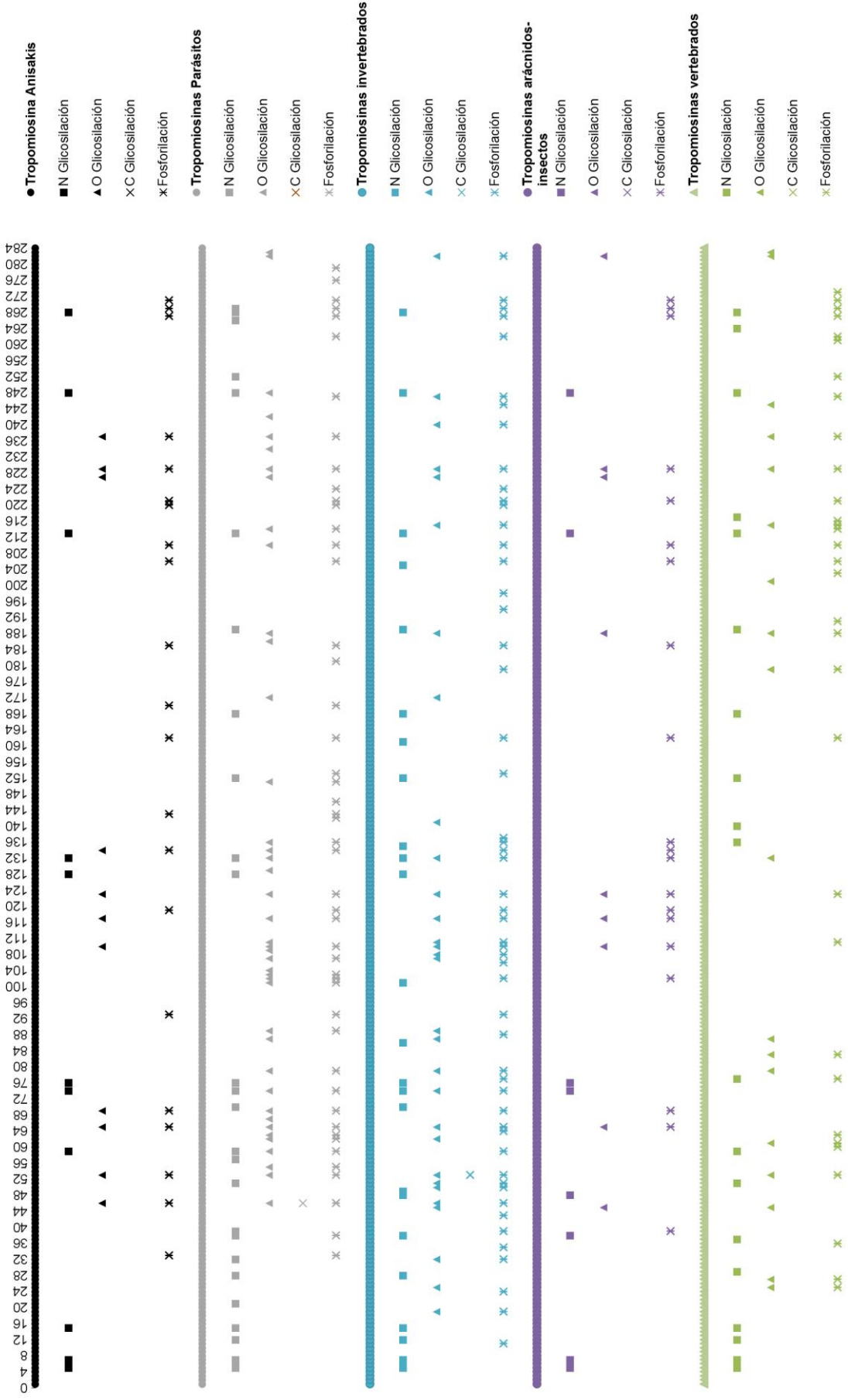


Figura 30. Esquema de modificaciones postraduccionales (glicosilaciones y fosforilaciones) y su posición relativa en las moléculas de tropomiosina de los grupos estudiados (parásitos, invertebrados no parásitos, vertebrados) en comparación con *Anisakis simplex*.

4.2. Niveles de diamino-oxidasa y urticaria crónica

4.2.1. Resumen

La diamino-oxidasa (DAO) es una enzima que degrada poliaminas y que también se encarga del metabolismo de la histamina. La urticaria crónica es una enfermedad con un amplio espectro de presentaciones clínicas y causas entre las que se encuentra la parasitación por *Anisakis simplex*, la cual origina un fenotipo clínico denominado urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+). En este capítulo de la presente tesis se analizaron los niveles de DAO en suero de pacientes con diferentes fenotipos de urticaria crónica y se estudió su relación con la ingesta de pescado.

Se estudiaron 35 pacientes con UC+ y 39 pacientes con urticaria crónica pero no sensibilizados a *Anisakis* (UC-), empleando 19 sujetos sanos como controles en los que no se había detectado historia de urticaria, ni reacciones adversas asociadas al consumo de pescado, ni sensibilización a *Anisakis*. En todos los individuos se analizó la frecuencia de ingesta de pescado al igual que la exacerbación de la urticaria crónica asociada con la ingesta de pescado (*Fish Intake Associated Exacerbation* – FIAE) o la aparición de molestias gastrointestinales (GI) en el grupo de pacientes observados. Los niveles de DAO sérica se analizaron además con respecto a las respuestas linfoproliferativas, niveles de citoquinas y producción de IgE específica.

Los niveles de DAO no se diferenciaron entre los pacientes con urticaria crónica y los controles pero fueron significativamente más elevados en los pacientes UC+ al compararlos con los UC-. Los pacientes UC+ con FIAE tuvieron niveles más bajos de DAO que los pacientes con GI. Los niveles de DAO se correlacionaron positivamente con el consumo de pescado azul y enlatado dentro del grupo de pacientes con UC-. En los pacientes UC+, los niveles de DAO se correlacionaron positivamente con: los niveles de IgE específica frente a *Anisakis*, los porcentajes de proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con *Anisakis*, la IL-2 y la IL-6, pero se correlacionaron negativamente con los niveles de TGF- β en sobrenadantes de cultivos de los linfocitos estimulados con Concanavalina A.

Como conclusión, los niveles de DAO en la urticaria crónica dependen de los hábitos de consumo de pescado y, concretamente, en la UC+ dependen de la producción de IgE específica. Además, en estos pacientes UC+, la presencia de niveles bajos de DAO les predisponen a una exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado, probablemente debido a una insuficiente disponibilidad de esta enzima en el intestino.

4.2.2. Datos clínicos

La media de edad fue de 41,4 \pm 16,3 años en los UC-, 55,3 \pm 12,2 años en los UC+ y 40,2 \pm 10,4 años en los sujetos del grupo control.

El *Urticaria Activity Score* (UAS) (ver apartado [3.1.7.](#) de Material y Métodos), fue de 3,9 \pm 1,4 en los UC- y de 3,5 \pm 1,4 en los UC+ no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto al sexo, el 72,2% de los pacientes eran mujeres en el grupo UC- y el 81,8% en el UC+ aunque no se observaron diferencias en los niveles de DAO entre sexos (mediana 30,5 U/ml; rango

intercuartil 23,4-41,0 U/ml en mujeres y mediana 33,5 U/ml; rango intercuartil 19,2-45,5 U/ml en hombres).

Diecisiete pacientes presentaron una exacerbación de su urticaria tras ingerir pescado (FIAE) (cinco del grupo UC- y 12 del UC+) mientras que en 10 pacientes no se observó un empeoramiento de su urticaria tras la ingesta de pescado (cuatro del grupo UC- y seis del UC+).

Por otro lado, 10 pacientes refirieron síntomas gastrointestinales (GI) tras la ingesta de pescado (cuatro del grupo UC- y seis del UC+) y 26 no tuvieron molestias gastrointestinales asociadas a la ingesta de pescado (nueve del grupo UC- y 17 del UC+).

Los pacientes tampoco asociaron los síntomas gastrointestinales ni los urticariales con la ingesta de otros alimentos ricos en histamina como chocolate, queso curado, vino tinto o fresas.

4.2.3. Niveles de diamino-oxidasa sérica

En general, los niveles de DAO no se diferenciaron entre los pacientes con urticaria crónica y los controles (mediana 28,1 U/ml; rango intercuartil 22,4-52,4 U/ml), pero fueron significativamente más elevados en los pacientes UC+ (mediana 35,3 U/ml; rango intercuartil 28,4-49,2 U/ml) que en los UC- (mediana 24,8 U/ml; rango intercuartil 17,5-32,3 U/ml) ($P=0,001$) (Figura 31).

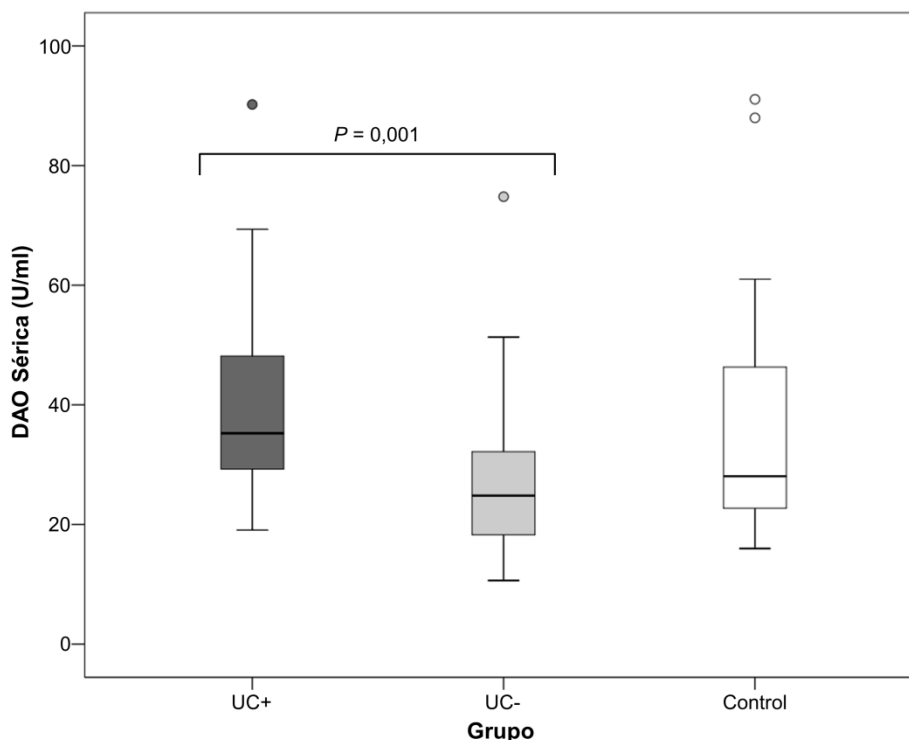


Figura 31. Medianas y rangos intercuantiles de los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en pacientes con urticaria crónica y controles. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*.

Los pacientes con FIAE tuvieron niveles de DAO sérica menores que los pacientes sin FIAE, pero cuando realizamos la comparación considerando los subgrupos, esta afirmación fue solo verdadera para los pacientes UC+ (mediana 31,8 U/ml; rango intercuartil 23,3-35,7 U/ml los UC+ con FIAE vs mediana 43,8 U/ml; rango intercuartil 37,2-56,5 U/ml los UC+ sin FIAE) ($P=0,01$) (Figura 32). Se observa que, en la UC+, los niveles de DAO sérica son más bajos en los pacientes con FIAE.

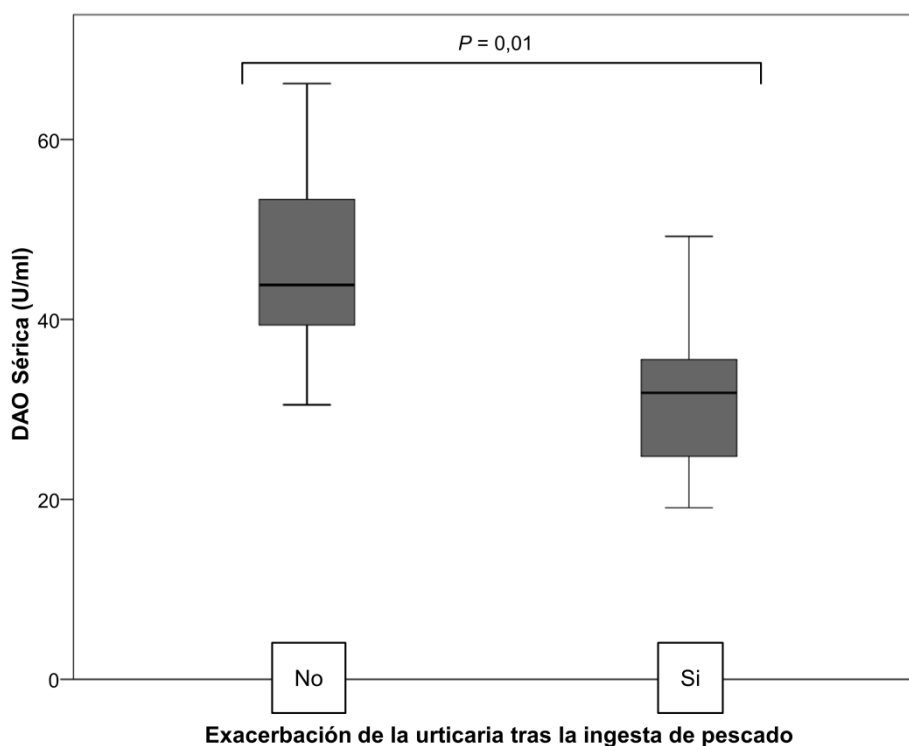


Figura 32. Medianas y rangos intercuartiles de los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica vs exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado (FIAE) en pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+).

No hubo diferencias en la mediana de los niveles de DAO en los pacientes con o sin GI. Del mismo modo, el UAS y el número de dosis de antihistamínicos necesarias para aliviar los síntomas de la urticaria no difirió entre los grupos estudiados no estando estos parámetros asociados con la DAO.

Los niveles de DAO se correlacionaron positivamente con la ingesta de pescado azul ($Rho=0,39$; $P=0,05$) y pescado enlatado ($Rho=0,54$; $P=0,005$) en los pacientes UC- pero no en los UC+.

Asimismo, se estudió la relación entre los niveles de IgE específica frente al antígeno de *Anisakis* previamente medidos por ImmunoCAP[®] en los pacientes UC+ con los niveles de DAO sérica (Figura 33). Los pacientes del grupo UC+ mostraron correlación en sus niveles de DAO con sus niveles de IgE específica frente a *Anisakis* ($Rho=0,46$; $P<0,001$).

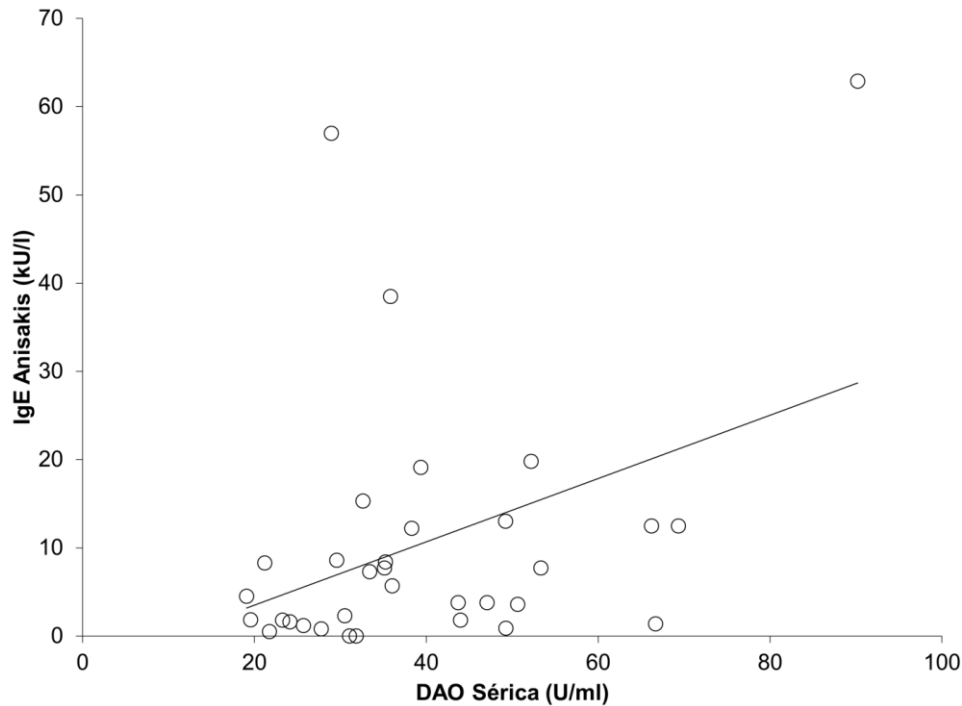


Figura 33. Correlación entre los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica e IgE específica frente *Anisakis* medida mediante ImmunoCAP® en 35 pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+).

Los porcentajes de linfoproliferación inducida mediante la estimulación *in vitro* con el extracto de *Anisakis* correlacionaron positivamente con los niveles de DAO en los pacientes del grupo UC+ (Rho=0,96; P=0,001) (Figura 34A).

A

B

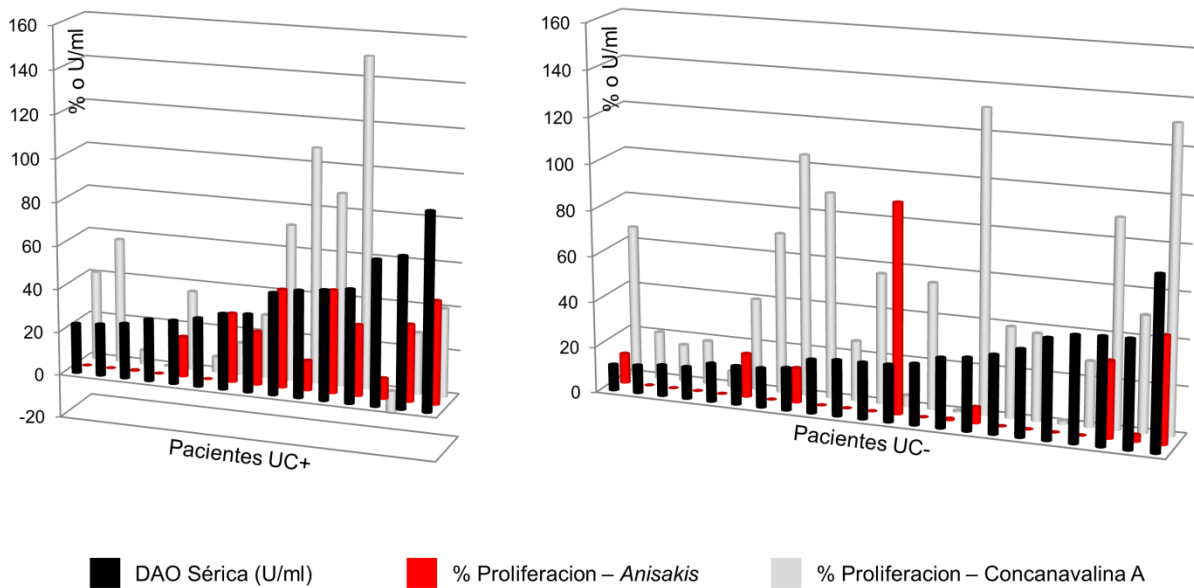


Figura 34. Porcentajes de linfoproliferación inducida mediante estimulación *in vitro* con extracto de *Anisakis* y con Concanavalina A junto con los niveles de diamino-oxidasa (U/ml) por paciente. A: Grupo de pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+) (N=15). B: Grupo de pacientes con urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) (N=22).

Se determinaron los niveles de citoquinas en 40 pacientes con urticaria crónica (23 UC-, 17 UC+) (Tabla 19).

Tabla 19. Citoquinas (mediana y rango intercuartil) en suero y en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimulados con Concanavalina A (Con A) o extracto de *Anisakis*. Valores en pg/ml.

	IL-2*	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-17	TGF- β
Suero	106 (25-298)	0,0 (0,0-1,5)	315 (42-1693)	4,0 (0,6-42,4)	0,1 (0,0-6,1)	8,1 (0,0-112,0)	0 (0-13)	5191 (2172-6846)
Con A	20,6 (5,2-278,0)	2,0 (0,4-8,3)	13547 (4997-20049)	258 (141-542)	111 (34-439)	1470 (303-4417)	392 (140-865)	519 (203-741)
<i>Anisakis</i>	39,7 (3,1-39,7)	0,0 (0,0-0,6)	308,4 (42,4-1389,0)	2,4 (0,7-9,1)	0,03 (0,01-1,8)	2,2 (0,2-10,4)	3,7 (0,0-12,2)	350,1 (196-604)

*Con respecto a aquellas citoquinas asociadas significativamente con la DAO, solo la IL-2 sérica difirió entre los pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+) y sin sensibilización (UC-) con valores más elevados en UC+ (mediana 191 pg/ml; rango intercuartil 58-466 pg/ml) que en UC- (mediana 42 pg/ml, rango intercuartil 2,2-224 pg/ml) ($P<0,03$).

La IL-2 y la IL-6 séricas se correlacionaron de forma significativa con los niveles de DAO en pacientes UC+ ($Rho=0,57$; $P=0,03$) y ($Rho=0,57$; $P=0,03$), respectivamente; no observándose correlación en pacientes UC-.

La producción de TGF- β inducida por estimulación *in vitro* con Con A se correlacionó negativamente con la DAO en los pacientes del grupo UC+ ($Rho=-0,51$, $P=0,04$).

Se realizó un modelo de regresión lineal para los niveles de DAO sérica en pacientes del grupo UC+ introduciendo aquellas variables que se correlacionaron significativamente ($P<0,05$): IL-2 e IL-6 séricas, producción de TGF- β tras estimulación con Con A, linfoproliferación inducida por *Anisakis* e IgE específica frente a *Anisakis*. En este modelo la IL-2 ($B=2,9$; $P=0,016$) y la IL-6 ($B=2,3$; $P=0,047$) séricas explicaron de forma independiente los niveles de DAO, es decir, por cada incremento de la IL-2 y la IL-6 en una unidad, la DAO se incrementa en 2,9 y 2,3 unidades, respectivamente.

4.3. La hemoglobina, un nuevo alérgeno principal de *Anisakis simplex*

4.3.1. Resumen

La anisakiosis gastroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+) son enfermedades que presentan diferentes respuestas de tipo IgE e IgG4 frente al extracto proteico total y frente a alérgenos específicos de *Anisakis*. *Anisakis* y *Ascaris* son nematodos muy relacionados filogenéticamente que suelen causar problemas de especificidad al realizar un diagnóstico inmunológico. La hemoglobina es una proteína extremadamente conservada que ha sido considerada, hasta el momento, un alérgeno exclusivamente en quironómidos.

En este capítulo se midieron los niveles de IgE e IgG4 frente a las hemoglobinas de *Anisakis simplex sensu lato* (*s. l.*) y *Ascaris suum* en el suero de 21 pacientes diagnosticados de AGA y 23 de UC+ mediante un ELISA captura empleando el anticuerpo monoclonal murino anti-hemoglobina de *Anisakis* 4E8g, que también reconoce la hemoglobina de *Ascaris*. Además se determinaron los niveles de IgE e IgG4 específicas de los antígenos totales de los dos nematodos mediante ELISA indirecto e inmunotransferencia.

Los niveles de IgE e IgG4 anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* fueron más elevados en los pacientes con AGA que en los diagnosticados de UC+ ($P=0,002$ y $0,026$, respectivamente). Sorprendentemente, ningún paciente presentó niveles detectables de IgE frente a la hemoglobina de *A. suum*.

Finalmente, se realizó un estudio *in silico* de los epitopos B de ambas moléculas de hemoglobina. Los valores de propensión de epitopos en la hemoglobina de *Anisakis*, resultaron ser más altos que en la hemoglobina de *Ascaris* comparando las regiones equivalentes de unión a IgE de la hemoglobina alérgica Chi t 1 de *Chironomus thummi*. De forma complementaria, se estudió bioinformáticamente la superficie de todas las hemoglobinas disponibles de nematodos disponibles, definiéndose epitopos conformacionales, potencial electrostático y similitud estructural con las hemoglobinas de sus hospedadores definitivos.

En conclusión, la hemoglobina de *Anisakis* ha sido descrita en este trabajo como un nuevo alérgeno principal de *Anisakis* (Ani s 13), siendo reconocida por un gran número (64,3%) de pacientes sensibilizados a *Anisakis* y por hasta un 80,9% de los pacientes del grupo de AGA. La presencia de un epitopo específico y las diferencias en propensión de ser epitopos entre las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* podrían explicar la ausencia de reactividad cruzada entre las dos moléculas. La ausencia de reactividad cruzada observada en el caso de la IgE hacia la hemoglobina de *Ascaris* en pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis*, convierte a la hemoglobina de *Anisakis* en un candidato potencial para el desarrollo de herramientas diagnósticas más específicas.

4.3.2. Valores de IgE e IgG4 mediante ImmunoCAP®

Se emplearon sueros de 44 pacientes sensibilizados a *Anisakis* [(21 con anisakiosis gastroalérgica (AGA) y 23 con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+)]. La media de edad fue $50,7 \pm 13,9$ años y el ratio mujer:hombre fue 9:12 en AGA y 20:3 en UC+ ($P=0,001$).

Como ya se había observado previamente, se obtuvieron valores significativamente más elevados de IgE e IgG4 específicas frente al antígeno de *Anisakis* en los pacientes de grupo AGA comparados con los del grupo UC+ mediante ImmunoCAP® (Figura 35).

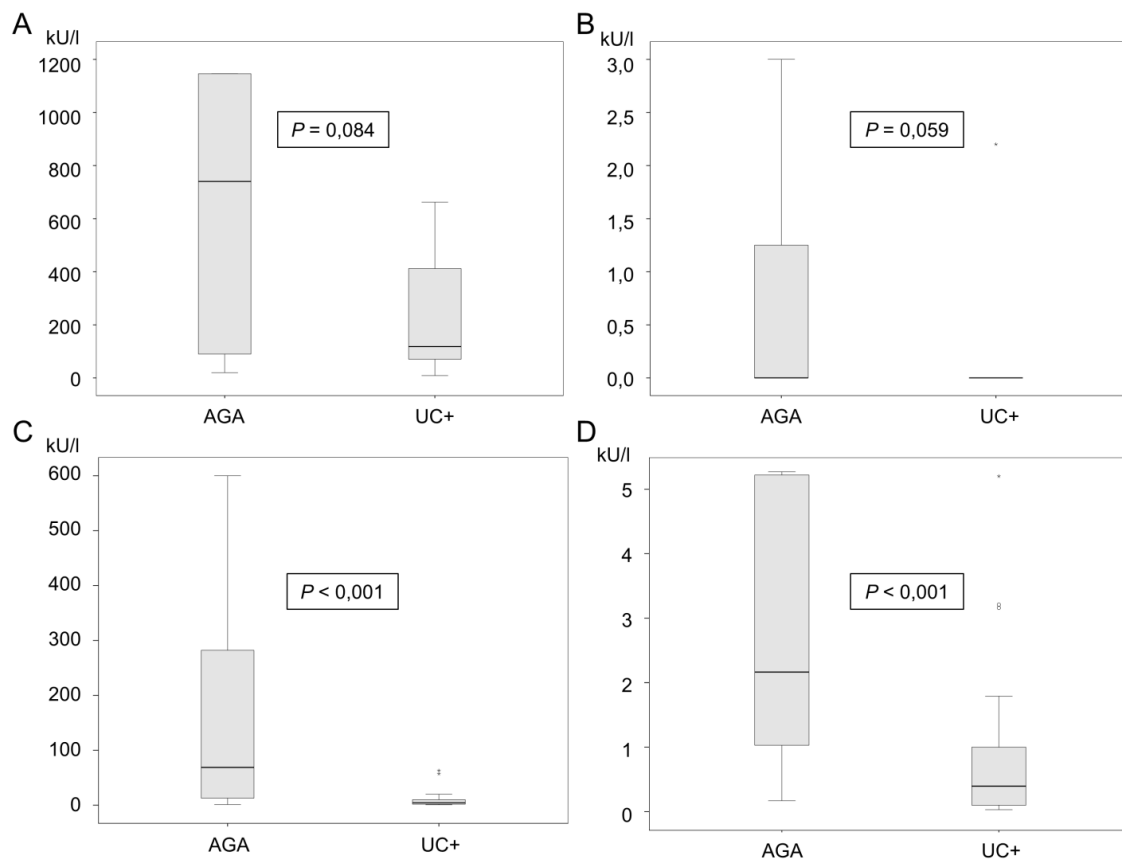


Figura 35. Mediana y rangos intercuartiles de A: IgE total, B: IgE anti-*Ascaris suum*, C: IgE anti-*Anisakis simplex sensu lato* y D: IgG4 anti-*A. simplex s. l.* Los resultados fueron obtenidos por ImmunoCAP® en pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+).

4.3.3. IgE e IgG4 anti-hemoglobina de *Anisakis*

Los anticuerpos específicos IgE e IgG4 fueron medidos frente a la hemoglobina de *A. simplex s. l.* mediante ELISA captura. Los niveles de IgE e IgG4 anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* fueron más elevados en el grupo AGA que en el grupo UC+ ($P=0,002$ y $0,026$, respectivamente) (Figura 36).

El 64,3% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis*, mostraron IgE frente a la hemoglobina de *A. simplex s. l.* Ya que este porcentaje se sitúa por encima del 50% al analizar las dos entidades clínicas con manifestaciones cutáneas tras el parasitismo por *Anisakis*, la hemoglobina de *A. simplex* fue considerada alérgeno principal de *Anisakis* y nombrada según las reglas de la WHO/IUIS (*World Health Organization/International Union of Immunological Societies*) como Anis s 13 (<http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=797>). Por otro lado, cuando analizamos por separado los grupos, observamos que el 80,9% de los sueros del grupo AGA fueron positivos *versus* el 47,8% observado en el grupo UC+. En el caso de la IgG4 anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* el 31,8% de los 44 pacientes sensibilizados fueron positivos (47,6% de AGA *versus* 17,3% de UC+). Para el análisis de los datos, los sueros fueron considerados positivos si la D.O. fue mayor de $M+2SD$, donde M y SD

son la media aritmética de la D.O. y la desviación estándar obtenida con 14 sueros control sin diagnóstico de urticaria ni sensibilización a *Anisakis*.

Se estudiaron las correlaciones de los valores de IgE e IgG4 anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* con los valores de IgE total, IgE específica anti-*Anisakis/Ascaris* e IgG4 anti *Anisakis*, todos ellos determinados por ImmunoCAP®. La IgE anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* se correlacionó positivamente con todos ellos ($P < 0,01$) [IgE total (Rho=0,779), IgE e IgG4 específicas frente al extracto total de *Anisakis* (Rho=0,502 y 0,934, respectivamente) e IgE anti-*Ascaris* (Rho=0,572)]. De la misma manera, se observó una correlación positiva entre la IgG4 anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.*, con la IgG4 y la IgE anti-*Anisakis* (Rho=0,542 y Rho=0,484, respectivamente).

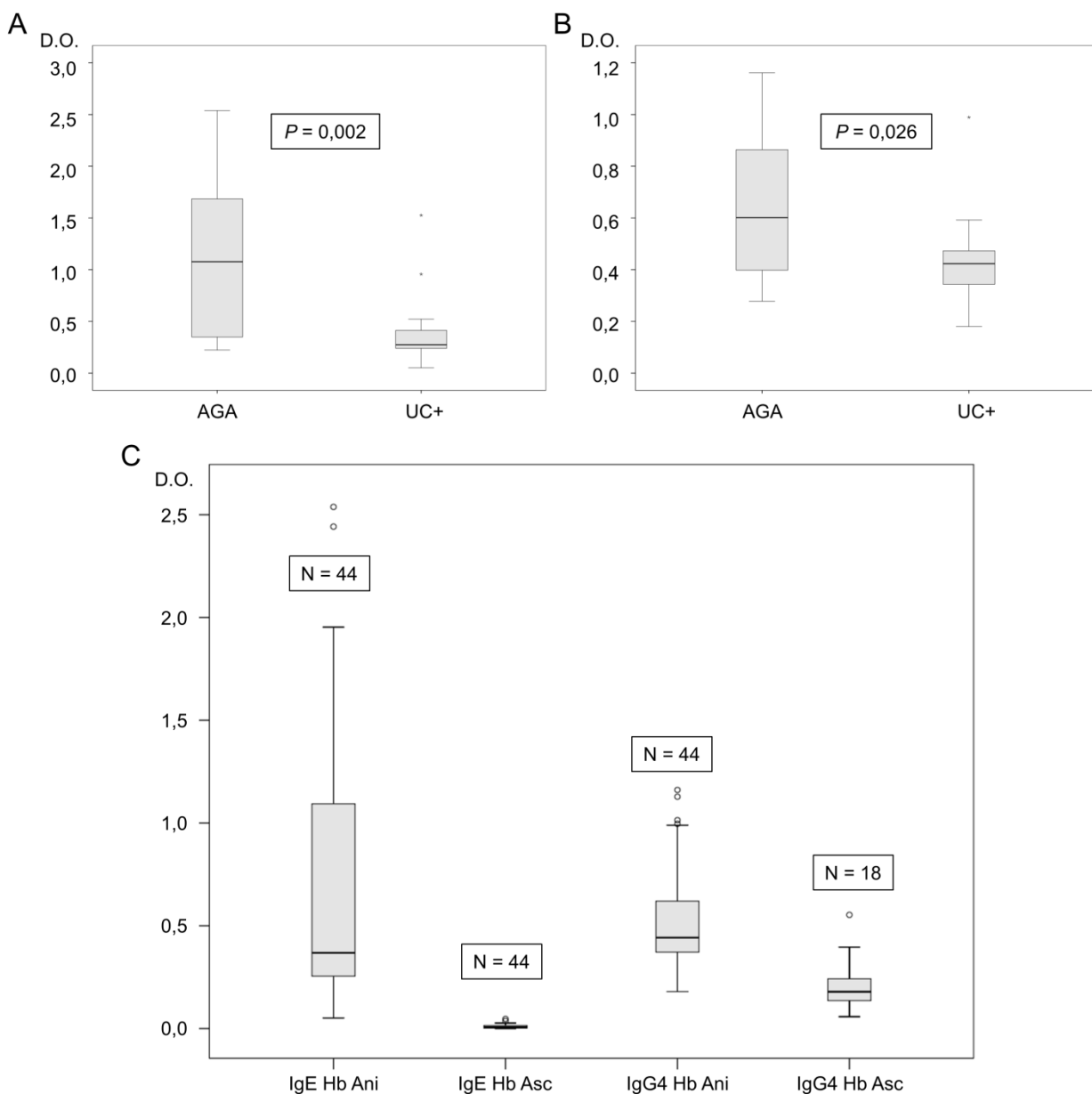


Figura 36. Medianas y rangos intercuartiles de los niveles de IgE (A) e IgG4 (B) anti-hemoglobina de *Anisakis simplex sensu lato (s. l.)*. Los resultados fueron obtenidos por ELISA captura en pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+). C: Comparación realizada sin hacer distinción entre los grupos AGA y UC+. N: Número de pacientes; IgE Hb Ani e IgG4 Hb Ani: IgE e IgG4 frente a la hemoglobina de *A. simplex s. l.*; IgE Hb Asc e IgG4 Hb Asc: IgE e IgG4 frente a la hemoglobina de *Ascaris suum*.

4.3.4. Detección de anticuerpos específicos de las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* mediante inmunotransferencia

La técnica de ELISA captura empleando anticuerpos monoclonales es una técnica válida para detectar y cuantificar anticuerpos en el suero de pacientes alérgicos (Sookrung *et al.*, 2003), sin embargo para confirmar que el ELISA captura no ofrecía resultados positivos debido a la presencia de otras proteínas de unión a hemoglobina o falsos negativos por el posible bloqueo de epitopos de la hemoglobina, analizamos los patrones de inmunorreconocimiento de la IgG4 de los 44 pacientes sensibilizados a *Anisakis* en condiciones reductoras. Para la identificación del reconocimiento de la hemoglobina, consideramos como positivos aquellos sueros que presentaron el mismo patrón que el mostrado por el anticuerpo monoclonal 4E8g anti-hemoglobina de *Anisakis* en condiciones reductoras (Figura 37). La prevalencia de la IgG4 anti-hemoglobina de *Anisakis* fue del 29,5% en los pacientes sensibilizados a *Anisakis* (47,6% de los AGA *versus* 13,0% de los UC+). Esta prevalencia fue similar a la obtenida previamente empleando el ELISA captura, en el que el 31,8% de los 44 pacientes sensibilizados a *Anisakis* fue positivo (47,6% de los AGA *versus* 17,3% de los UC+). Las concentraciones de IgE específica en suero son generalmente bajas y debido a las limitadas cantidades de suero disponibles, no fue posible estudiar la prevalencia de la IgE anti-hemoglobina mediante inmunotransferencia. A pesar de ello, en base a los resultados de los ELISA e inmunotransferencias realizados con IgG4, la técnica de ELISA captura empleando el anticuerpo monoclonal 4E8g parece ofrecer unos valores fiables acerca de las respuestas de anticuerpos anti-hemoglobina en esos pacientes.

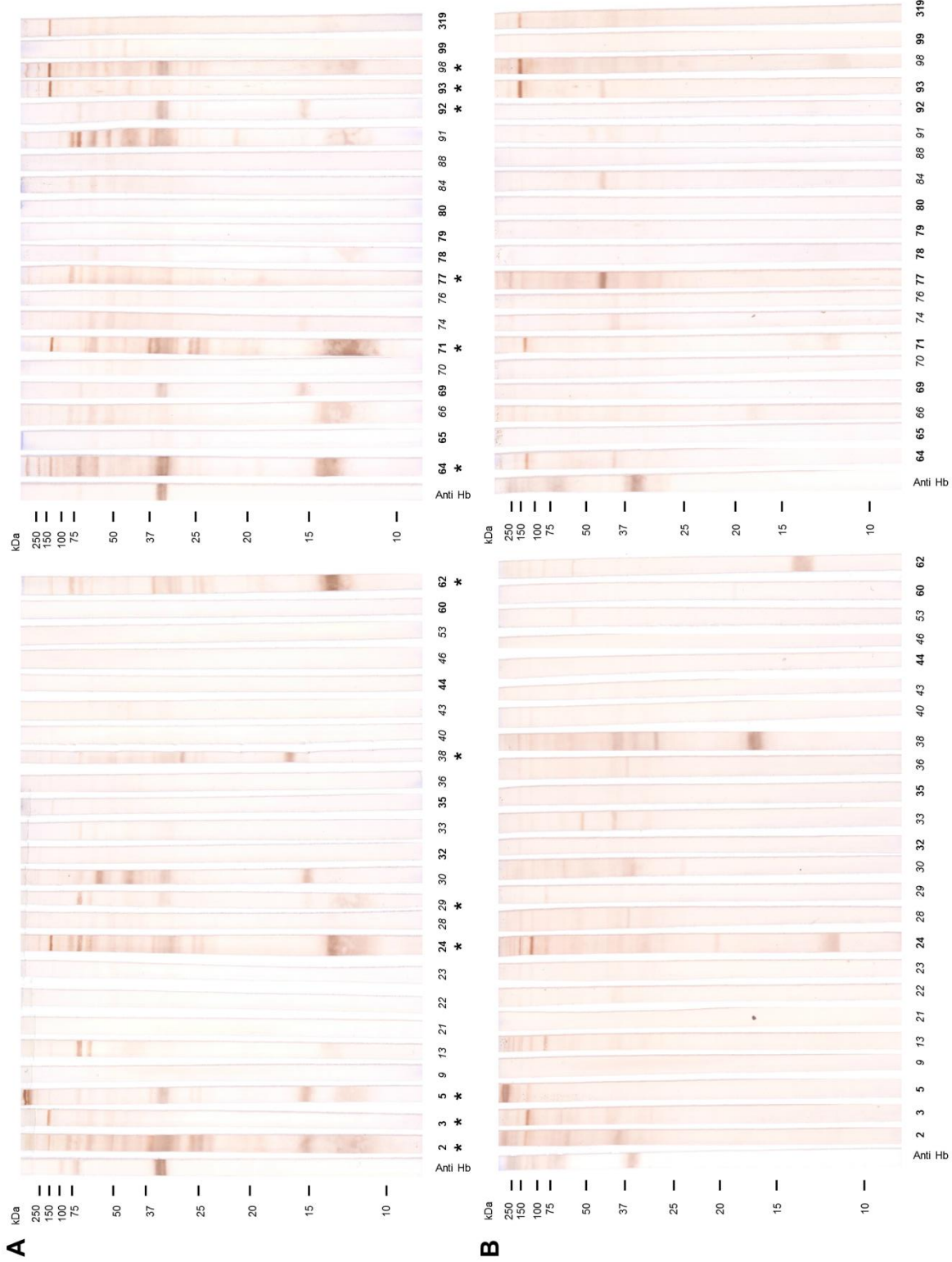


Figura 37. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgG4 de los pacientes con anisakiasis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica (cursiva). A: Extracto de larvas de tercer estadio de *Anisakis simplex sensu lato*. **B:** Extracto de adultos de *Ascaris suum*. * indica reconocimiento de hemoglobina.

4.3.5. Estudio de la reactividad cruzada entre las hemoglobinas de *Ascaris* y *Anisakis*

El anticuerpo monoclonal 4E8g reconoció las hemoglobinas de los nematodos *A. simplex s. l.* y *A. suum* al realizar las inmunotransferencias con los extractos totales de los parásitos tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Este anticuerpo reconoció una proteína de unos 37 kDa en el extracto total de L3 de *A. simplex s. l.* y otra de mayor peso molecular en el extracto somático de los adultos de *A. suum* (Figura 3). En ambas inmunotransferencias, en condiciones reductoras y no reductoras, la hemoglobina de *Anisakis* apareció alrededor de 37 kDa (monómero), 75 kDa (dímero), 100 kDa (trímero) y 150 kDa (tetramero). En condiciones no reductoras fue posible la observación de más oligómeros de hemoglobina (Figura 38).

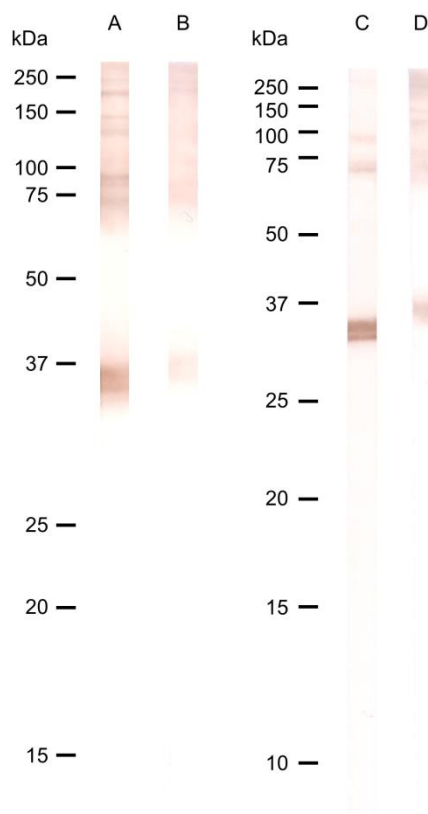


Figura 38. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal 4E8g anti-hemoglobina de *Anisakis*.

La concentración del anticuerpo 4E8g utilizada fue 2 µg/ml. **A:** Extracto de larvas de tercer estadio (L3) de *Anisakis simplex sensu lato (s. l.)*. **B:** Extracto de adultos de *Ascaris suum*. Los carriles **C** y **D** contenían extractos de L3 de *A. simplex s. l.* y de adultos de *A. suum* respectivamente, tratados en condiciones reductoras.

Asimismo, estudiamos los niveles de IgE e IgG4 frente a los extractos totales de *A. simplex s. l.* y de *A. suum* en los 44 sueros estudiados (21 AGA y 23 UC+) mediante ELISA indirecto (Tabla 20). Los niveles de anticuerpos específicos fueron significativamente más elevados frente al antígeno de *Anisakis*, aunque el antígeno de *Ascaris* también fue reconocido por los sueros de los pacientes sensibilizados a *Anisakis*. Esta reactividad cruzada entre los extractos proteicos también fue observada mediante inmunotransferencia (Figura 37).

Tabla 20. Mediana y rangos intercuartiles (IQR) de los niveles de IgE e IgG4 determinados por ELISA frente a los extractos totales de larvas de tercer estadio de *Anisakis simplex sensu lato* y adultos de *Ascaris suum* en pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) y urticaria crónica con sensibilización a *Anisakis* (UC+).

Grupo	IQR	<i>Anisakis simplex</i>		<i>Ascaris suum</i>	
		IgE	IgG4	IgE	IgG4
AGA	25	0,168	0,084	0,043	0,014
	50	0,782	0,224	0,061	0,026
	75	1,170	0,776	0,075	0,100
UC+	25	0,105	0,005	0,038	0,003
	50	0,210	0,032	0,052	0,007
	75	0,316	0,154	0,069	0,016
AGA y UC+	25	0,133	0,014	0,043	0,005
	50	0,253	0,107	0,059	0,015
	75	0,824	0,325	0,070	0,059

Los valores se muestran como D.O. a 490 nm.

En cuanto a la reactividad cruzada de la hemoglobina, ninguno de los sueros mostró niveles de IgE detectables frente a la hemoglobina de *A. suum* ($0,010 \pm 0,010$) comparado con los obtenidos frente a la hemoglobina de *A. simplex s. l.* ($0,712 \pm 0,650$). En el caso de la IgG4, los valores fueron también más elevados frente a la hemoglobina de *A. simplex s. l.* aunque se observaron valores detectables frente a la hemoglobina de *A. suum* ($0,214 \pm 0,114$) (Figura 36C).

4.3.6. Modelos de hemoglobina y epitopos

Se realizaron los modelos de las subunidades α y β de la hemoglobina de *Tursiops truncatus* (delfín mular), de las subunidades α y β de la hemoglobina de *Phoca vitulina* (foca moteada), de las hemoglobinas de los nematodos *A. pegreffii*, *A. suum* [completa, ya que solo se disponía de la estructura experimental del dominio I (PDB: 1ASH)], *Pseudoterranova decipiens* y de *Toxocara canis* (dominio I, ya que es el único fragmento de la secuencia disponible en las bases de datos).

Las puntuaciones obtenidas con QMEAN para la estimación de la calidad de los modelos de hemoglobina fueron: *T. truncatus* subunidad α : 0,825, *T. truncatus* subunidad β : 0,868, *P. vitulina* subunidad α : 0,810, *P. vitulina* subunidad β : 0,790, *A. pegreffii*: 0,734, *A. suum*: 0,601, *P. decipiens*: 0,542 y *T. canis*: 0,812.

QMEAN ofrece una puntuación para cada modelo proteico con la finalidad de estimar su calidad. Esta puntuación de 0 a 1 refleja la fiabilidad del modelo en su totalidad. Todos los modelos empleados en este estudio se consideraron aptos por tener una puntuación QMEAN superior a 0,5.

En la secuencia disponible de la hemoglobina de *A. pegreffii* no está incluido el péptido señal ya que es una secuencia parcial, sin embargo, las de *A. suum* y *P. decipiens* presentaron una predicción del péptido señal desde el aminoácido 1 al 18 lo que concordaba con lo observado previamente por otros investigadores (De Baere *et al.*, 1992).

Las puntuaciones de Discotope 2.0 se representaron gráficamente para cada aminoácido tras realizar un alineamiento de las secuencias (Figura 39). Todos los aminoácidos que superaron la puntuación umbral de *Discotope Score* -3,7, fueron coloreados manualmente y agrupados por proximidad espacial en la

molécula plegada (Figura 40). De esta manera se definieron cinco epitopos en la hemoglobina de *A. pegreffii* (Epitopo 1: 16, 27, 30-56, 58 y 59; Epitopo 2: 90, 92-100; Epitopo 3: 239, 240, 242-251, 292-309; Epitopo 4: 163-166, 169, 176, 177, 179-205, 207, 208; Epitopo 5: 145-147, 150, 266, 269-271, 273-275, 278) mientras que solo se definieron cuatro en la hemoglobina de *A. suum* (Epitopo 1: 49-81; Epitopo 2: 116, 118-120; Epitopo 3: 1, 138, 139, 142, 144-146, 261-273, 315-338; Epitopo 4: 185-187, 191, 198, 201-230).

```

Chit1 : -----LSADQISTVQASFDKVK---GDPVGLIYAFKADPSIMAKFTQFAGKDLESIK-GTAPFFETHANR : 61
Chit1Epi : -----LSADQISTVQASFDKVK---GDPVGLIYAFKADPSIMAKFTQFAGKDLESIK-GTAPFFETHANR : 61
Anip : -----ELCMKSLHAKVGSSEKARQDGVLDYKHFEBHPVMKKYFKHREGYTAADVQ-KDPLFIKQOGON : 63
AnipEpi : -----ELCMKSLHAKVGSSEKARQDGVLDYKHFEBHPVMKKYFKHREGYTAADVQ-KDPLFIKQOGON : 63
Psed : MHSIVLATVLFVAIASASKTRELKMSLEHAKVGSSEKARQDIDLYKHFEBHPAMKKYFKHRENYTPADVQ-KDPLFIKQOGON : 85
PsedEpi : MHSIVLATVLFVAIASASKTRELKMSLEHAKVGSSEKARQDIDLYKHFEBHPAMKKYFKHRENYTPADVQ-KDPLFIKQOGON : 85
Ascs : MRSLLLLSIVFFVTVSANKTRELKMSLEHAKVDTSNEARQDIDLYKHFEBHPPLRKYFKNREYTAEDVQ-NDPFFAKOGOK : 85
AscsEpi : MRSLLLLSIVFFVTVSANKTRELKMSLEHAKVDTSNEARQDIDLYKHFEBHPPLRKYFKNREYTAEDVQ-NDPFFAKOGOK : 85
Toxc : -----RELCMKSLEKDVHVGTGDHAKQCEIDLYKHFEBHPDLRKYFKNREYTAEDVQ-KDEFFAKOGOK : 64
ToxcEpi : -----RELCMKSLEKDVHVGTGDHAKQCEIDLYKHFEBHPDLRKYFKNREYTAEDVQ-KDEFFAKOGOK : 64
TurtA : -----VLSPADKTNVKGTSKIGNHSAIDYAEALERLFINPSTKTFESHF-DLGH----GSAQIKGHRKR : 61
TurtB : -----VHLTGEEKSAVTALWGKVN--VEVGEALGRLLVVPWQRFESFGDLSTADAVMKNPNVKKHGOK : 66
PhovA : -----VLSPADKTNVKATWDKIGGHAIDYGEALERLFTAPTTKTFPHF-DLSH----GSAQVKAHKCR : 61
PhovB : -----VHLTGEEKSAVTALWGKVN--VEVGEALGRLLVVPWQRFESFGDLSTADAVMGNPKVKAHKCR : 66
SussA : -----VLSAADKANVKAAGKVGQGAHAEALERLFLGPTTKTFPHF-DLSH----GSDQVKAHKCR : 61
SussB : -----MVHLSAEKEAVLGLWGKVN--VEVGEALGRLLVVPWQRFESFGDLSTADAVMGNPKVKAHKCR : 67
HomsA : -----VLSPADKTNVKAAGKVGGAHAEALERLFLSPTTKTFPHF-DLSH----GSAQVKAHKCR : 61
HomsB : -----VHLTPEEKSAVTALWGKVN--VEVGEALGRLLVVPWQRFESFGDLSTADAVMGNPKVKAHKCR : 66
Can1A : -----VLSPADKTNIKSTWDKIGGHAIDYGEALDRTFQSPPTTKTFPHF-DLSP----GSAQVKAHKCR : 61
Can1B : -----VHLTAEKSLVSLWGKVN--VEVGEALGRLLVVPWQRFESFGDLSTADAVMSNAKVKAHGCR : 66

```

```

Chit1 : IVGFFSKIIGELPN---EADVNTFVASHK--PRGVTHDQLNNFRAGFVSYMKAHT--DFAG-AEAAWGAALDTFFGMIFSKM--- : 136
Chit1Epi : IVGFFSKIIGELPN---EADVNTFVASHK--PRGVTHDQLNNFRAGFVSYMKAHT--DFAG-AEAAWGAALDTFFGMIFSKM--- : 136
Anip : ILLACHVVCATYDDRETFDAYTHELMARHERDHRIPNDVVAHFWEHFNMYLAEKT--TMDEPTKQAWLEIGKEFSSBITKYGRPT : 147
AnipEpi : ILLACHVVCATYDDRETFDAYTHELMARHERDHRIPNDVVAHFWEHFNMYLAEKT--TMDEPTKQAWLEIGKEFSSBITKYGRPT : 147
Psed : ILLACHVLCATYDDRETFDAYVGEIMARHERDHRIPNDVVAHFWEHFHEFLGSKT--TLDEPTKHAWEIGKEFSSHSHHGRHS : 169
PsedEpi : ILLACHVLCATYDDRETFDAYVGEIMARHERDHRIPNDVVAHFWEHFHEFLGSKT--TLDEPTKHAWEIGKEFSSHSHHGRHS : 169
Ascs : ILLACHVLCATYDDRETFNAYTRELDREARHDHVPPEVITDFWKLFEYLGKKT--TLDEPTKQAWHEIGREFAKBNKHGRHA : 169
AscsEpi : ILLACHVLCATYDDRETFNAYTRELDREARHDHVPPEVITDFWKLFEYLGKKT--TLDEPTKQAWHEIGREFAKBNKHGRHA : 169
Toxc : ILLACHVLCATVDDMETFNAYSHEVLDREARHDHVELPASANTVSAFIFIEYLEKKM--TVDEATKNAWMEIGKDFATAVGOHES-- : 146
ToxcEpi : ILLACHVLCATVDDMETFNAYSHEVLDREARHDHVELPASANTVSAFIFIEYLEKKM--TVDEATKNAWMEIGKDFATAVGOHES-- : 146
TurtA : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
TurtB : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
PhovA : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
PhovB : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
SussA : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
SussB : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
HomsA : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
HomsB : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
Can1A : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141
Can1B : VADALTKAVGHLDN---LPGALSASDLHA-HKRVDFVNEKLLSHCLLVTLAHHHPDEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-- : 141

```

```

Chit1 : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
Chit1Epi : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
Anip : VRDHCMSLSLEHIAIGDEAHQKQNGVDLYKHFEBHPMRLAFKGRNYTAEDVQKDEFFVKGQHKILLALRMFCTSYDDEPTDFDF : 233
AnipEpi : VRDHCMSLSLEHIAIGDEAHQKQNGVDLYKHFEBHPMRLAFKGRNYTAEDVQKDEFFVKGQHKILLALRMFCTSYDDEPTDFDF : 233
Psed : VRDHCMSLSLEYIAIGDKEHQKQNGIDLYKHFEBHPMRLAFKGRNFTKEDVQKDAFFVKGQHKILLALRMCLSSYDDEPTDFDF : 255
PsedEpi : VRDHCMSLSLEYIAIGDKEHQKQNGIDLYKHFEBHPMRLAFKGRNFTKEDVQKDAFFVKGQHKILLALRMCLSSYDDEPTDFDF : 255
Ascs : VRHQCMRSLQHDIDIGHSETAKQNGIDLYKHFEBHPMREAFKDRNYTAEDVQKDPFFVKGQQRILLACHLLCASYDDEPTFHMY : 255
AscsEpi : VRHQCMRSLQHDIDIGHSETAKQNGIDLYKHFEBHPMREAFKDRNYTAEDVQKDPFFVKGQQRILLACHLLCASYDDEPTFHMY : 255
Toxc : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
ToxcEpi : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
TurtA : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
TurtB : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
PhovA : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
PhovB : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
SussA : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
SussB : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
HomsA : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
HomsB : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
Can1A : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -
Can1B : -----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----2 : -

```

```

Chit1 : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
Chit1Epi : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
Anip : VDALLDRHIKDDIHLPOAQWHEFWKLFAYEYLDQKSSHLETEDEKHSWTIGEEFGHEADKHAKAG-----HHEGEHKKEEH : 309
AnipEpi : VDALLDRHIKDDIHLPOAQWHEFWKLFAYEYLDQKSSHLETEDEKHSWTIGEEFGHEADKHAKAG-----HHEGEHKKEEH : 309
Psed : VDALLDRHIKDDIHLPOAQWHEFWKLFAYEYLDQKSSHLETEDEKHSWTIGEEFGHEADKHAKAG-----HHEGEHKKEEH : 333
PsedEpi : VDALLDRHIKDDIHLPOAQWHEFWKLFAYEYLDQKSSHLETEDEKHSWTIGEEFGHEADKHAKAG-----HHEGEHKKEEH : 333
Ascs : VHELMERHERLGVLPDQHWTFDFWKLFEFLEKKS--LCEHTKHAWAVIGKEFAYEATRHCHEHHEKHEHKEHKEHKEEQH : 338
AscsEpi : VHELMERHERLGVLPDQHWTFDFWKLFEFLEKKS--LCEHTKHAWAVIGKEFAYEATRHCHEHHEKHEHKEHKEHKEEQH : 338
Toxc : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
ToxcEpi : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
TurtA : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
TurtB : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
PhovA : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
PhovB : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
SussA : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
SussB : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
HomsA : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
HomsB : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
Can1A : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -
Can1B : -----60-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340 : -

```

Figura 39. Alineamiento de las secuencias de las diferentes hemoglobinas analizadas y sus epitopos. Se muestran resaltados: en amarillo los péptidos señal, en azul y en verde los péptidos de unión a IgG e IgE respectivamente, identificados en estudios experimentales realizados en la hemoglobina alergénica Chi t 1 (van Kampen *et al.*, 2001) que se corresponden con los Epitopos 1 (azul) y 2 (verde) predichos en el resto de hemoglobinas; en rojo el Epitopo 3, en azul claro el Epitopo 4 y en naranja el Epitopo 5. Epi: Secuencia con epitopos marcados. Anip: *Anisakis pegreffii*, Pse d: *Pseudoterranova decipiens*, Asc s: *Ascaris suum*, Tox c: *Toxocara canis*, Turt: *Tursiops truncatus*, Phov: *Phoca vitulina*, Suss: *Sus scrofa*, Homs: *Homo sapiens*, Canl: *Canis lupus familiaris*. A: Subunidad α . B: Subunidad β .

Los epitopos observados en la hemoglobina de *P. decipiens* fueron similares a los observados en la hemoglobina de *A. pegreffii* pero con un Epitopo 5 más corto y carente de la región en torno a la posición 150 (Epitopo 1: 38, 42, 49-81; Epitopo 2: 115-120; Epitopo 3: 145, 260-281, 284, 316-333; Epitopo 4: 188-191, 194, 195, 197-230; Epitopo 5: 287, 288, 291, 292, 295-297). Los epitopos observados en la hemoglobina de *T. canis* solo engloban al Epitopo 1 y 2 debido a que todavía no se conoce la secuencia completa de la hemoglobina de este parásito (Epitopo 1: 17, 35, 39, 42-51, 53-57; Epitopo 2: 97).

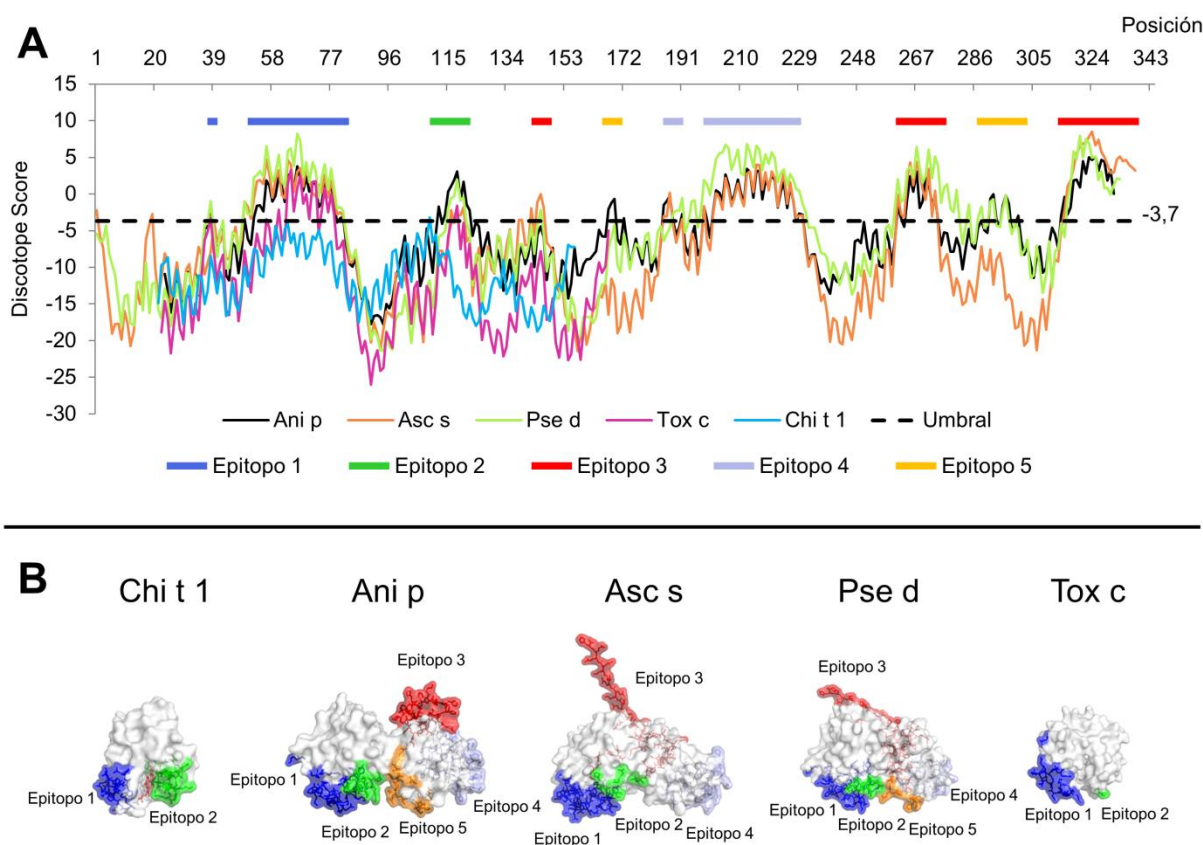


Figura 40. Discotope Score por posición en el alineamiento (A) y representación gráfica de los epitopos en las estructuras tridimensionales de las hemoglobinas: Chi t 1 (PDB: 1ECO) (*Chironomus thummi*), Ani p (Ani s 13) (*Anisakis pegreffii*), Asc s (*Ascaris suum*), Pse d (*Pseudoterranova decipiens*), Tox c (*Toxocara canis*) (B). Las posiciones 41-60 de la hemoglobina alergénica Chi t 1 (Epitopo 1, azul) no son reconocidas por la IgE humana (únicamente por un antisuero de ratón y un anticuerpo monoclonal de ratón IgG), mientras que la región 80-100 (Epitopo 2, verde) fue el principal epitopo de unión a IgE (van Kampen *et al.*, 2001).

Todos los epitopos se encontraron localizados principalmente por encima y por debajo del bolsillo del hemo de cada dominio globina.

La prolina de la posición 89 (Pro89) fue el único aminoácido predicho por Discotope como parte de un epitopo en Chi t 1.

En los Epitopos 1 y 4, se observó un perfil de puntuación de Discotope similar en las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* siendo más elevado en la hemoglobina de *P. decipiens* (línea verde fina, Figura 40).

El Epitopo 2, que es la región equivalente a la de unión a IgE humana en Chi t 1, está presente al igual que el Epitopo 1 en todas las hemoglobinas de los nematodos del estudio, pero su longitud y su *Discotope Score* es mayor en *Anisakis*, seguido de *Pseudoterranova*, *Ascaris* y *Toxocara*.

El Epitopo 3, parece también estar presente en todas las hemoglobinas de nematodos completas, sin embargo la posición de la cola polar en los modelos tridimensionales adopta diferentes conformaciones espaciales probablemente debido a su movilidad en solución.

El Epitopo 5 es discontinuo y está presente en las hemoglobinas de *Anisakis* y *Pseudoterranova*, no siendo observado en la de *Ascaris* ni en la porción disponible de la hemoglobina de *Toxocara*.

Ninguna hemoglobina de los mamíferos que actúan como hospedadores definitivos fue considerada inmunogénica por Discotope no superando en ningún caso el umbral de probabilidad (*Discotope Score* - 3,7) para considerar a un residuo aminoacídico como parte de un epitopo (Figura 41).

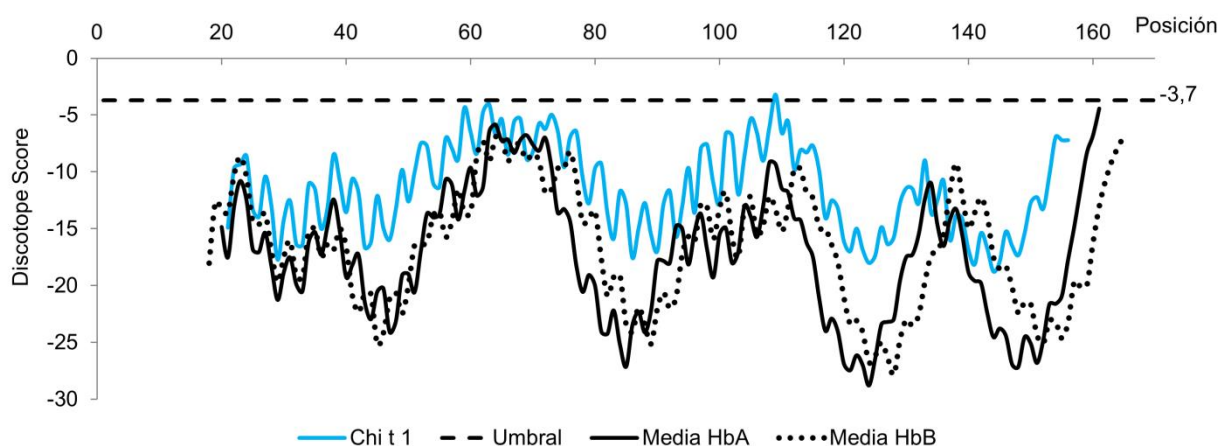


Figura 41. *Discotope Score* por posición en el alineamiento de la hemoglobina alergénica Chi t 1 (*Chironomus thummi*) y la media de las puntuaciones de las subunidades α y β (Media HbA y Media HbB) de las hemoglobinas de los hospedadores definitivos: *Tursiops truncatus*, *Phoca vitulina*, *Sus scrofa*, *Canis lupus familiaris* y *Homo sapiens*.

4.3.7. Propiedades electrostáticas de las hemoglobinas de nematodos y sus hospedadores

Las hemoglobinas de nematodos estudiadas presentaron pI (puntos isoeléctricos) menores que las hemoglobinas de sus hospedadores vertebrados. Para la hemoglobina de *Anisakis* el pI fue de 6,03, que junto con el de la hemoglobina alergénica Chi t 1 (pI=5,8) y el de la hemoglobina incompleta de *Toxocara* (pI=5,64) fueron los más bajos de todos los estudiados. Las hemoglobinas de *Pseudoterranova* (pI=6,67) y de *Ascaris* (pI=7) mostraron los pI más elevados dentro de las hemoglobinas de nematodos. Se estudió el número de aminoácidos cargados positivamente (arginina y lisina) frente a los cargados negativamente (aspartato y glutamato), siendo éstos últimos mucho más numerosos en las hemoglobinas de nematodos que en las de sus hospedadores (Figura 42).

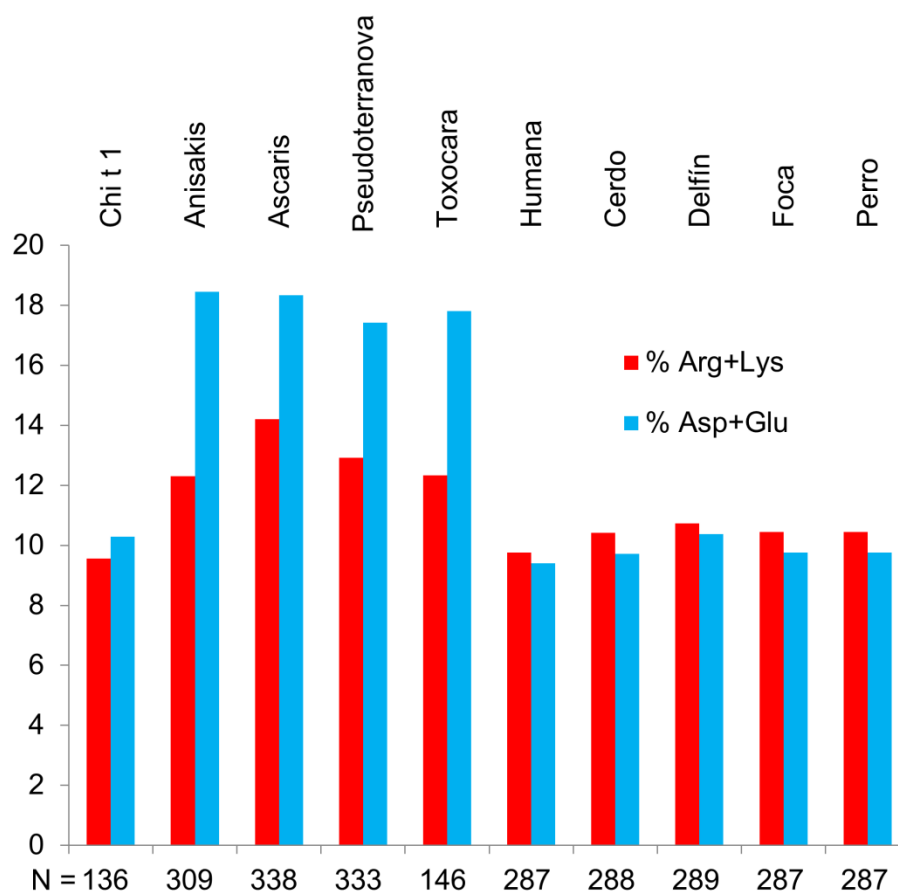


Figura 42. Porcentaje de aminoácidos cargados en las secuencias de hemoglobina. Se tuvieron en cuenta para el cálculo todos los aminoácidos cargados positivamente (Arg: Arginina y Lys: Lisina) y negativamente (Asp: Aspártico y Glu: Glutámico) en las hemoglobinas completas incluyendo las subunidades α y β en el caso de los hospedadores vertebrados. N indica el número total de aminoácidos.

Las hemoglobinas de los hospedadores definitivos: hombre, cerdo y perro: de las que se dispone de la estructura cuaternaria en la base de datos PDB, presentaron puntos isoelectricos de 7,1; 7 y 7,31, respectivamente. En todas estas hemoglobinas uno de los aminoácidos mayoritarios fue la leucina.

Con respecto al potencial electrostático, los valores de las isosuperficies se relacionaron perfectamente con los pI teóricos determinados previamente, alcanzando potenciales muy fuertes con carga negativa para las hemoglobinas de nematodos (Figura 43). Con respecto a las de los hospedadores de los parásitos estudiados, estos potenciales se encontraron más equilibrados entre cargas positivas y negativas (Figura 44). La ventaja de este estudio tridimensional de potenciales electrostáticos fue la observación de las zonas dónde se había definido previamente un epitopo. En la mayoría de los epitopos se encontró una región cargada positivamente y otra negativamente, localizándose estos epitopos en las interfaces de potencial (Figura 43).

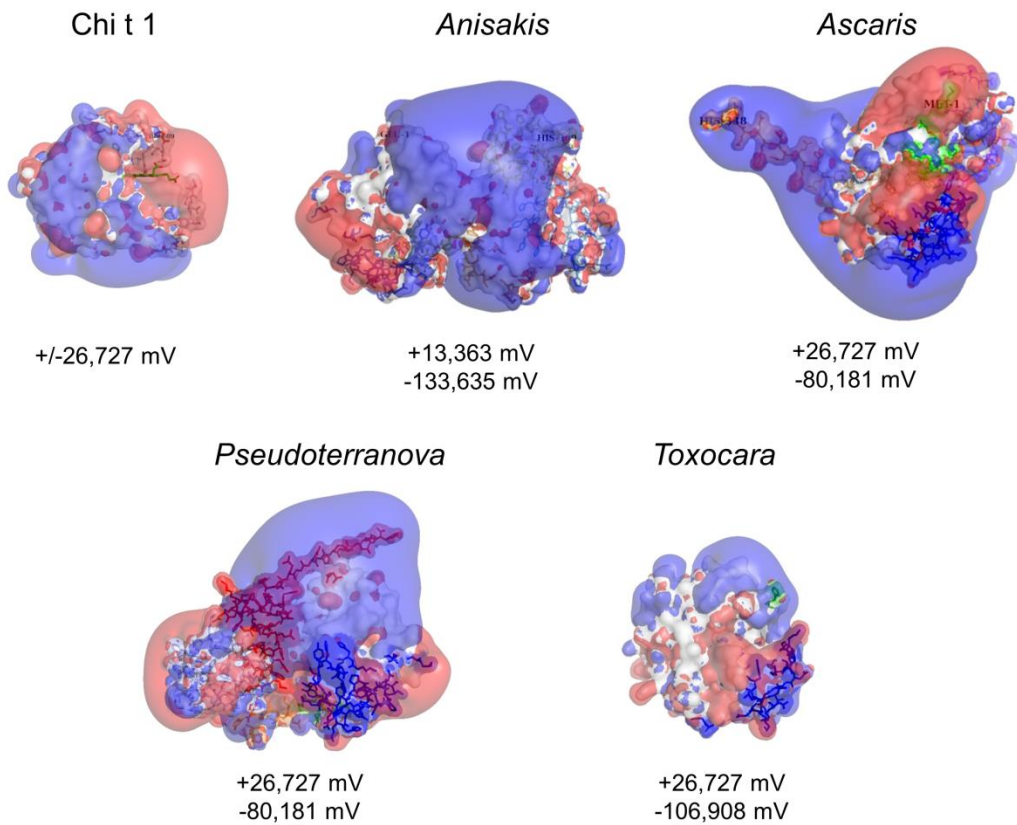


Figura 43. Potencial electrostático de las hemoglobinas de los nematodos estudiados y del alérgeno Chi t 1. Para cada hemoglobina, los valores de potencial eléctrico indicados en la parte inferior son idénticos en toda la superficie bien sea roja (potencial positivo) o azul (potencial negativo) calculados para una temperatura de 310,15 K.

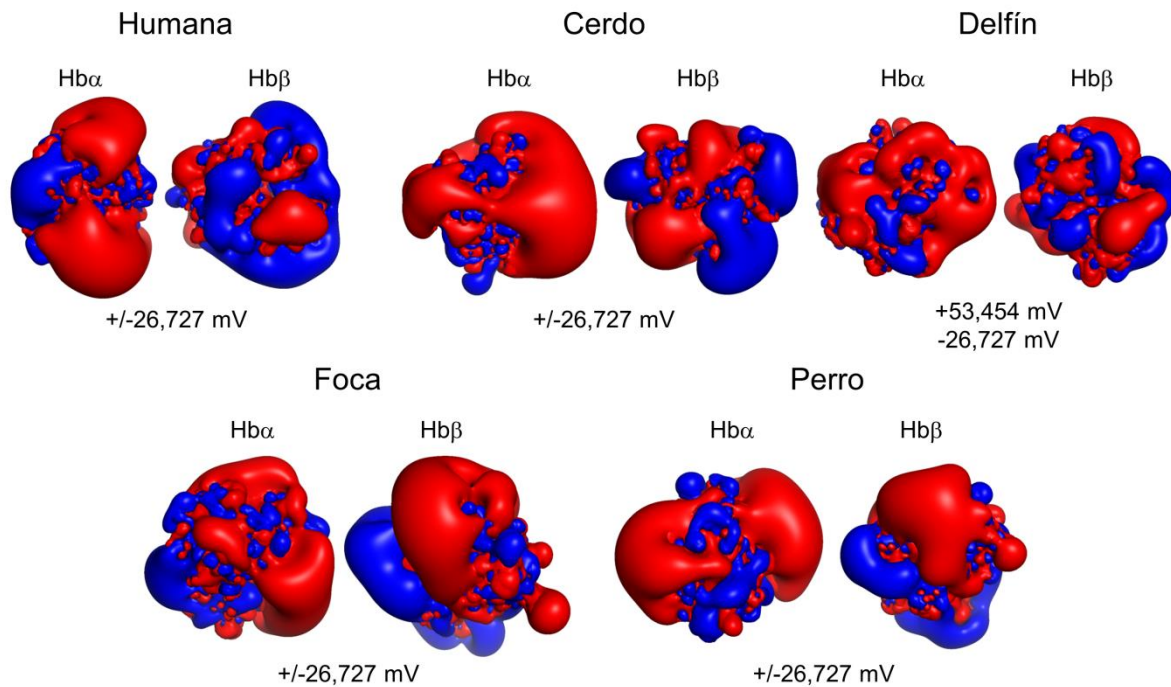


Figura 44. Potencial electrostático de las hemoglobinas de los hospedadores definitivos estudiados. Para cada hemoglobina, los valores de potencial eléctrico indicados en la parte inferior son idénticos en toda la superficie bien sea roja (potencial positivo) o azul (potencial negativo) calculados para una temperatura de 310,15 K.

4.3.8. Dendrogramas de similitud estructural

Debido a que las estructuras tridimensionales son rígidas, el programa 3D-Surfer falla al analizar la diferente colocación de la cola C-terminal en las hemoglobinas de nematodos. Por este motivo se consideró solamente la inclusión en el análisis de los dominios I (son aquellos dominios globina que se encuentran más próximos al extremo N-terminal). Además, de este modo, se incluyó para el análisis el dominio I de la hemoglobina de *A. suum* obtenido experimentalmente de la base de datos PDB y no modelado (PDB: 1ASH). Los dominios I de las hemoglobinas de *A. pegreffii* y *P. decipiens* se recortaron desde las posiciones 1-143 y 1-165, respectivamente. El único fragmento disponible de la secuencia de *T. canis* ha sido considerado como dominio I como se observa en el alineamiento (Figura 39), por lo que no ha sido necesario recorte alguno. Las subunidades α de las hemoglobinas de los hospedadores vertebrados fueron seleccionadas para su comparación estructural por ser las homólogas a los dominios I en los nematodos.

Realizamos el cálculo de las distancias euclidianas entre los vectores generados de cada una de las estructuras y obtuvimos un árbol que agrupó aquellas hemoglobinas más parecidas pero no a nivel de secuencia, sino a nivel tridimensional (Figura 45).

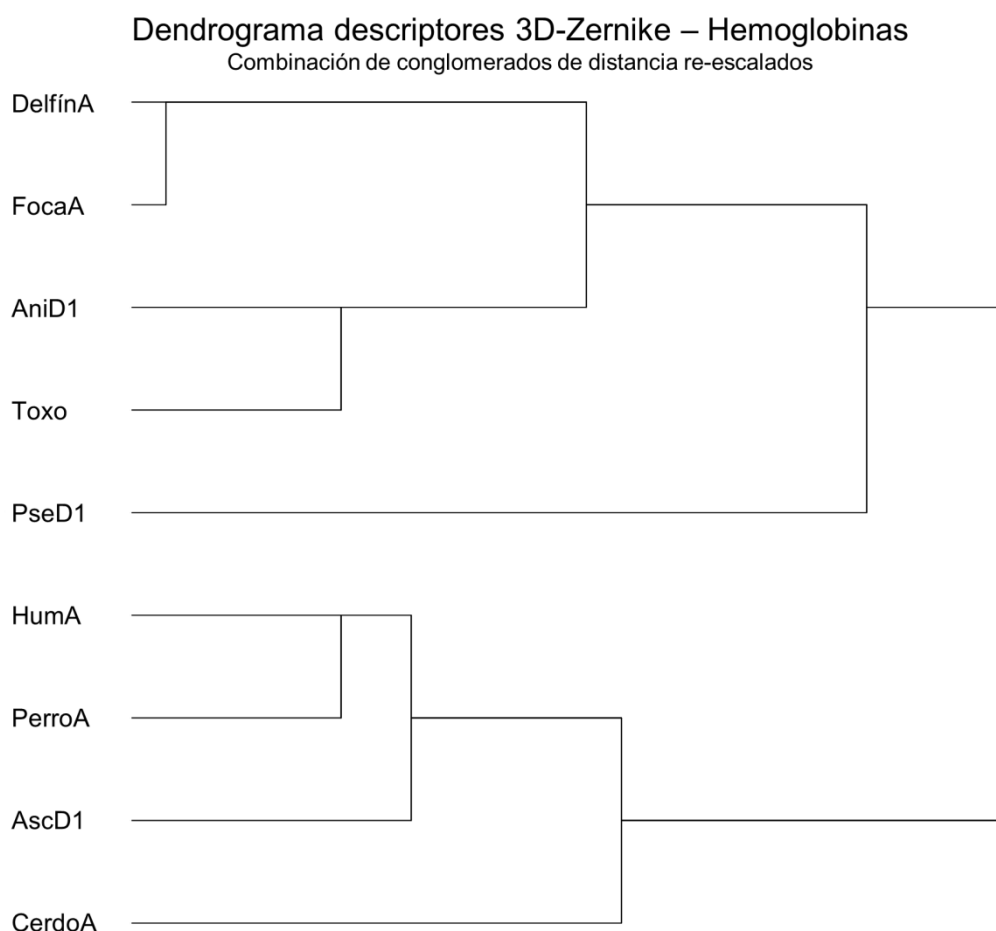


Figura 45. Dendrograma de similitud estructural de los dominios I (D1) de las hemoglobinas de nematodos y las subunidades α (A) de sus hospedadores definitivos. Cálculos realizados a partir de las distancias euclidianas entre los correspondientes descriptores 3D-Zernike de cada estructura. Ani: *Anisakis*, Pse: *Pseudoterranova*, Asc: *Ascaris*, Toxo: *Toxocara*, Hum: *Humana*.

El árbol generado, presenta dos ramas principales. La primera rama agrupa las subunidades α del delfín y la foca con los dominios I de las hemoglobinas de sus nematodos parásitos *A. pegreffii* y *P. decipiens*. La segunda rama agrupa las subunidades α del hombre y del cerdo con el dominio I de la hemoglobina de *A. suum*.

El dominio I de la hemoglobina de *T. canis* resultó ser similar al de *A. pegreffii* y la subunidad α del perro resultó ser más parecida a la humana (Figura 45).

4.4. Alergenicidad de las tropomiosinas de pescado: desafiando un dogma inmunológico

4.4.1. Estudio de un paciente alérgico a pescados y marisco

4.4.1.1. Resumen

La tropomiosina es una proteína evolutivamente muy conservada y esto hace que exista una elevada reactividad cruzada entre las tropomiosinas de los invertebrados, convirtiéndola en un panalergeno. Su alergenidad se ha relacionado con la distancia filogenética existente entre el organismo que actúa como fuente de tropomiosina y el ser humano. El dogma existente acerca de la alergenidad de las tropomiosinas es que estas proteínas no son alérgicas cuando proceden de un organismo vertebrado. En este capítulo, se describe el caso de un paciente de 19 años sensibilizado a *Anisakis* con alergia a ácaros, marisco y a varias especies de pescado en el que se demuestra que las tropomiosinas de pescados pueden ser alérgenos clínicamente relevantes.

4.4.1.2. Historia clínica

Un varón caucásico de 19 años con antecedente de alergia a ácaros y marisco, presentaba un cuadro de conjuntivitis, epigastralgia, dolor cólico abdominal y sibilancias en los 30 minutos siguientes a la ingestión de varias especies de pescados tales como gallo, rape, merluza, raya, bonito o emperador. La Dra. Beatriz Veleiro (Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Galicia, España) le realizó pruebas diagnósticas especiales previa firma de un consentimiento informado y que además fueron aprobadas por el Comité Ético del mismo hospital.

Cuando tenía tres años, empezó una marcha atópica que progresó desde unos síntomas iniciales de dermatitis atópica hasta desembocar en rinitis alérgica y asma. Cuando cumplió seis años, las pruebas cutáneas y la IgE específica en suero, revelaron positividad a *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*. A esta misma edad, presentaba prurito oral, faríngeo y del cuero cabelludo, al igual que disnea, después de la ingestión de crustáceos o moluscos. A la edad de 13 años, el síndrome de alergia oral también se le producía tras la ingestión de pulpo y calamar. Simultáneamente, también empezó a presentar síntomas tras la ingesta de pescado. En el momento del estudio toleraba sardinas en lata, atún en aceite, boquerones y salmón fresco cocinado así como ahumado.

4.4.1.3. Efecto de la cocción y condiciones reductoras sobre los patrones proteicos y el posterior reconocimiento de la tropomiosina mediante inmunotransferencia

Para el diagnóstico serológico del paciente, se prepararon los extractos proteicos de los diferentes organismos (ver apartado [3.1.1.](#) de Material y Métodos) y se exploró previamente su patrón de proteínas mediante la tinción con azul Coomassie. Las proteínas de los extractos crudos y cocidos (100°C, 10 minutos) fueron separadas previamente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figuras 46-52). En general, la cocción parece potenciar la intensidad de las bandas de tropomiosina que aparecen entre los marcadores de 31 y 45 kDa mientras que las condiciones reductoras no parecen modificar el patrón proteico. Se observó degradación proteica tras la cocción en los extractos de lubina, atún, trucha, boquerón y atún enlatado (Figuras 48, 49 y 52).

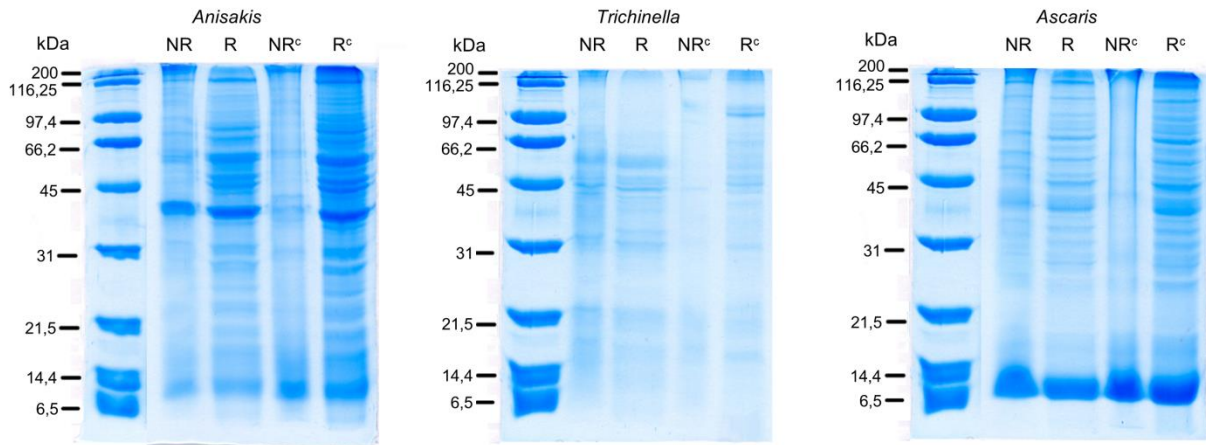


Figura 46. Tinción Coomassie de extractos proteicos de parásitos. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. [◦] Cocido (100°C, 10 minutos).

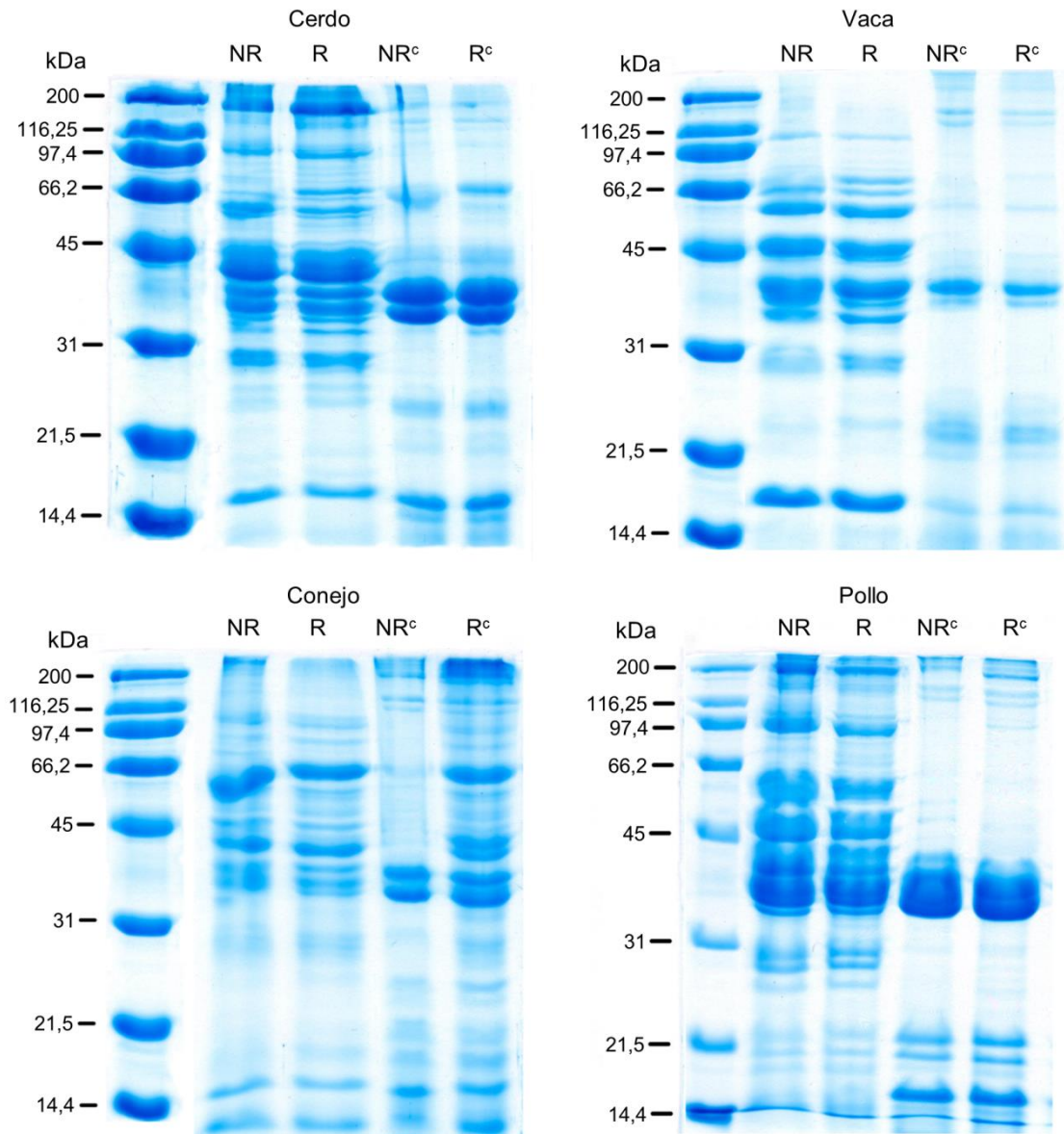


Figura 47. Tinción Coomassie de extractos proteicos de mamíferos y aves. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. [◦] Cocido (100°C, 10 minutos).

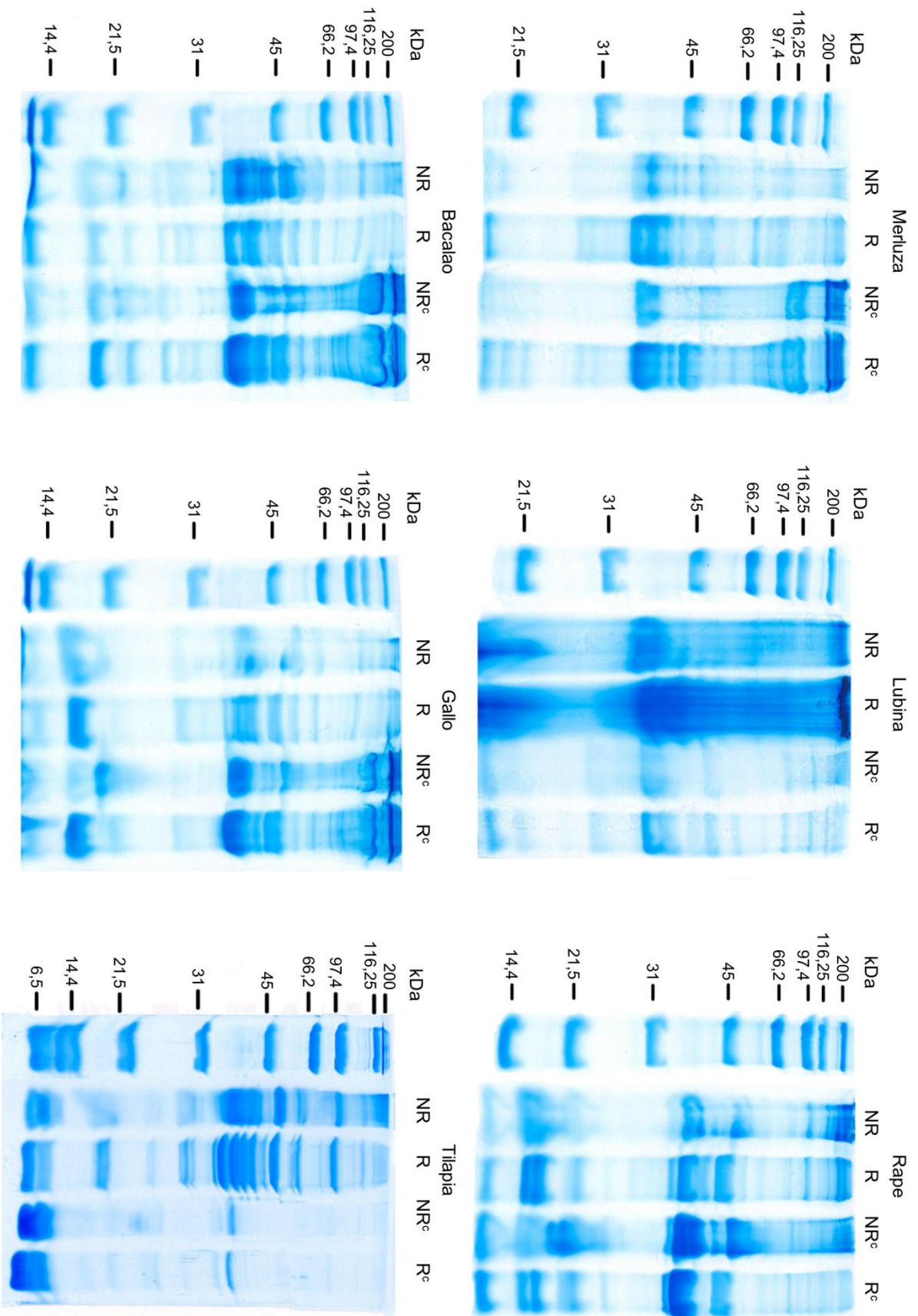


Figura 48. Tinción Coomassie de extractos proteicos de pescados blancos. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. ^c Cocido (100°C, 10 minutos).

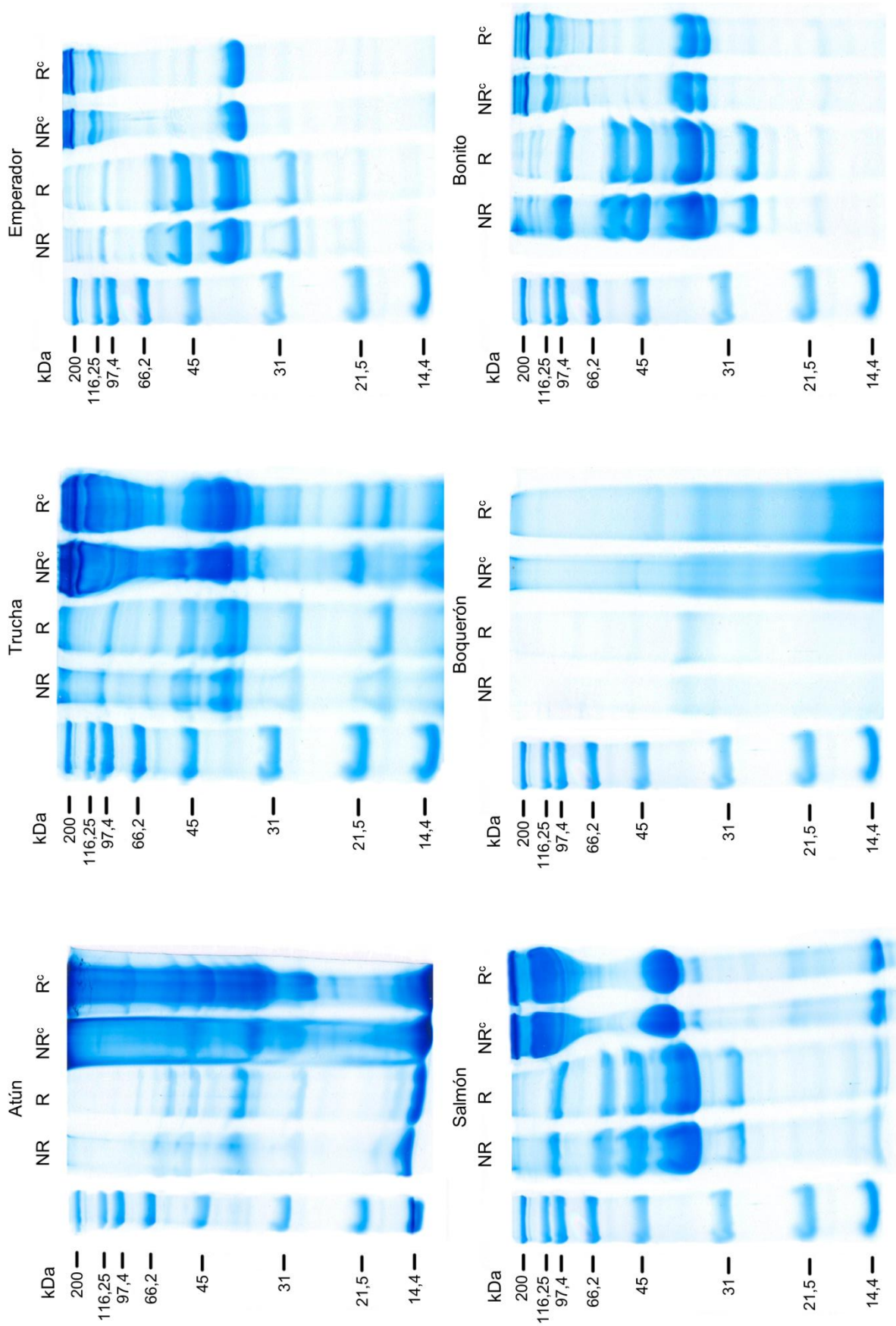


Figura 49. Tinción Coomassie de extractos proteicos de pescados azules. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. ° Coccido (100°C, 10 minutos).

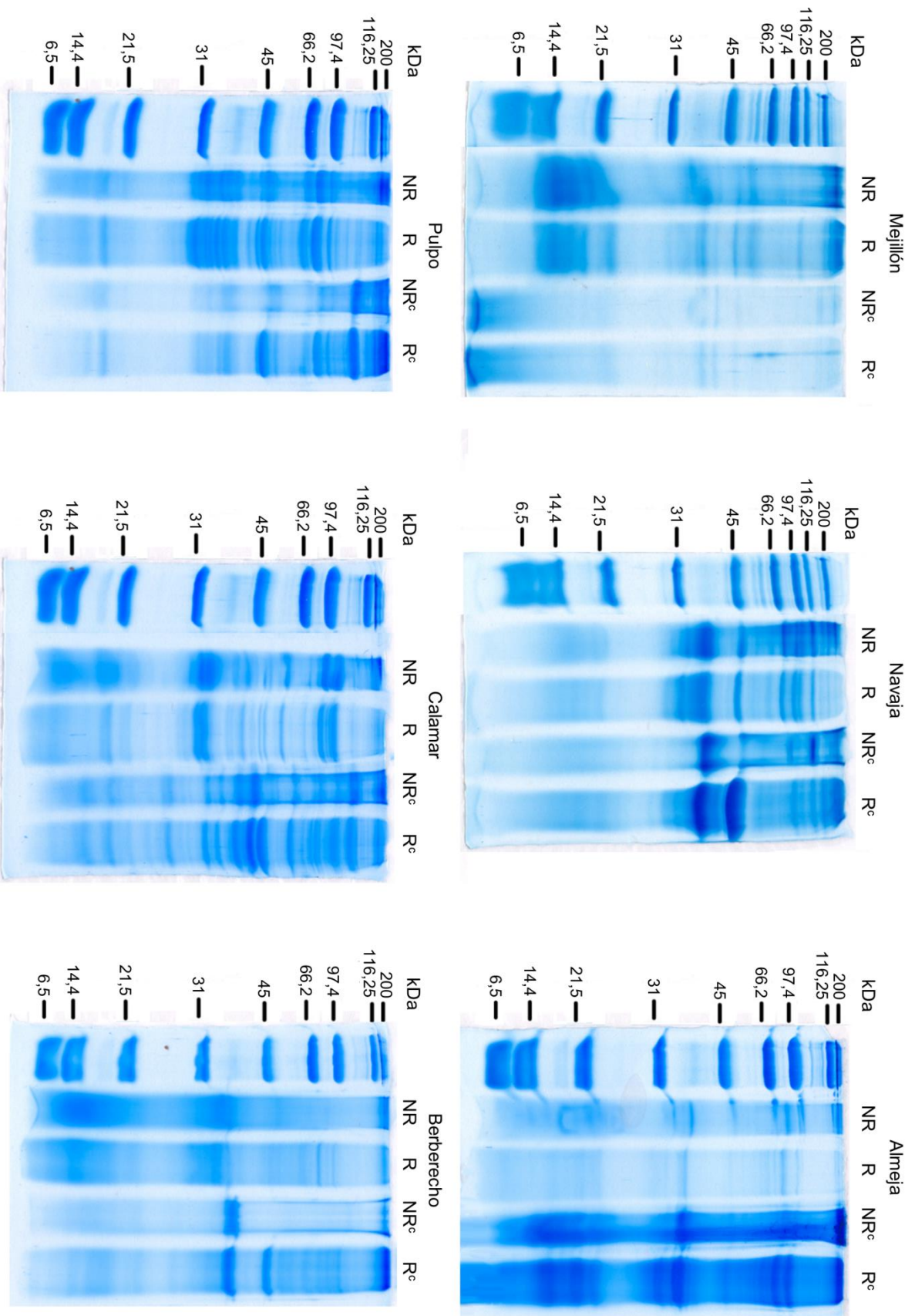


Figura 50. Tinción Coomassie de extractos proteicos de moluscos. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. ° Coccido (100°C, 10 minutos).

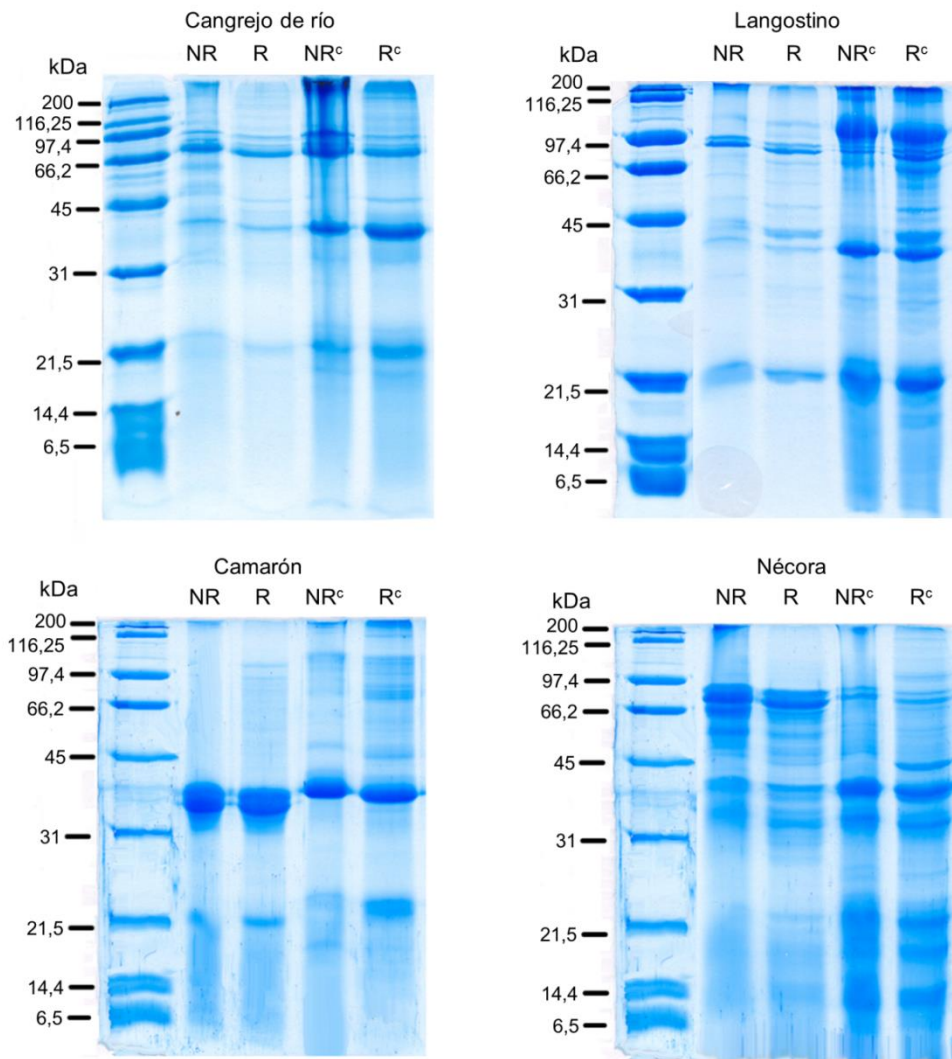


Figura 51. Tinción Coomassie de extractos proteicos de crustáceos. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. ^c Cocido (100°C, 10 minutos).

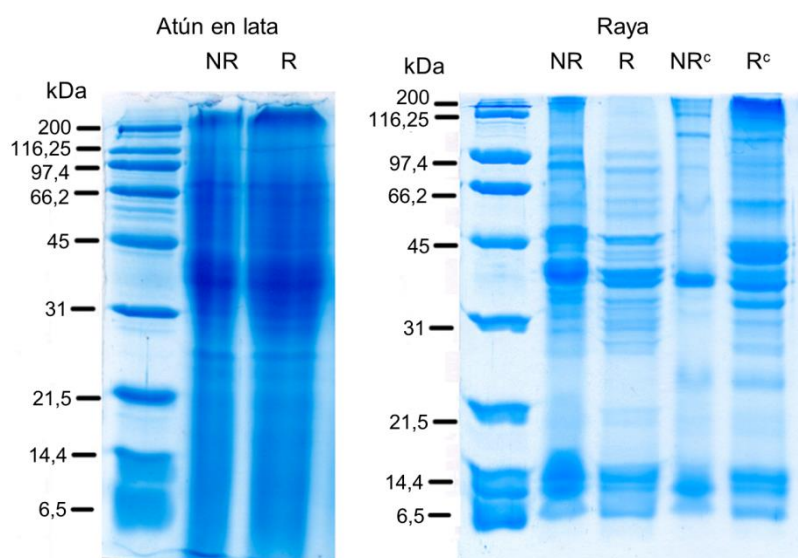


Figura 52. Tinción Coomassie de extractos proteicos de atún enlatado y raya. NR: En condiciones no reductoras. R: En condiciones reductoras. ^c Cocido (100°C, 10 minutos).

4.4.1.4. Pruebas cutáneas y diagnóstico serológico

Al paciente se le realizaron pruebas cutáneas con una batería de extractos alérgicos (ALK-Abelló, Madrid, España), presentando en los casos positivos un habón de, al menos, 5×6 mm (el control de histamina presentó 5×5 mm). Las pruebas cutáneas resultaron positivas frente a los alérgenos inhalantes: *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Goghieria fusca* y *Blatella germanica*. Ningún otro alérgeno perenne o estacional resultó positivo. Con respecto a los alérgenos considerados alimentarios, las pruebas cutáneas fueron positivas frente a gambas y camarones, pulpo y rape pero negativas frente a merluza, atún, bacalao, gallo y sardina. Hay que resaltar que el paciente también resultó positivo a *Anisakis*. El test *Prick by Prick*, que se realiza empleando en fresco el alimento desencadenante de la reacción alérgica sobre la piel del paciente, también fue negativo con merluza, tanto cruda como cocida, así como con bacalao y sardina (Tabla 21).

La IgE total fue de 688 kU/l y la IgE específica, también determinada mediante ImmunoCAP[®], reveló positividad frente a *D. pteronyssinus* (45,00 kU/l), *L. destructor* (28,90 kU/l), almeja (12,10 kU/l), mejillón (7,15 kU/l), calamar (0,57 kU/l), *Anisakis* (7,02 kU/l), *Ascaris* (14,20 kU/l), atún (2,12 kU/l) y gallo (2,09 kU/l). Se obtuvieron resultados negativos, con una IgE específica menor de 0,35 kU/l, para sardina, rape y merluza. Los chips de ImmunoCAP[®] ISAC revelaron valores muy elevados frente a tropomiosinas nativas (n) y recombinantes (r) de *Anisakis*, gamba, ácaro y cucaracha [rAni s 3 (106 ISU-E), nPen m 1 (160 ISU-E), rDer p 10 (148 ISU-E), nBla g 7 (137 ISU-E)] (Tabla 21).

La IgE anti-tropomiosina de *A. simplex* (Ani s 3) fue determinada mediante ELISA captura, tal y como se ha descrito en el apartado [3.1.14.2](#) de Material y Métodos, pero utilizando el anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (Sigma-Aldrich). El suero del paciente mostró una D.O. leída a 490 nm de 0,279, lo que es indicativo de un resultado positivo. La ausencia de reacción positiva de la IgE del paciente frente al alérgeno recombinante Ani s 1 y frente al fragmento recombinante de Ani s 7 (t-Ani s 7) mediante ELISA indirecto (Trisakis 170[®]), confirmaron que el paciente no estuvo parasitado por las larvas de *Anisakis* debido a que el reconocimiento de t-Ani s 7 es indicativo de infección previa por *Anisakis* (Anadón *et al.*, 2010).

Los anticuerpos de tipo IgE presentes en el suero del paciente reconocieron las tropomiosinas de los extractos crudos y no reducidos de: merluza, rape, emperador, bonito, mejillón, navaja, cangrejo de río, langostino, almeja japonesa y berberecho (Figuras 53-59). Los patrones específicos se confirmaron con el anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311, que detectó las bandas de tropomiosina de los diferentes organismos. De las especies de pescados toleradas por el paciente, ninguna mostró bandas de IgE en las inmunotransferencias realizadas. Por el contrario, aquellos pescados que le producían los síntomas alérgicos mostraron bandas de IgE frente a tropomiosina (excepto raya y gallo) (Figura 55A y C, Figura 56C y F, Figura 55 E y Figura 59B).

Tabla 21. Positividad del suero del paciente frente a la tropomiosina, síntomas y resultados de las pruebas cutáneas e *in vitro* frente a diferentes organismos.

Filo/Clase	Organismo	SPT	IgE* (kU/l)	TRPM	Síntomas
Chordata					
<i>Mammalia</i>	<i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Bos Taurus</i> (Vaca)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	ND	ND	- ^b	No
<i>Aves</i>	<i>Gallus gallus</i> (Pollo)	ND	ND	- ^b	No
<i>Actinopterygii</i>	<i>Lophius piscatorius</i> (Rape)	+	<0,35	+ ^b	Si
	<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Tilapia mozambiqueña)	ND	ND	- ^b	ND
	<i>Thunnus alalunga</i> (Bonito)	ND	ND	+ ^b	Si
	<i>Thunnus thynnus</i> (Atún del Atlántico)	-	2,12	- ^b	No
	<i>Xiphias gladius</i> (Emperador)	ND	ND	+ ^b	Si
	<i>Lepidobombus whiffiagonis</i> (Gallo)	-	2,09	- ^b	Si
	<i>Merluccius merluccius</i> (Merluza europea)	-	<0,35	+ ^b	Si
	<i>Gadus morhua</i> (Bacalao del Atlántico)	-	ND	- ^b	No
	<i>Salmo salar</i> (Salmón del Atlántico)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Salmo trutta</i> (Trucha)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Engraulis encrasicolus</i> (Boquerón europeo)	ND	ND	- ^b	No
	<i>Chondrichthyes</i>	<i>Raja brachyura</i> (Raya)	ND	ND	- ^b
Mollusca					
<i>Bivalvia</i>	<i>Ensis arcuatus</i> (Navaja)	ND	ND	+ ^b	Si
	<i>Cerastoderma edule</i> (Berberecho)	ND	ND	+ ^b	Si
	<i>Ruditapes philippinarum</i> (Almeja japonesa)	ND	12,10	+ ^b	Si
	<i>Mytilus edulis</i> (Mejillón)	ND	7,15	+ ^b	Si
<i>Cephalopoda</i>	<i>Loligo vulgaris</i> (Calamar)	ND	0,57	(+ ^b)	Si
	<i>Octopus vulgaris</i> (Pulpo)	+	ND	(+ ^b)	Si
Arthropoda					
<i>Malacostraca</i>	<i>Palaemon serratus</i> (Camarón)	ND	ND	(+ ^b)	Si
	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Langostino blanco)	+	ND	+ ^{b, c}	Si
	<i>Procambarus clarkii</i> (Cangrejo de río)	ND	ND	+ ^b	Si
	<i>Necora puber</i> (Nécora)	ND	ND	(+ ^b)	Si
<i>Arachnida</i>	<i>Dermatophagoides</i> spp. (Ácaro del polvo)	+	45,00	+ ^c	Si
	<i>Lepidoglyphus destructor</i> (Ácaro de almacén)	+	28,90	ND	Si
<i>Insecta</i>	<i>Blatella germanica</i> (Cucaracha)	+	ND	+ ^c	Si
Nematoda					
<i>Chromadorea</i>	<i>Anisakis simplex</i> L3 (Anisakis)	+	7,02	+ ^{a, b, c}	ND
	<i>Ascaris suum</i> adultos (Ascaris)	ND	14,20	(+ ^b)	ND
<i>Enoplea</i>	<i>Trichinella spiralis</i> L1 (Triquina)	ND	ND	(+ ^b)	ND

Abreviaturas: L3 Larva de tercer estadio, L1 Larva de primer estadio, * Determinación de IgE específica mediante ImmunoCAP®, TRPM: IgE anti-tropomiosina, ^a mediante ELISA captura, ^b mediante inmunotransferencia, ^c mediante ImmunoCAP® ISAC, + Positivo, - Negativo, ND: No determinado. Los paréntesis indican positividad de IgE anti-tropomiosina con bandas no confirmadas mediante el anticuerpo monoclonal TM311 (Sigma-Aldrich).

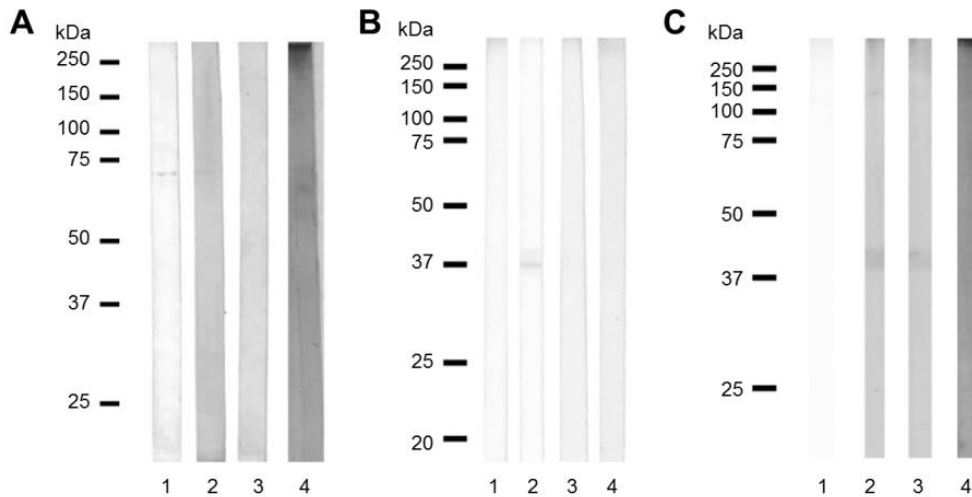


Figura 53. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: *Anisakis simplex*, B: *Trichinella spiralis* y C: *Ascaris suum*.

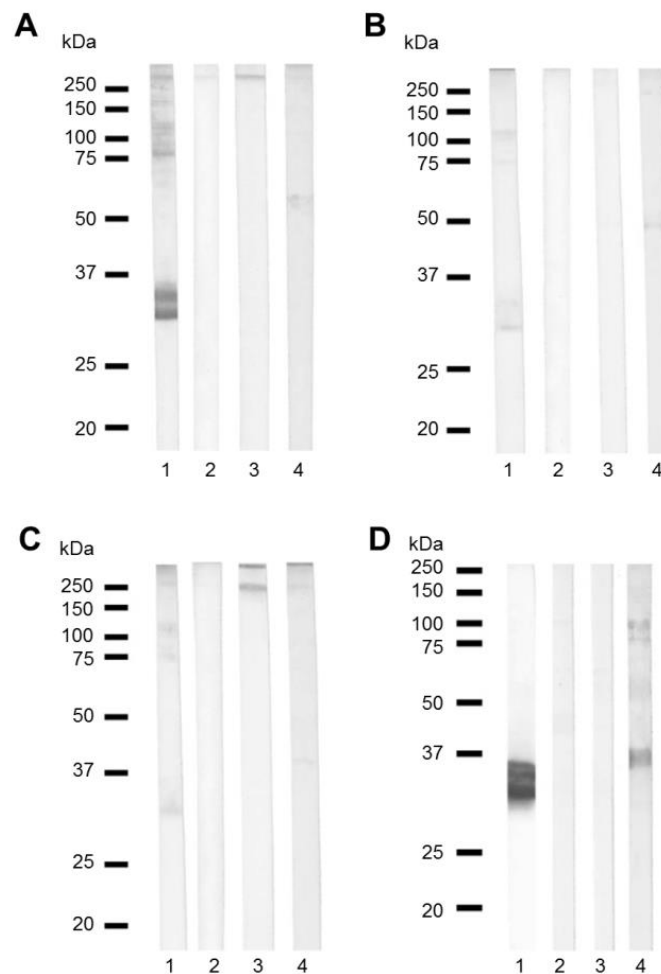


Figura 54. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: cerdo, B: vaca, C: conejo y D: pollo.

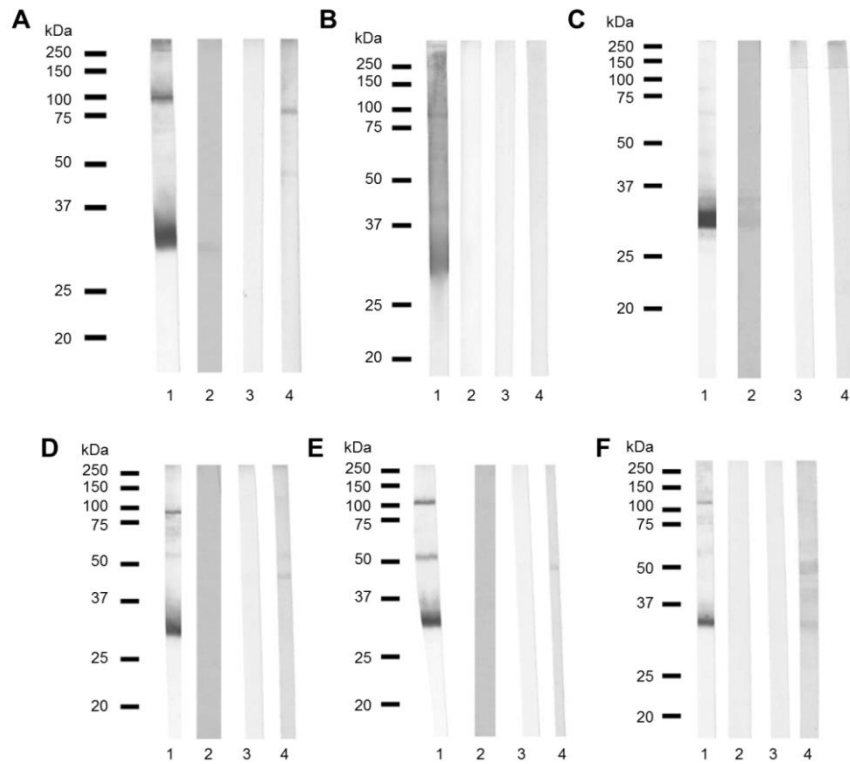


Figura 55. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: merluza, B: lubina, C: rape, D: bacalao, E: gallo y F: tilapia.

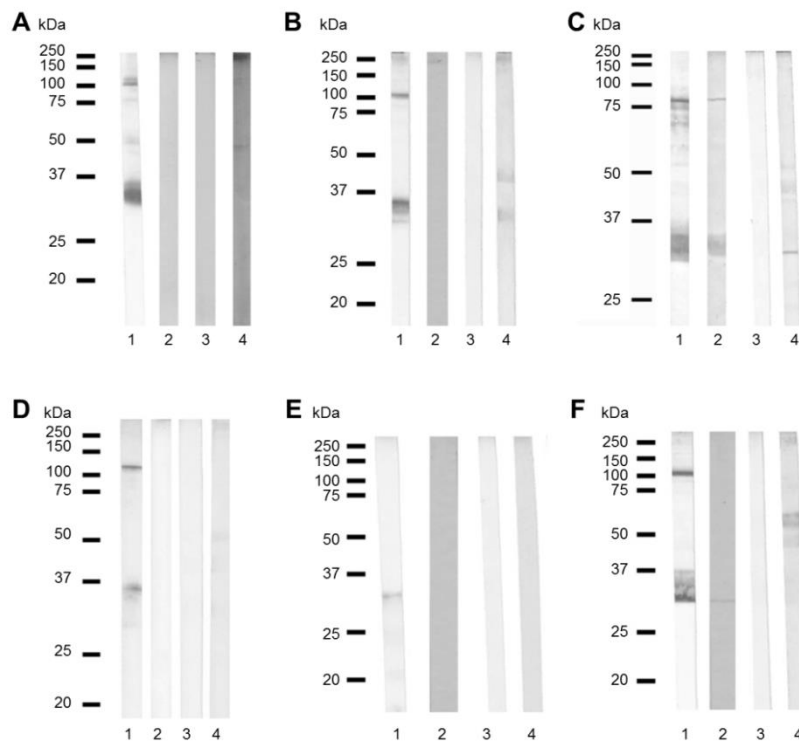


Figura 56. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: atún, B: trucha, C: emperador, D: salmón, E: boquerón y F: bonito.

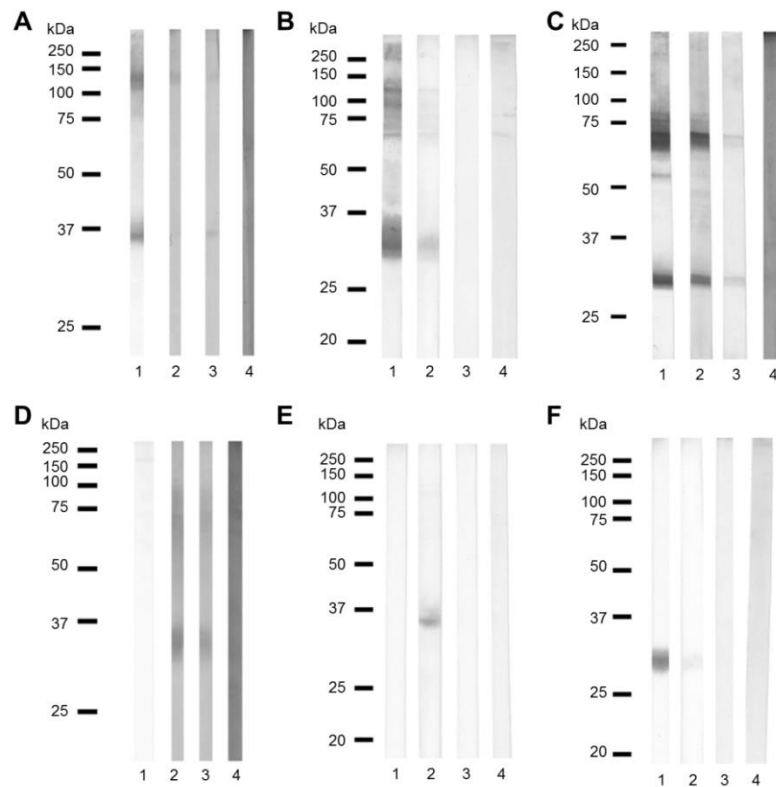


Figura 57. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: mejillón, B: navaja, C: almeja japonesa, D: pulpo, E: calamar y F: berberecho.

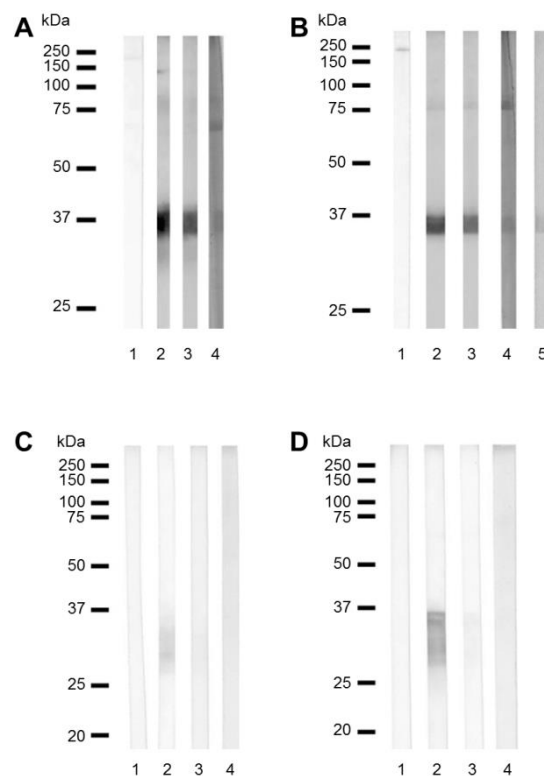


Figura 58. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: cangrejo de río, B: langostino (en la tira número 5 se transfirió la tropomiosina recombinante rPan b 1), C: camarón y D: nécora.

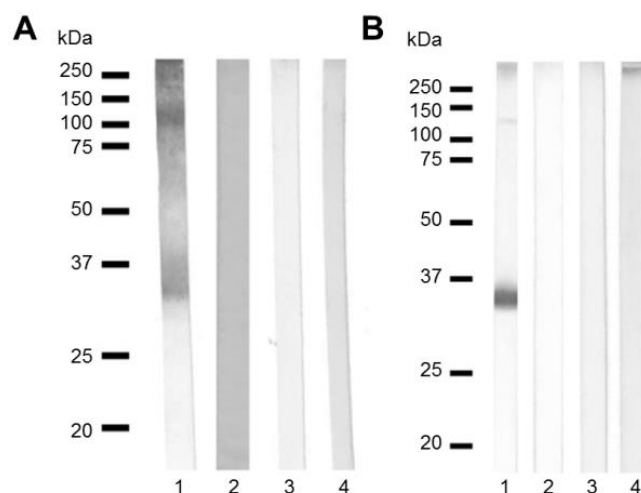


Figura 59. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: atún enlatado y B: raya.

La IgE y la IgA presentaron reactividad cruzada al reconocer ambas una banda de aproximadamente 75 kDa en el extracto de *Anisakis* (Figura 46A). Esta banda también fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311, lo que indica que, la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) es reconocida en forma de dímero.

Por otro lado los anticuerpos de la clase IgG4 del suero del paciente reconocieron las tropomiosinas de: cangrejo de río, langostino, camarón, nécora, mejillón, almeja japonesa, pulpo, cerdo y conejo (en estos dos últimos solo las formas de tropomiosina de alto peso molecular).

Finalmente, la IgA anti-tropomiosina se observó en el caso del atún, emperador, bonito, cangrejo de río, langostino, pulpo, mejillón y navaja.

4.4.2. Posible papel alérgico de la tropomiosina en pacientes con reacciones adversas tras la ingesta de pescado

4.4.2.1. Resumen

En el apartado anterior, se demostró que el reconocimiento de la tropomiosina de pescado por parte de la IgE de un paciente alérgico a pescado, estaba asociado con los síntomas gastrointestinales que padecía tras la ingesta de diferentes especies de peces. En este capítulo se realizó un estudio más amplio incluyéndose 19 pacientes que presentaron una historia clínica con al menos dos reacciones adversas tras la ingesta de pescado, pero que no habían dado resultados positivos a ninguna de las pruebas cutáneas que se les realizó empleando extractos comerciales de peces. Se determinaron los patrones de inmunorreconocimiento de la IgE frente a una batería de extractos de diferentes especies de pescado de consumo habitual en nuestra área geográfica, identificándose la tropomiosina en los diferentes extractos analizados por similitud con el patrón de bandas observado con un anticuerpo monoclonal comercial anti-tropomiosina.

La tropomiosina de pescado fue reconocida por 10 de los 19 pacientes mediante inmunotransferencia. Todos los pacientes con molestias gastrointestinales tras la ingesta de pescado (6/6) mostraron una

banda de IgE compatible con la tropomiosina. Las tropomiosinas del bacalao, bonito y emperador fueron reconocidas por la mayoría de los pacientes aunque tres de los 10 pacientes no afirmaron presentar reacciones adversas frente a esas especies de pescado. La tropomiosina podría ser un importante alérgeno en pacientes que presentan reacciones adversas recurrentes tras la ingesta de pescado.

4.4.2.2. Datos clínicos

En la Tabla 14 del apartado [3.1.7.](#) de Material y Métodos se resumen los datos sobre las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos según los criterios de selección mencionados. Durante tres años fuimos capaces de incluir prospectivamente 19 pacientes de los que 16 eran mujeres y tres hombres. La media de edad fue de $47 \pm 14,5$ años.

Catorce pacientes presentaron síntomas alérgicos (urticaria, prurito, molestias gastrointestinales o asma bronquial) previos al momento del reclutamiento o concomitantes tras la ingesta de marisco (pacientes 1-14; Tabla 14); de los cuales cinco presentaron IgE específica frente a crustáceos.

Cinco pacientes sin historia previa de alergia al marisco (pacientes 15-19; Tabla 14), reportaron síntomas gastrointestinales recurrentes tras la ingesta de pescado. Uno de ellos, sin alergia al marisco declarada, era (subclínicamente) positivo, presentando IgE específica frente a crustáceos.

De todos los sujetos incluidos en el estudio, 10 pacientes reportaron urticaria tras la ingesta de pescado, dos pacientes afirmaron presentar síntomas de urticaria además de síntomas gastrointestinales (uno de ellos además sufría síndrome de alergia oral), tres pacientes afirmaron tener prurito y cuatro reportaron solo síntomas gastrointestinales.

Siete pacientes tenían urticaria crónica activa (dos de ellos con urticaria al frío) y reportaron una exacerbación tras la ingesta de pescado, uno de los cuales afirmó presentar también síntomas gastrointestinales tras la ingesta de pescado.

Trece pacientes estaban sensibilizados a *Anisakis*, aunque solo cuatro de ellos presentaron una historia clara de anisakiosis gastroalérgica previa, no relacionada con las nuevas molestias tras la ingesta de pescado.

4.4.2.3. IgE frente a tropomiosina

En la Tabla 22 se resumen los síntomas específicos frente a cada pescado y la presencia de bandas detectadas en las inmunotransferencias, al igual que la posible IgE anti-tropomiosina para todos los pacientes estudiados y especies de pescado.

Diecisiete pacientes mostraron al menos una banda visible y en 10 de éstos fue detectada una banda entre 25-37 kDa con un peso molecular idéntico al obtenido empleando el anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina para, al menos, una especie de pescado. Además, en siete de ellos la IgE anti-tropomiosina fue detectada frente a las especies de pescado cuya ingesta estuvo relacionada con los síntomas.

Tabla 22. Síntomas específicos y bandas detectadas por la IgE de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.

Paciente	Merluza	Lubina	Rape	Bacalao	Gallo	Emperador	Bonito	Boquerón
1			OB				URT	
2	PRU			PRU TM+OB	PRU	PRU		ND
3			OB	TM+OB		URT		
4	URT OB			URT OB	URT	URT		ND
5								URT+OAS*
6	URT	OB					C	ND
7				URT TM+OB				URT
8				URT OB			OB	ND
9				OB			URT OB	ND
10								URT
11		OB	OB	OB				URT
12			OB	OB		OB	TM+OB	URT
13	PRU	PRU	PRU OB	PRU	PRU	PRU		ND
14	GI	OB	GI				GI TM+OB	ND
15			GI	TM		GI	GI	GI
16		PRU+GI	PRU+GI	PRU+GI TM			PRU+GI TM+OB	ND
17			OB	GI+URT TM		GI+URT		URT
18	GI		OB	GI OB		TM	GI TM+OB	ND
19					TM	GI TM	GI	GI

URT: urticaria; PRU: prurito; SAO: síndrome de alergia oral; GI: molestias gastrointestinales; C: conjuntivitis. TM: reconocimiento de tropomiosina, OB: reconocimiento de otras bandas. Vacío: negativo. ND: no determinado.* indica síntomas GI observados tras la ingesta de sardinas. El anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (Sigma-Aldrich) fue utilizado como control.

Cuando analizamos por subgrupos los 10 pacientes que mostraron reconocimiento de una banda entre 25-37 kDa indicativa de una posible IgE anti-tropomiosina de pescado, se obtuvieron las siguientes tasas de positividad: 5/14 pacientes con síntomas concomitantes frente al marisco; 0/5 pacientes con

IgE específica confirmada frente a crustáceos; 6/6 pacientes con molestias gastrointestinales tras la ingesta de pescado; 6/13 pacientes sensibilizados a *Anisakis* y 3/7 pacientes con urticaria crónica.

Cuatro de los 19 pacientes incluidos en el estudio mostraron IgE frente a diferentes proteínas en la inmunotransferencia del extracto de *Anisakis* (pacientes 3, 10, 11 y 12), siendo tres de ellos pertenecientes al grupo de los que presentaron previamente anisakiosis gastroalérgica (pacientes 3, 10 y 12) (Figura 60).

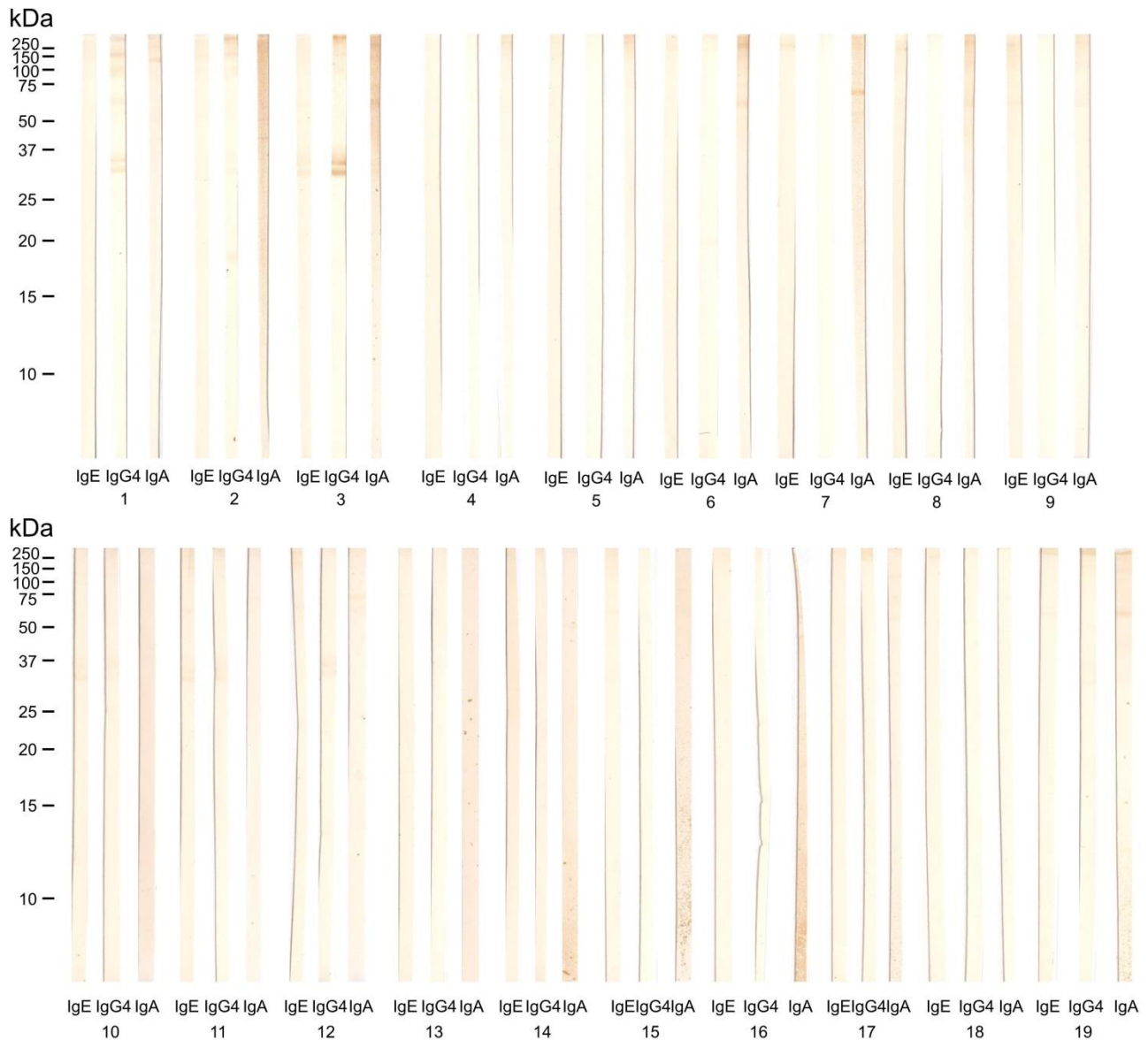


Figura 60. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de larvas de tercer estadio de *Anisakis simplex sensu lato*.

Con respecto al análisis de los pacientes con IgE detectable frente a la tropomiosina de pescado, como puede observarse en la Tabla 22 y en detalle en las Figuras 64, 65, 66 y 67; esta banda de IgE coincidente con el peso molecular de la tropomiosina fue detectada frecuentemente frente a bacalao, bonito, solo en dos ocasiones frente a emperador y una vez frente a gallo. No se observó positividad frente a los extractos de merluza, lubina y rape. Para el extracto de boquerón no fue posible obtener más resultados debido a las limitaciones de suero.

Cabe destacar que además de en los que pacientes se indican en la Tabla 22, se observó una banda muy tenue cuyo peso molecular encaja con el de la tropomiosina en las inmunotransferencias de algunos pacientes frente a los extractos de bacalao, emperador y bonito (Figuras 64, 66 y 67). Sin embargo, solo las bandas claramente observables en las figuras se consideraron positivas. Con frecuencia, los pacientes afirmaban presentar síntomas con tres o cuatro especies, aunque las inmunotransferencias revelaron positividad solo frente a una o dos especies. En tres casos (3/10), se detectó positividad frente a especies de peces frente a los que los pacientes no reaccionaban clínicamente.

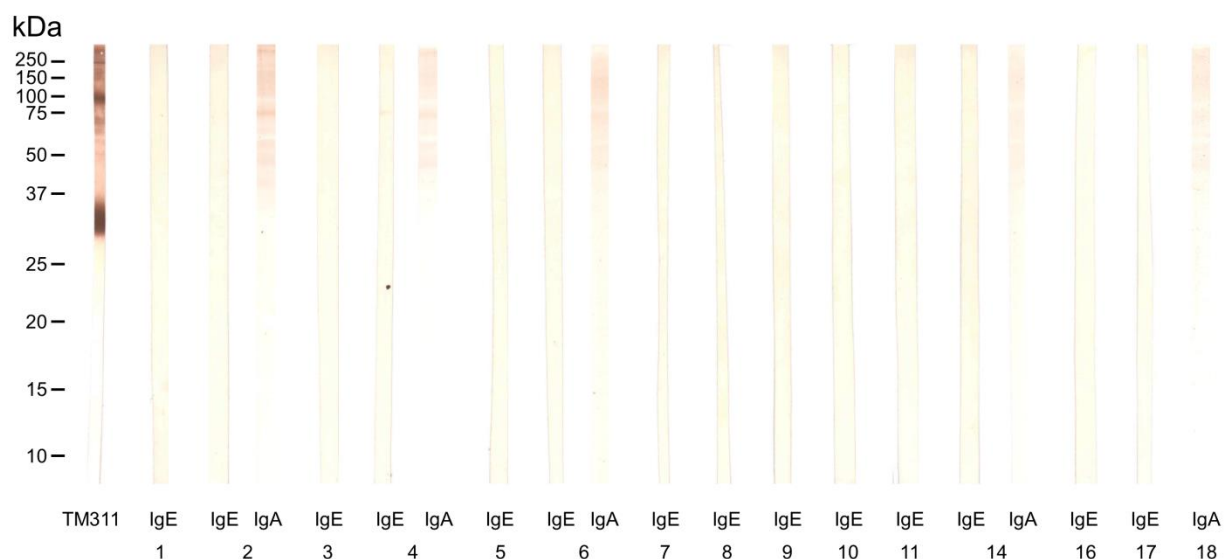


Figura 61. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Merluccius merluccius* (Merluza europea). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

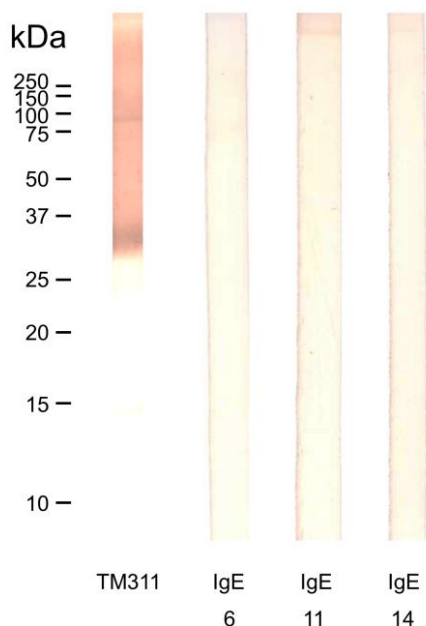


Figura 62. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Dicentrarchus labrax* (Lubina). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

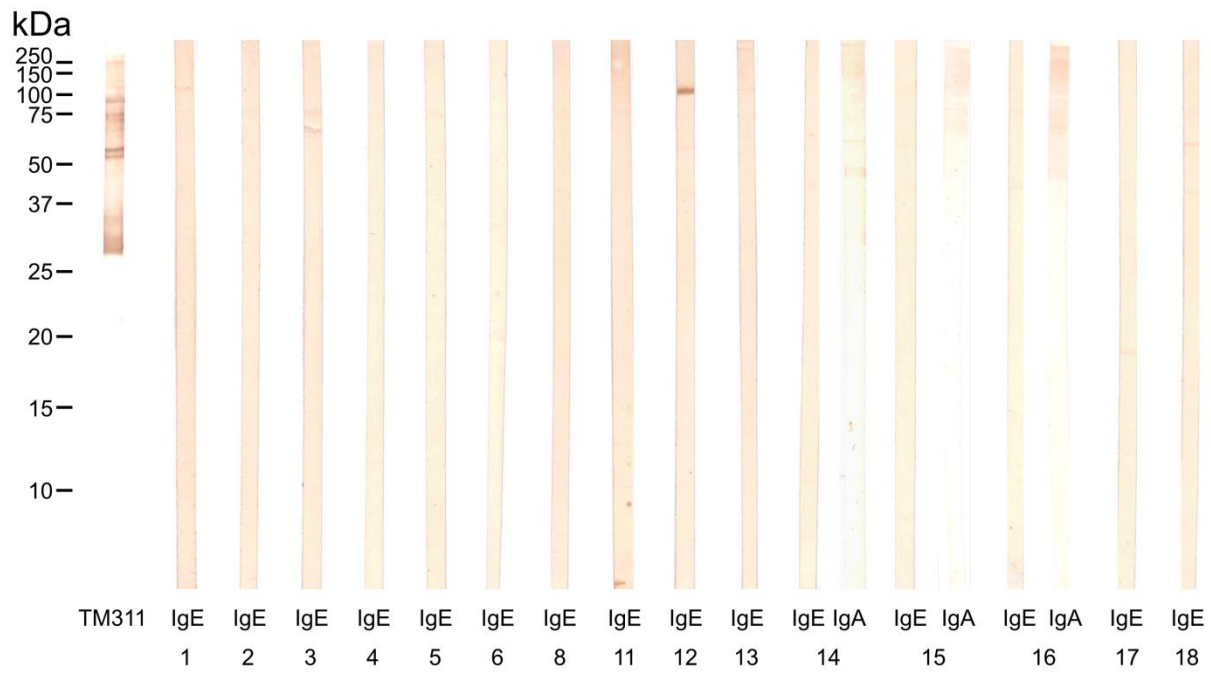


Figura 63. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Lophius piscatorius* (Rape). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

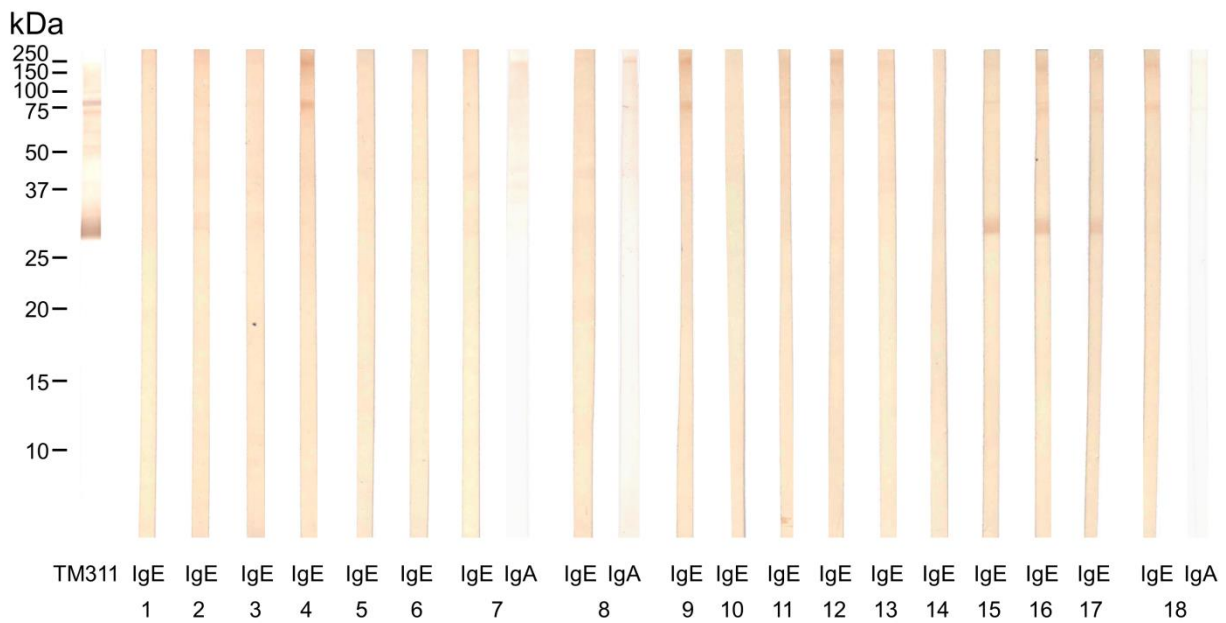


Figura 64. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Gadus morhua* (Bacalao del Atlántico). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

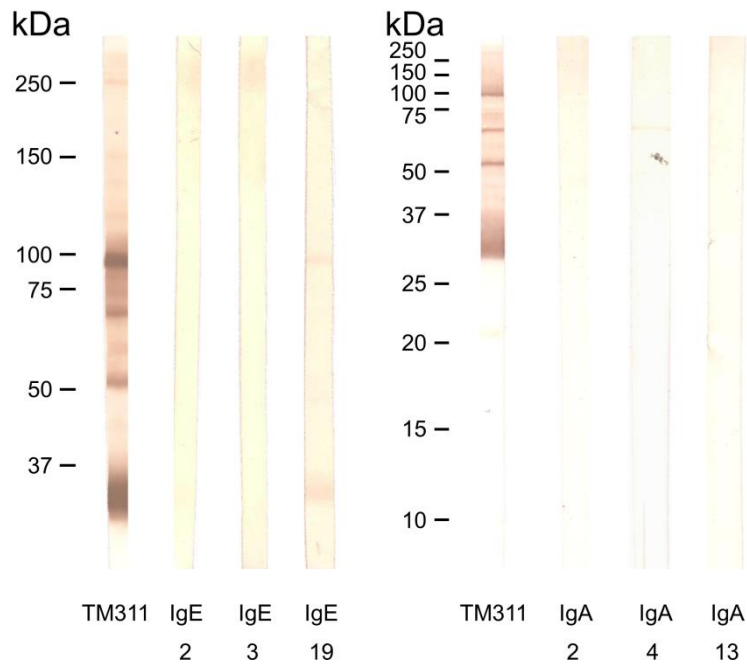


Figura 65. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Lepidorhombus whiffiagonis* (Gallo). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

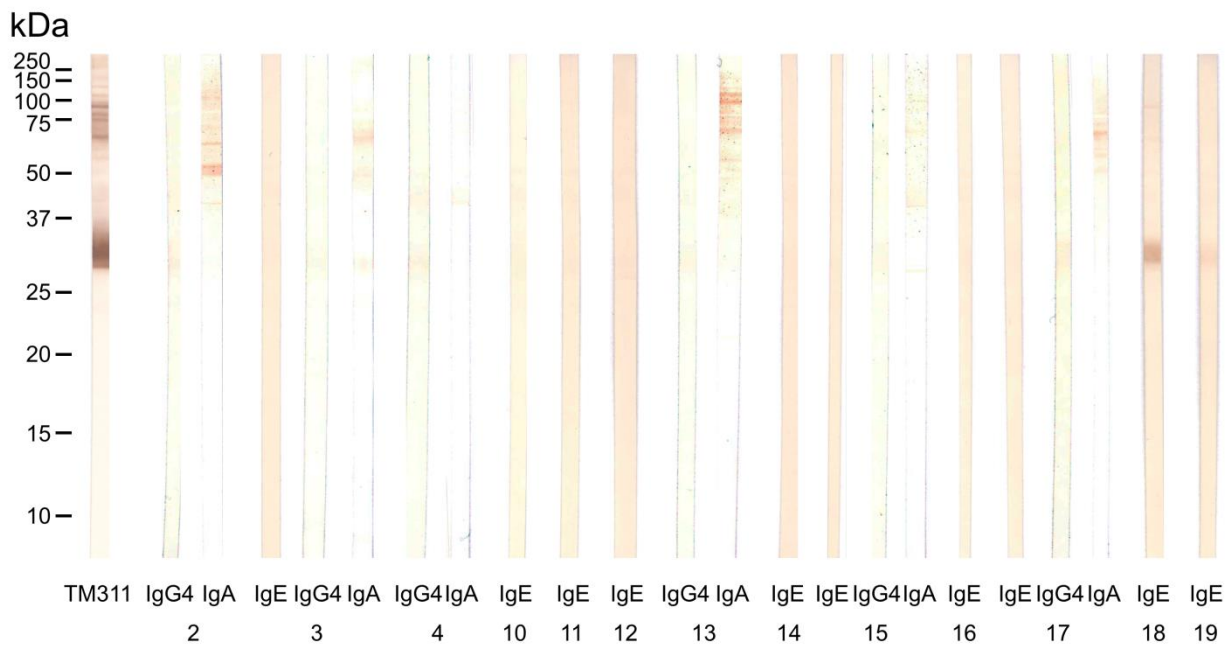


Figura 66. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Xiphias gladius* (Emperador). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

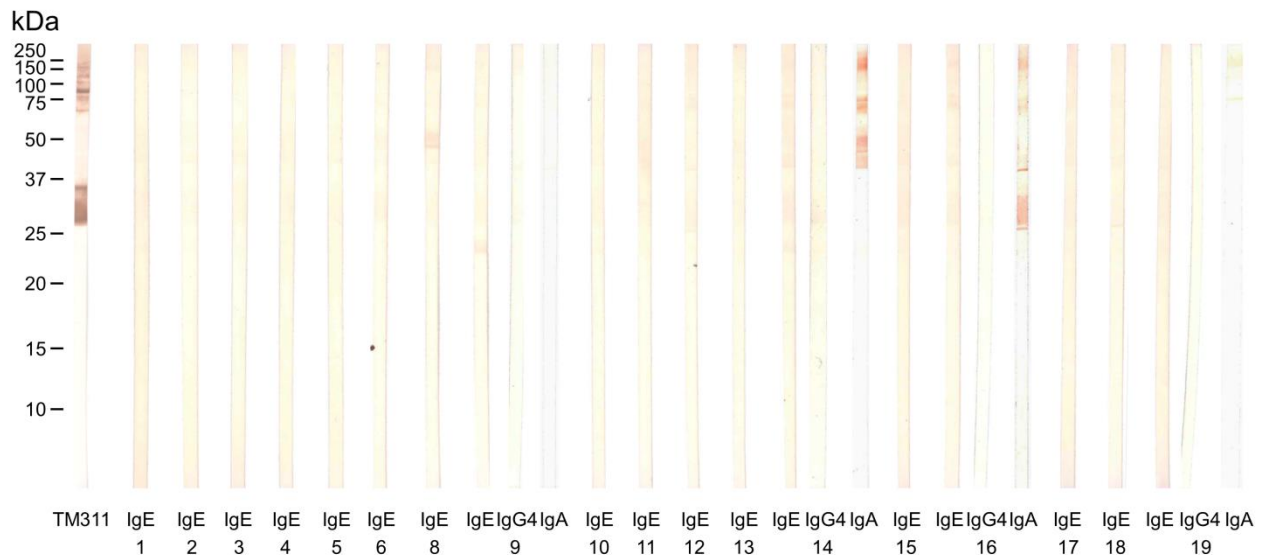


Figura 67. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de *Thunnus alalunga* (Bonito). Las tiras sin bandas o sombras no se muestran.

4.4.2.4. IgG4 e IgA frente a tropomiosina

La respuesta compatible con el reconocimiento de la tropomiosina por parte de la IgG4 se observó únicamente en los seis sueros estudiados frente a emperador y en uno solo de los cuatro sueros enfrentados al extracto de bonito (Figuras 66 y 67; y Tabla 23).

Tabla 23. Bandas detectadas por la IgG4 de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.

Paciente	Merluza	Lubina	Rape	Bacalao	Gallo	Emperador	Bonito	Boquerón
1	ND	ND	ND		ND	ND	ND	
2		ND	ND			TM	ND	ND
3	ND	ND	ND		ND	TM	ND	
4		ND	ND			TM	ND	ND
5	ND	ND	ND		ND	ND	ND	
6		ND	ND			ND	ND	ND
7	ND	ND	ND			ND	ND	
8	ND	ND	ND			ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND
10	ND	ND	ND			ND	ND	
11	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
12	ND	ND	ND	ND		ND	ND	
13	ND		ND			TM	ND	ND
14		ND				ND	TM	ND
15	ND	ND				TM	ND	
16	ND			ND		ND		ND
17	ND	ND	ND			TM	ND	
18		ND	ND			ND	ND	ND
19	ND	ND	ND			ND		

TM: reconocimiento de tropomiosina, **OB**: reconocimiento de otras bandas. Vacío: negativo. ND: no determinado. El anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (Sigma-Aldrich) fue utilizado como control.

La IgA anti-tropomiosina fue positiva en 3/6 sueros frente a emperador, en 1/3 frente a rape, en 1/3 frente a bacalao y en 1/4 frente a bonito (Figuras 66, 63, 64 y 67; y Tabla 24).

Tabla 24: Síntomas específicos y bandas detectadas por la IgA de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.

Paciente	Merluza	Lubina	Rape	Bacalao	Gallo	Emperador	Bonito	Boquerón
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	OB	ND	ND	ND		OB	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	TM+OB	ND	ND
4	OB	ND	ND	ND	OB	OB	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	OB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	TM+OB	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	OB	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND		ND	ND		TM+OB	ND	ND
14	OB	ND	TM+OB	ND	ND	ND	OB	ND
15	ND	ND	OB	ND	ND	TM+OB	ND	ND
16	ND		OB	ND	ND	ND	TM+OB	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	OB	ND	ND
18	OB	ND	ND	OB	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	OB	ND

TM: reconocimiento de tropomiosina, **OB:** reconocimiento de otras bandas. Vacío: negativo. ND: no determinado. El anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (Sigma-Aldrich) fue utilizado como control.

4.5. Hemoglobina de *Anisakis* (Ani s 13) recombinante vs nativa: su valoración como nuevo alérgeno de referencia para el diagnóstico

4.5.1. Resumen

Los alérgenos recombinantes son actualmente la mejor opción para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana en términos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, estudios previos han demostrado que existe un cierto número de pacientes con anisakiosis que son negativos a Ani s 7 y especialmente a Ani s 1. La hemoglobina de *Anisakis* ha sido caracterizada recientemente como un alérgeno principal del parásito (Ani s 13). Aunque Ani s 13 pertenece a una familia de proteínas conservadas, parece que no tiene un carácter panalérgico debido a la ausencia observada de reactividad cruzada de la IgE frente a la hemoglobina de *Ascaris* en pacientes de *Anisakis*. El objetivo de este estudio consiste en desarrollar una herramienta de diagnóstico más sensible y específica para *Anisakis* basada en el alérgeno recientemente descubierto, Ani s 13. Se obtuvo y se purificó la hemoglobina de *Anisakis* tanto en su forma recombinante (rAni s 13) como en su estado nativo (nAni s 13). El reconocimiento de las hemoglobinas, recombinante y nativa, por la IgE anti-hemoglobina del suero de pacientes se evaluó mediante ELISA indirecto e inmunotransferencia utilizando 43 pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* y 44 pacientes no sensibilizados a *Anisakis*. La hemoglobina nativa de *Anisakis* (nAni s 13) fue tratada con peryodato para estudiar si la oxidación de los glicanos interfería con la unión del anticuerpo. Además, nAni s 13 se caracterizó estructuralmente por microscopía electrónica y ultracentrifugación analítica. La hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13) solo fue reconocida por cuatro pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) mediante ELISA pero no mostraron bandas mediante inmunotransferencia. Sin embargo, nAni s 13 fue detectado por el 72,1% de los pacientes sensibilizados con *Anisakis* por ELISA indirecto. Particularmente, 18 (90%) de los 20 pacientes con AGA fueron positivos. Los tetrámeros y octámeros fueron los oligómeros más abundantes de nAni s 13, pero los octámeros fueron los que presentaron un mayor contenido de grupo hemo unido. Ninguno de los pacientes que no estaba sensibilizado a *Anisakis* resultó positivo. El uso de la forma nativa purificada de Ani s 13 en combinación con los alérgenos de referencia actuales mejoraría la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la anisakiosis.

4.5.2. Secuencia de la hemoglobina de *Anisakis simplex*

El marco abierto de lectura del cDNA identificado como hemoglobina de *A. simplex* (GenBank: KX457699) consta de 999 bp. La secuencia traducida de 332 aminoácidos, presentó 10 aminoácidos diferentes con respecto a la secuencia de la hemoglobina de *A. pegreffii* (GenBank: [AFY98826](#)) (Figura 68). Tres de ellos (posiciones 93, 94 y 98) fueron aminoácidos similares. Los porcentajes de similitud e identidad entre las hemoglobinas de ambas especies de *Anisakis* fueron del 97,7% y del 96,7%, respectivamente. También se realizó el alineamiento con otras secuencias de hemoglobina de nematodos como *P. decipiens* (GenBank: [CAA77743.1](#)) y *A. suum* (GenBank: [AAA29374.1](#)) (Figura 68). La secuencia de la hemoglobina de *A. simplex* presentó un sitio de N-glicosilación Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa es cualquier aminoácido diferente de prolina) en la posición 217 (Figura 68) con una alta probabilidad (*Probability Score*=0,7756; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Ninguno de los sitios de O-glicosilación resulto ser predicho como positivo según NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013). La Thr 70 presentó una baja probabilidad de O-β-NAcGlc glicosilación (*Score* 0,4472 con un umbral de positividad de 0,4098) (Gupta y Brunak, 2002).

La hemoglobina parcial recombinante de *A. simplex* (rAni s 13) presentó tres mutaciones tras el subclonaje: C175Y, F253L y I265V.

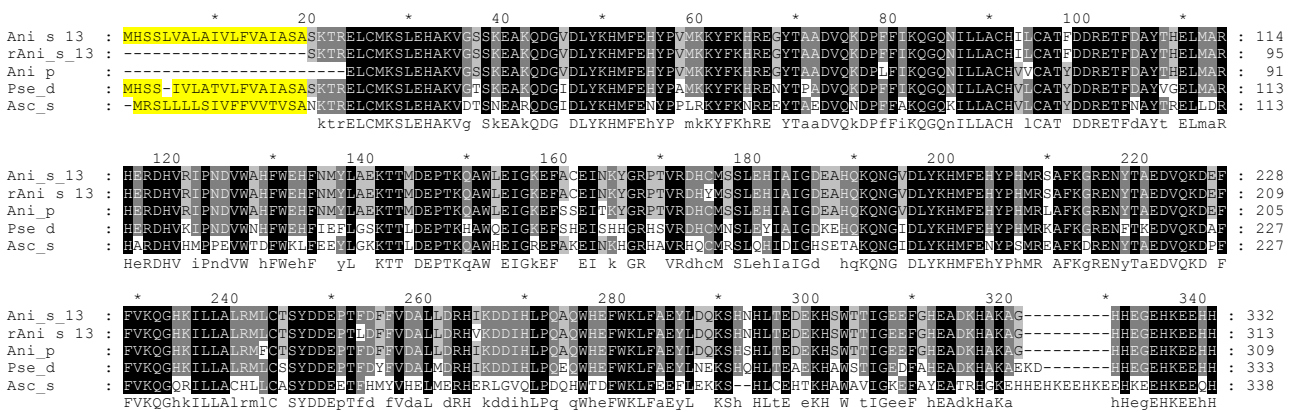


Figura 68. Alineamiento de la hemoglobina completa (Ani_s_13) y de la parcial recombinante (rAni_s_13) de *Anisakis simplex* con las hemoglobinas de *Anisakis pegreffii* (Ani_p), *Pseudoterranova decipiens* (Pse_d) y *Ascaris suum* (Asc_s). Péptidos señal resaltados en amarillo: posiciones del alineamiento 1-20.

4.5.3. IgE específica frente a Ani s 13 recombinante

La IgE específica frente a rAni s 13 fue medida mediante ELISA indirecto. Los sueros fueron considerados positivos si la D.O. fue mayor de M+3SD, donde M y SD son la media aritmética de la D.O. y la desviación estándar obtenida con 14 sueros control sin diagnóstico de urticaria ni sensibilización a *Anisakis*. Este valor de corte de D.O. fue de 0,022. Los sueros de los grupos UC+ (N=23), UC- (N=21), y C (N=22) fueron negativos exceptuando cuatro (21%) de los 19 pacientes con AGA analizados (Figura 69). Esos cuatro sueros positivos, presentaron bajas D.O. (0,033, 0,035, 0,054 y 0,078). De los 20 pacientes AGA y 23 UC+ sensibilizados a *Anisakis* no se observó ninguna banda de reconocimiento de IgE frente a rAni s 13 mediante inmunotransferencia (Figura 70). Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g (IgG1), la IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 13 y la IgG1 sérica de ratón inmunizado con el antígeno total de *Anisakis* reconocieron rAni s 13 (Figura 71).

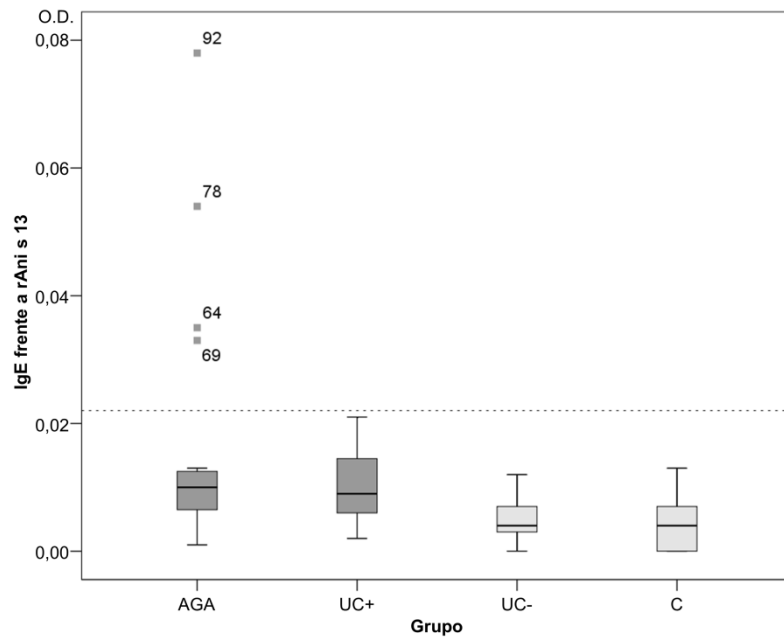


Figura 69. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-hemoglobina de *Anisakis* recombinante (rAni s 13). AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=19). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=23). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=21). C: Controles (N=22). El valor umbral de positividad se indica con una línea de puntos.

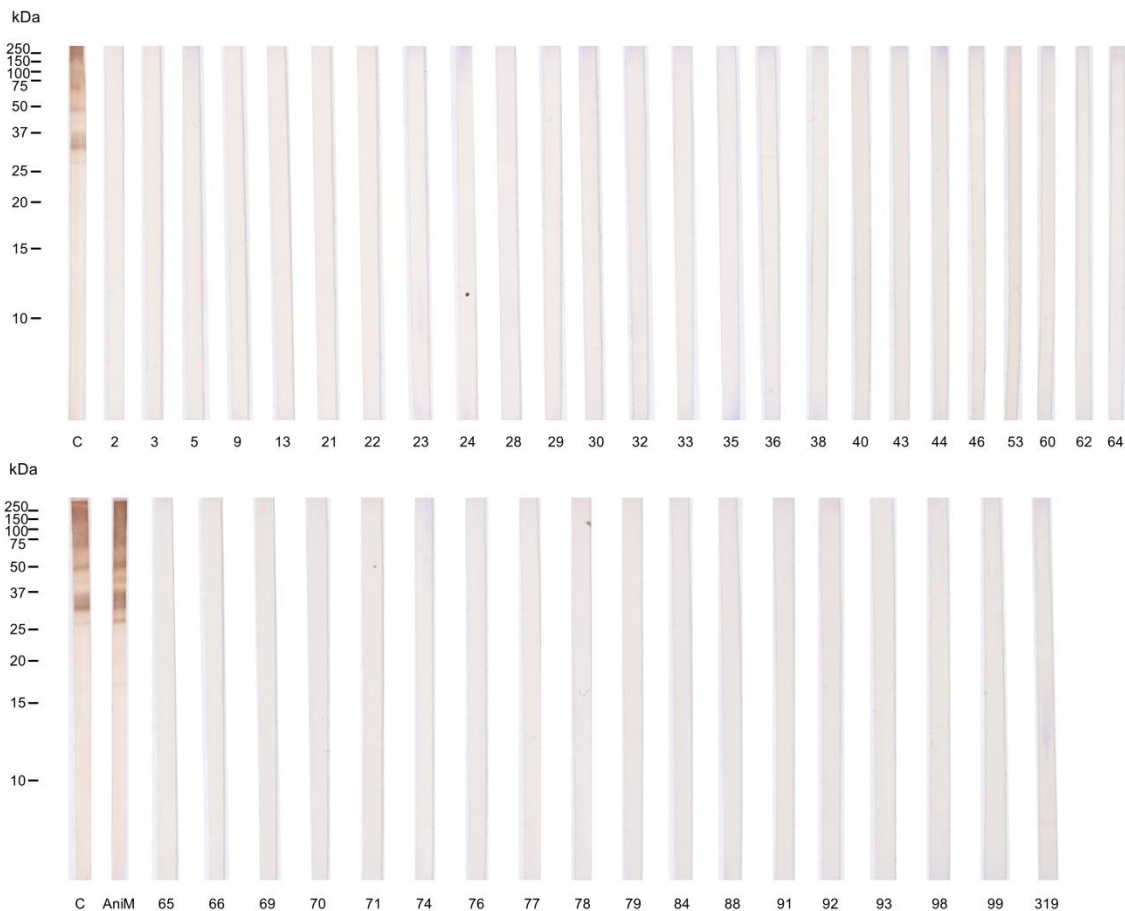


Figura 70. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE sérica de los individuos sensibilizados a *Anisakis* frente a la hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13). C: IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 13. AniM: IgG1 sérica de ratón inmunizado con el antígeno total de *Anisakis*.

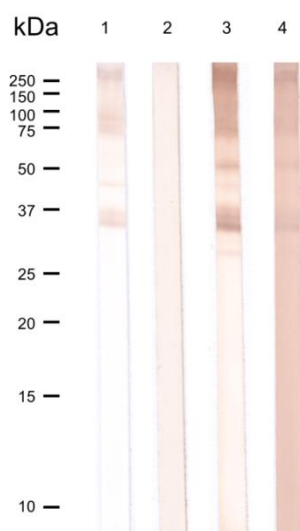


Figura 71. Análisis de la hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13) mediante inmunotransferencia. Carriles: 1: Anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g (IgG1), 2: IgE sérica de un paciente positivo a la hemoglobina de *Anisakis*, 3: IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 13, 4: IgG1 sérica de ratón inmunizado con el antígeno total de *Anisakis*.

4.5.4. Inmunización de ratones con Ani s 13 recombinante

La hemoglobina recombinante de *Anisakis* rAni s 13 resultó ser inmunogénica. La IgG1 específica inducida por rAni s 13 en los ratones reconoció tanto rAni s 13 como la hemoglobina nativa presente en el extracto total de *Anisakis* mediante ELISA indirecto. La menor proporción de Ani s 13 en el extracto total de *Anisakis* se corresponde con un nivel más bajo de reconocimiento (Figura 72). La inmunotransferencia realizada con el suero tras la inhibición de la IgG1 de ratones inmunizados con rAni s 13 confirmó que los ratones inmunizados reconocían la hemoglobina de *Anisakis* tanto en su forma nativa como la recombinante (Figura 73).

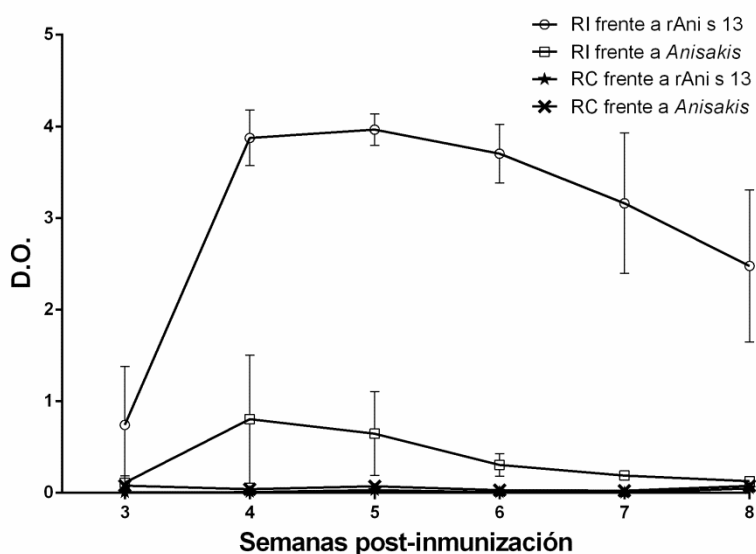


Figura 72. Niveles de IgG1 inducidos por la hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13). Se inmunizaron ratones BALB/c (N=3) con rAni s 13 purificada. Las muestras de suero fueron obtenidas semanalmente y los ELISA indirectos se realizaron frente a rAni s 13 o frente al extracto total de *Anisakis*. Se muestran los valores medios de D.O. a 490 nm \pm S.D. RI: Ratón inmunizado. RC: Ratón control.

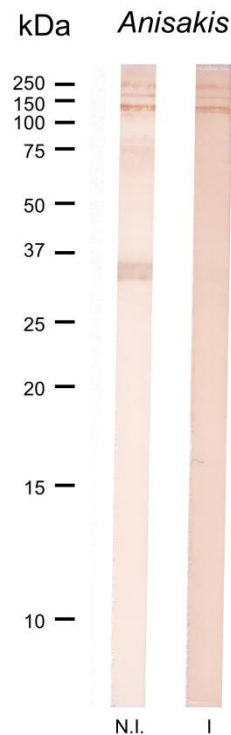


Figura 73. Inmunotransferencia de inhibición de IgG1 con hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13). El suero de ratón inmunizado con hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13) se incubó con rAni s 13 y tras la precipitación de los inmunocomplejos el sobrenadante fue incubado frente al extracto total transferido de *Anisakis*. N.I.: Suero de ratón no inhibido. I: Suero de ratón inhibido.

4.5.5. Purificación de nAni s 13

La cromatografía de intercambio aniónico del precipitado rojo obtenido de la ultracentrifugación de las larvas de tercer estadio de *Anisakis*, permitió la separación de las fracciones de hemoglobina tras sucesivas etapas de elución del DEAE-Sephacel. La hemoglobina de *Anisakis* eluyó con un tampón de concentración 150 mM de NaCl y 25 mM de Tris (pico 3). Todos los picos obtenidos (del 1 al 6) fueron analizados mediante SDS-PAGE junto al extracto inicial de *Anisakis* y los dos sobrenadantes tras las 6 h de ultracentrifugación (S1 y S2) (Figura 74). Los picos 1 y 3 con una banda a 37 kDa (sospechosa de ser hemoglobina) fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar inmunotransferencias y comprobar su unión al anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g y a un suero positivo a Ani s 13. La hemoglobina nativa de *Anisakis* (nAni s 13) principalmente apareció en las fracciones del pico 3 y estuvo ausente en aquellas pertenecientes al pico 1. Una pequeña cantidad de nAni s 13 se perdió en el primer sobrenadante (S1) (Figura 75).

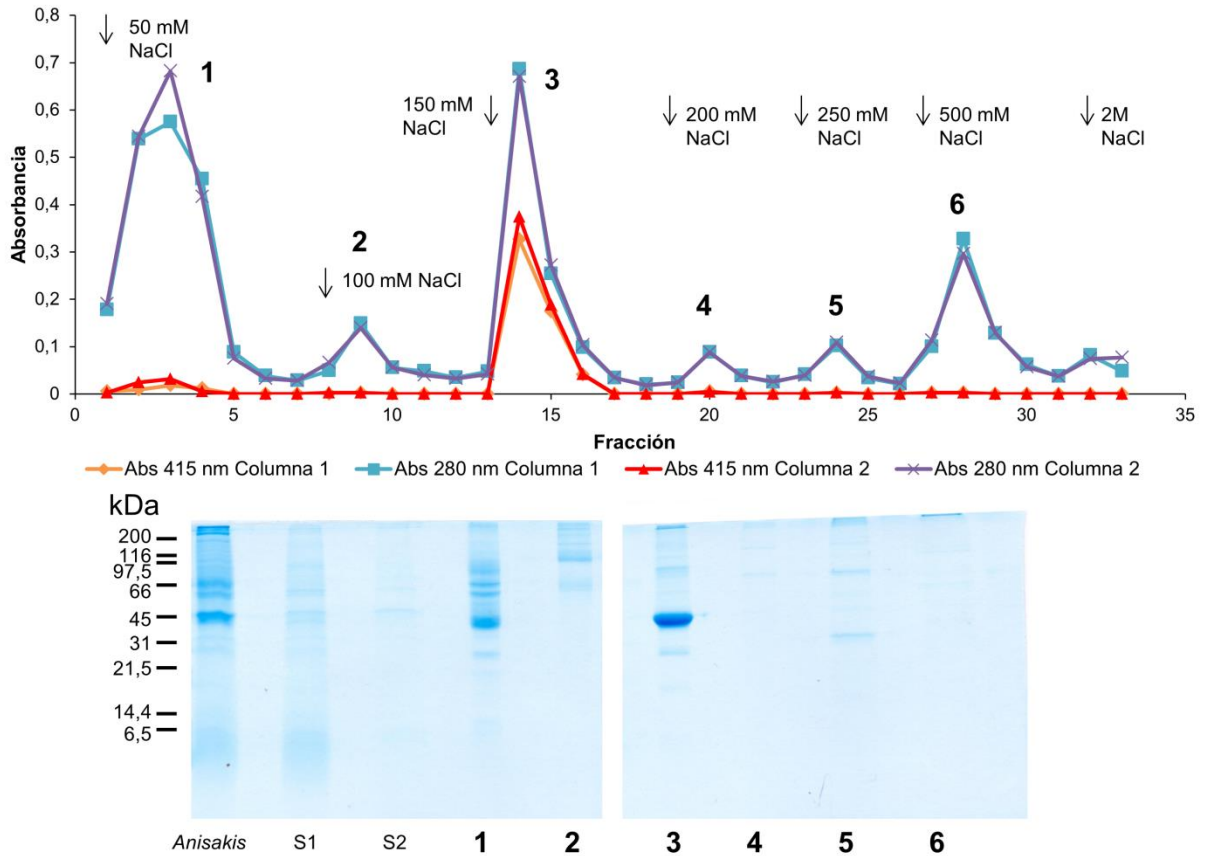


Figura 74. Cromatografía de intercambio aniónico del precipitado rojo obtenido mediante ultracentrifugación a partir del extracto de *Anisakis* y SDS-PAGE. La absorbancia de las distintas fracciones se midió a 280 nm (proteína) y a 415 nm (hemo). Las fracciones eluidas con NaCl 150 mM contenían todas las proteínas que absorbían a 415 nm y presentaron una banda clara a 37 kDa que se corresponde con el monómero de Ani s 13.

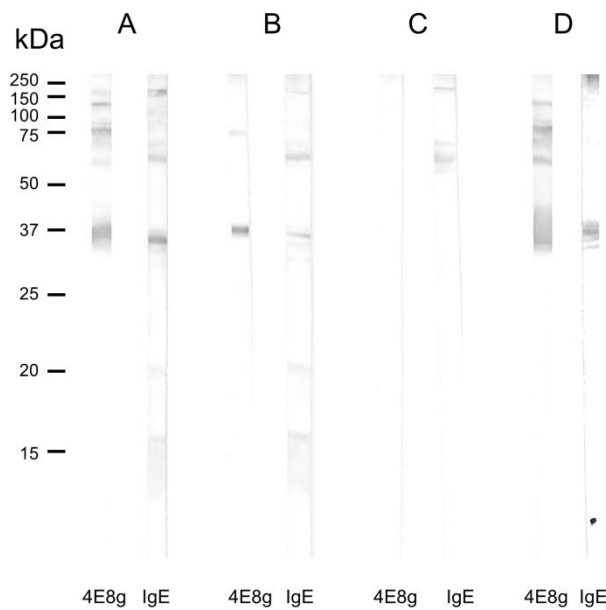


Figura 75. Presencia de Ani s 13 en diferentes pasos del proceso de purificación. **A:** Extracto de *Anisakis* antes de la ultracentrifugación. **B:** Sobrenadante 1 (S1). **C:** Pico 1 de la cromatografía. **D:** Pico 3 de la cromatografía. 4E8g: Anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina. IgE: IgE sérica de un paciente positivo a Ani s 13.

4.5.6. Ultracentrifugación analítica y microscopía electrónica

En las condiciones estudiadas, los ensayos de velocidad de sedimentación a 280 nm revelaron que nAni s 13 constaba de cuatro especies oligoméricas principales con unos coeficientes de sedimentación de 5,1 S ($S_{20,w}=5,3$ S); 7,6 S ($S_{20,w}=8,0$ S); 9,5 S ($S_{20,w}=10,0$ S) y 11,5 S ($S_{20,w}=12,1$ S), compatibles con el dímero, tetramero, hexámero y octámero globular de la proteína, respectivamente (Figura 76). Esos picos estuvieron acompañados de una pequeña fracción (<5% de la proteína total) de agregados inespecíficos con coeficientes de sedimentación más elevados.

Las lecturas a 415 nm, correspondientes a la absorbancia del grupo hemo, ofrecieron un perfil de sedimentación con solo tres picos principales a 7,6 S ($S_{20,w}=8,0$ S); 9,5 S ($S_{20,w}=10,0$ S) y 11,5 S ($S_{20,w}=12,1$ S), compatible con el tetramero, hexámero y octámero globulares de la proteína, respectivamente (Figura 76). También estos picos estuvieron acompañados de una pequeña fracción (2,5% de la proteína total) de agregados inespecíficos.

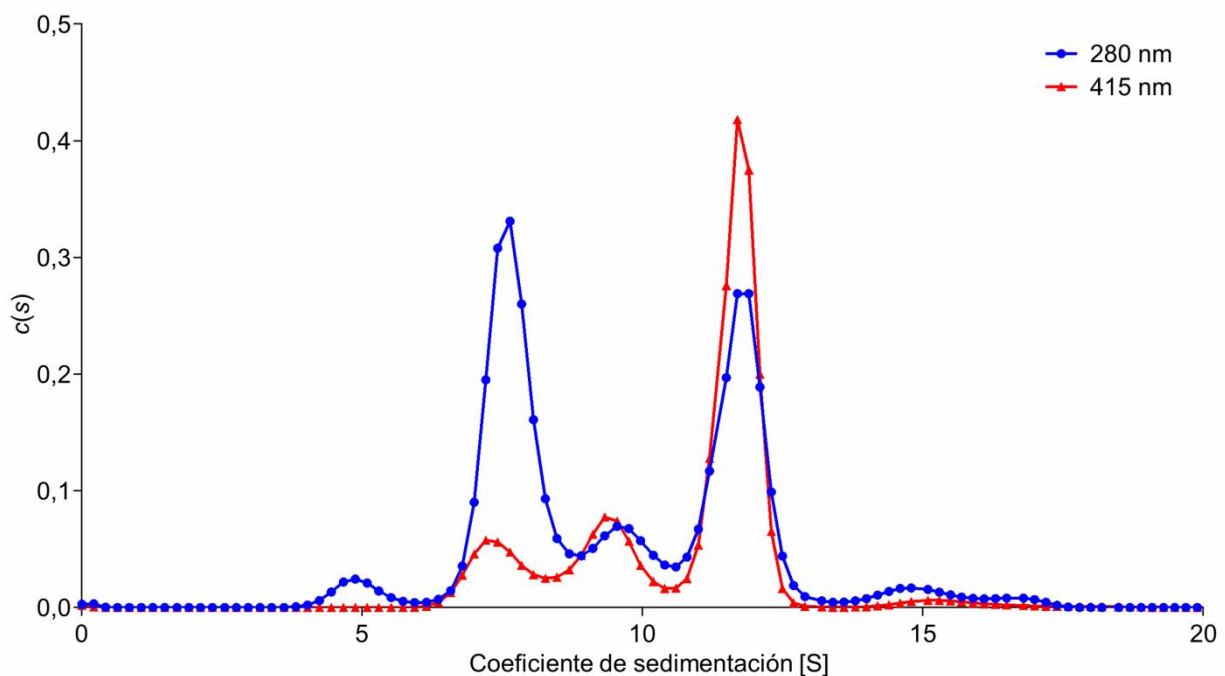


Figura 76. Análisis mediante ultracentrifugación analítica de la hemoglobina de *Anisakis simplex* (Ani s 13). Perfiles de las distribuciones de los coeficientes de sedimentación $c(s)$ de Ani s 13 a una concentración de 0,5 mg/ml obtenidos a partir de la velocidad de sedimentación a 170.000 g. La absorbancia se midió a 280 y 415 nm.

En resumen, el pico correspondiente al dímero de Ani s 13, carente de absorbancia a 415 nm, parece no presentar grupo hemo. Además, la forma tetramérica de Ani s 13 se corresponde con el 43,8% del total de proteína y solo cuenta con el 14,4% de la absorbancia total del hemo en la muestra. Por el contrario, el pico correspondiente con el octámero de Ani s 13, que representa el 35,7% de la proteína total, cuenta con el 64,1% de la absorbancia total del hemo en la muestra.

La tinción negativa de las fracciones eluidas del pico 3 de la cromatografía, mostraron mediante microscopía electrónica, partículas de diferentes formas y tamaños, consistentes con los datos obtenidos mediante ultracentrifugación analítica (Figura 77).

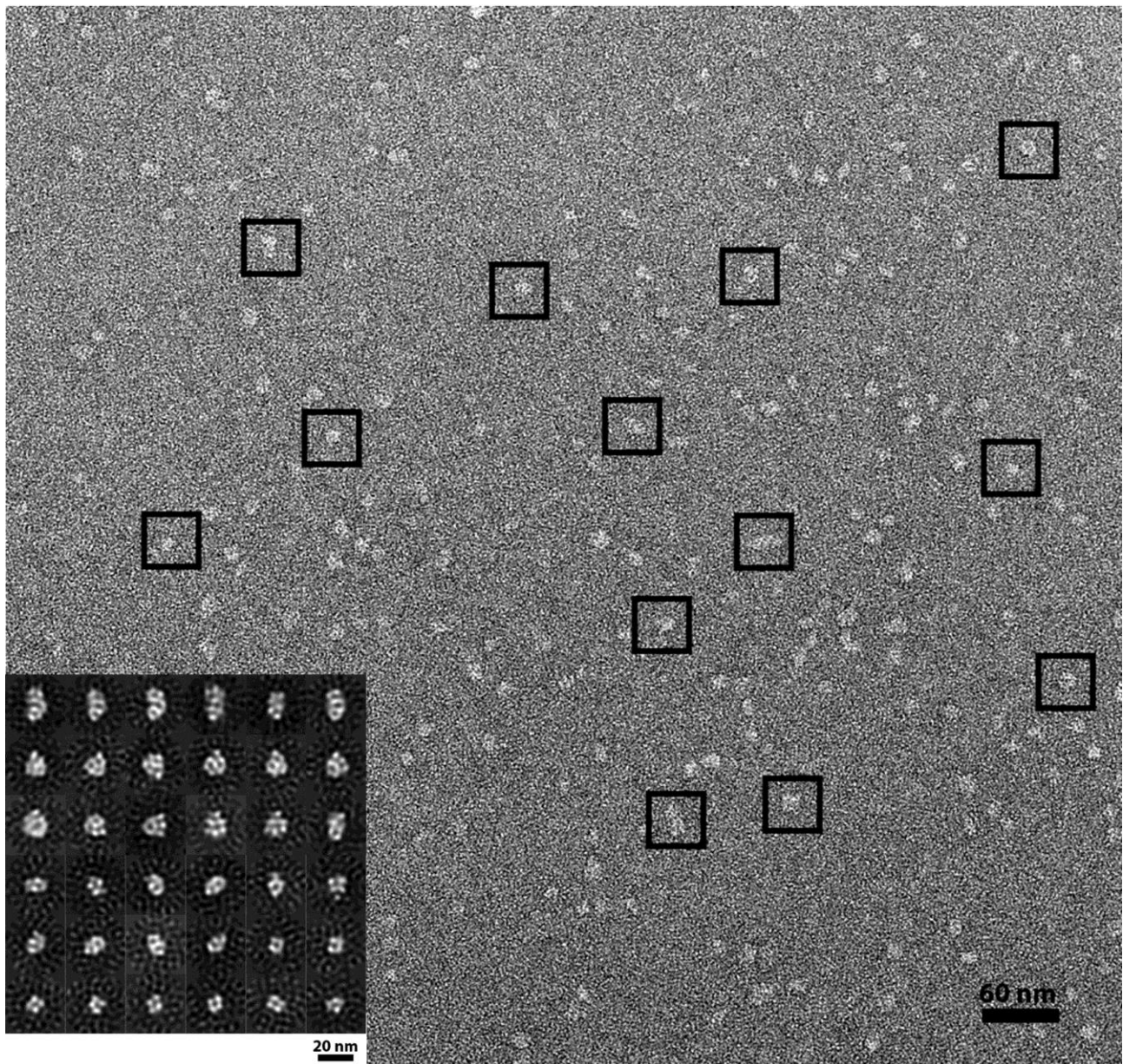


Figura 77. Tinción negativa de los oligómeros dispersos de Ani s 13 mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes de la esquina inferior izquierda representan las diferentes formas identificadas, clasificadas y promediadas en dos dimensiones.

4.5.7. Tratamiento de Ani s 13 con peryodato y reactividad cruzada con *Ascaris*

El anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g (Figura 78, carriles 1) reconoció un epítipo común glicosilado en las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris*, cuyo reconocimiento se vio seriamente afectado tras el tratamiento con peryodato. Sin embargo, el tratamiento con peryodato no afectó a los epítipos reconocidos por la IgG1 de los ratones inmunizados con rAni s 13 (carriles 3). La unión de la IgE del paciente y de la IgG1 de los ratones inmunizados con el extracto total de *Anisakis* (carriles 2 y 4) no se vio tan afectada como la del anticuerpo monoclonal 4E8g tras el tratamiento con peryodato.

La IgE sérica humana positiva a la hemoglobina de *Anisakis* y la IgG1 de los ratones inmunizados con rAni s 13 no reconocieron la hemoglobina de *Ascaris* (Figura 78, panel C, carriles 2 y 3).

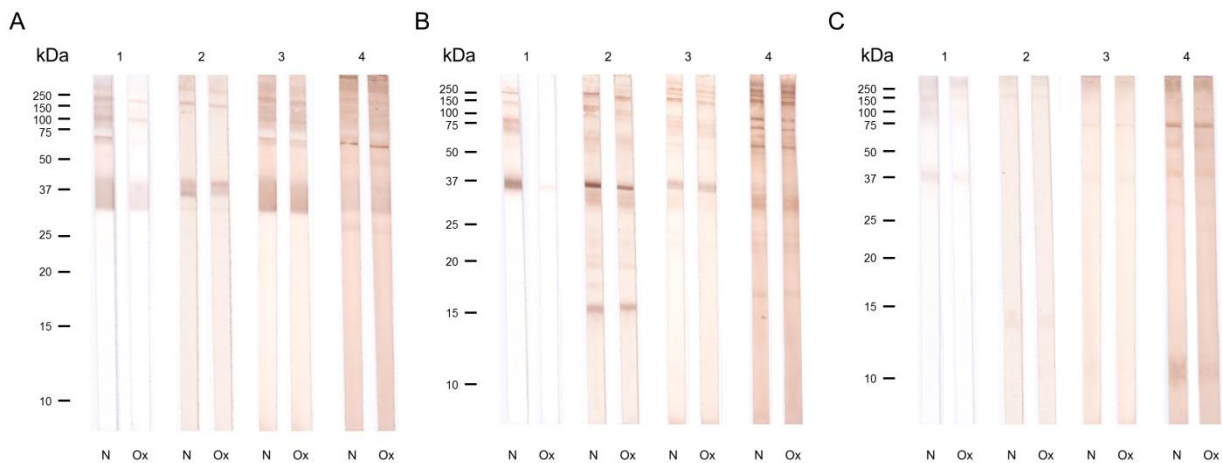


Figura 78. Sensibilidad de la unión antígeno-anticuerpo tras el tratamiento con periodato. A: Ani s 13 purificada. **B:** Extracto total de *Anisakis simplex*. **C:** Extracto total de *Ascaris suum*. Carriles 1: Anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina de *Anisakis* 4E8g (IgG1), 2: IgE de un suero humano positivo a la hemoglobina de *Anisakis*, 3: IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 13, 4: IgG1 sérica de ratón inmunizado con antígeno total de *Anisakis*. N: No oxidado. Ox: Oxidado.

4.5.8. IgE específica frente a Ani s 13 nativa

La IgE anti-Ani s 13 nativa y purificada se midió mediante ELISA indirecto. Los niveles de IgE anti-Ani s 13 fueron más elevados en el grupo AGA en comparación con los grupos UC+, UC- y C ($P=0,001$, $P<0,001$ y $P<0,001$; respectivamente). Asimismo, los pacientes del grupo UC+ presentaron niveles más elevados de IgE anti-Ani s 13 que los pacientes de los grupos UC- y C ($P<0,001$). Los pacientes de los grupos UC- y C no presentaron diferencias en su reconocimiento por parte de la IgE frente a Ani s 13 (Figura 79).

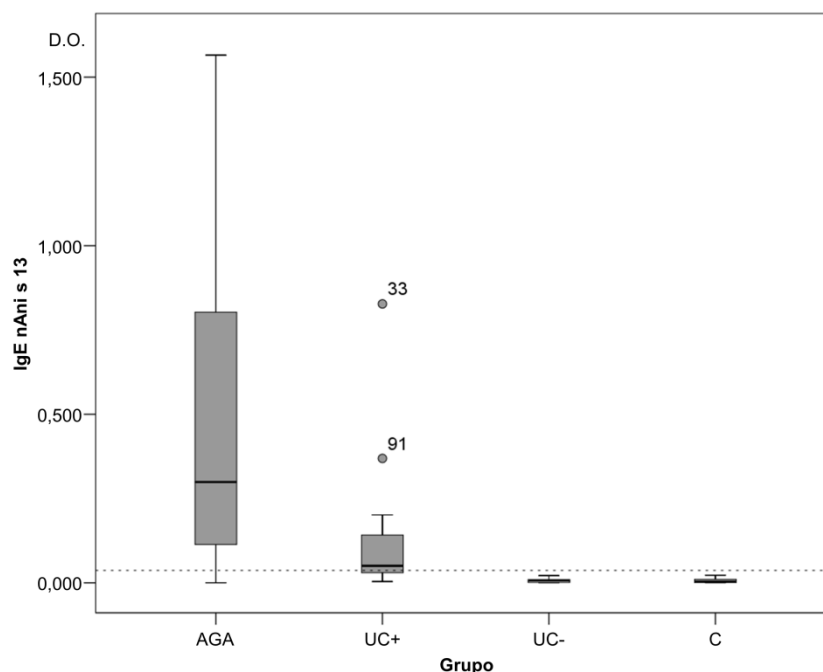


Figura 79. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-hemoglobina de *Anisakis* nativa (nAni s 13). AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=20). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=23). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=21). C: Controles (N=22). El valor umbral de positividad se indica con una línea de puntos.

Los niveles de IgE anti-Ani s 13 obtenidos mediante ELISA indirecto se correlacionaron significativamente ($P < 0,001$) con los valores de IgE anti-Ani s 13 obtenidos previamente mediante ELISA captura ($Rho = 0,835$; $N = 87$) (ver apartado [4.3.3.](#)).

Los sueros fueron considerados positivos si la D.O. fue mayor de $M + 3SD$, donde M y SD son la media de la D.O. y la desviación estándar obtenida con 14 sueros control sin diagnóstico de urticaria ni sensibilización a *Anisakis*. Este valor de corte de D.O. fue de 0,037. La IgE frente a nAni s 13 fue detectada en 31 (72,1%) de los 43 pacientes sensibilizados a *Anisakis*. Cuando se analizaron por separado, 18 (90%) de los 20 pacientes del grupo AGA y 13 (56,5%) de los 23 pacientes del grupo UC+ fueron positivos. Ninguno de los individuos de los grupos UC- y C (no sensibilizados a *Anisakis*) fue positivo.

Los patrones de inmunorreconocimiento de la IgE frente a nAni s 13 fueron menos sensibles que los ELISA ya que 16 (80%) de los 20 pacientes del grupo AGA y ocho (34,8%) de los 23 pacientes del grupo UC+ fueron positivos. Las inmunotransferencias mostraron como el paciente 36 (grupo UC+) reconoció otras bandas diferentes (Figura 80).



Figura 80. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de los pacientes con anisakirosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (cursiva) frente a la hemoglobina de *Anisakis* nativa (nAni s 13). * indica suero positivo. C: IgG1 sérica de ratón inmunizado con extracto total de *Anisakis*.

4.6. Clonación, expresión y caracterización inmunológica de la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis*

4.6.1. Resumen

La miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis* no han sido caracterizadas como alérgenos de este parásito y, sin embargo, pertenecen a familias de proteínas clásicamente alérgicas y se encuentran en el rango de peso molecular (37,7-73,3 kDa) en el que se están los alérgenos que son reconocidos por un mayor número de pacientes sensibilizados a *Anisakis*. La miofilina se identificó por primera vez en el cestodo *Echinococcus granulosus* y se cree que interviene en la contracción del músculo liso en éste y otros platelmintos. Es inmunogénica en este cestodo y parece estar muy conservada debido a la existencia de reacciones cruzadas con miofilinas de otros organismos. En el extracto de *Anisakis*, la miofilina se ha detectado como una proteína de 56 kDa. Por otro lado, la arginina quinasa es una enzima monomérica de unos 40 kDa que está muy conservada en invertebrados. Es inmunogénica y se considera un panalérgeno de invertebrados al igual que la tropomiosina.

A partir de cDNA de *Anisakis simplex*, se realizó la amplificación de los genes de la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis* y secuenciándolas para su publicación con los números de acceso GenBank: KX965682 y KX965683. Ambas proteínas fueron expresadas en *E. coli* y purificadas. Tras la confirmación de sus secuencias mediante espectrometría de masas (nanoLC-ESI-orbitrap-MS/MS) y su diálisis renaturalizante, se inmunizaron ratones con la miofilina de *Anisakis* y se realizó un análisis mediante inmunotransferencia con 43 pacientes sensibilizados a *Anisakis* [20 sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA) y 23 sueros de pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+)]. Solo el paciente 76 (UC+) presentó una banda de IgE frente a la arginina quinasa de *Anisakis*. Por otro lado, realizamos un análisis de IgE específica frente a miofilina y arginina quinasa recombinantes mediante ELISA indirecto incluyendo sueros de 82 pacientes (21 AGA, 23 UC+, 24 pacientes con urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y 14 controles (C) sin sensibilización a *Anisakis* ni urticaria crónica). En el caso de la miofilina ningún paciente la reconoció, sin embargo, en el caso de la arginina quinasa se observaron niveles significativamente inferiores ($P \leq 0,004$) de IgE frente a esta proteína en el grupo de AGA frente al resto de grupos UC+, UC- y C. Se comprobó que los pacientes de los grupos UC- y C, los cuales presentaron los niveles más elevados de IgE anti-arginina quinasa, reconocieron esta proteína mediante inmunotransferencia. En estas condiciones experimentales, la miofilina y la arginina quinasa no pueden ser consideradas alérgenos de *Anisakis*.

4.6.2. Secuencia de la miofilina y de la arginina quinasa de *Anisakis simplex*

El marco abierto de lectura del cDNA identificado como miofilina de *Anisakis* consta de 507 bp (Figura 81A) y codifica para una proteína de 169 aminoácidos con un pI teórico de 7,72 y un peso molecular calculado de 18,8 kDa. Esta secuencia ha sido publicada con el número de acceso GenBank: [KX965682.1](#). La secuencia de miofilina subrayada a continuación, ha sido confirmada y secuenciada mediante espectrometría de masas (nanoLC-ESI-orbitrap-MS/MS) resultando cubierto un 38% de la secuencia.

```

1 M A S R A E K S G F A L D A Q R K I R G
1 ATGGCCTCACGTGCTGAAAAGTCTGGTTTTGCACTAGATGCACAACGGAAAATTCGTGGT
21 K Y D P E L A S E I L N W I A A L T G H
61 AAATATGATCCAGAATTGGCCAGCGAAAATCTCAATTGGATCGCCGCATTAACAGGCCAT
41 N F D K K G D M E N F V S V L K D G T V
121 AATTTTCGATAAGAAAAGGCGATATGGAGAATTTTCGTCAGCGTCCCTCAAAGATGGGACTGTT
61 L C S L A N A L E P G A V K K V N T S K
181 CTATGCAGTTTGGCGAATGCGTTAGAACCAGGTGCAGTGAAGAAGGTGAACACCAGTAAG
81 M A F K Q M E N I S F F L K F V S K H V
241 ATGGCTTTCAAGCAAATGGAAAATATTTTCATTTTTTTTGGAAAATTCGTAAGTAAACATGTG
101 P E A E L F Q T I D L Y E G Q D P Y A V
301 CCAGAAGCGGAATTGTTCCAAACGATTGATCTCTACGAAGGACAAGATCCGTACGCTGTT
121 L I C L S S L A R K S E K L F G K K G L
361 CTCATATGCCTCTCATCACTCGCACGAAAATCCGAAAAGCTATTCGGTAAGAAGGGACTT
141 G P K E A E G E K R E W T E E Q L R A G
421 GGCCCGAAGGAAGCGGAGGGCGAGAAGCGTGAATGGACAGAAGAGCAGCTACGTGCCGGT
161 E G V I G L Q M R *
481 GAAGGTGTCATTGGTTTGCAAATGCGTTAG

```

Por otro lado, el marco abierto de lectura del cDNA identificado como arginina quinasa de *Anisakis* consta de 1197 bp (Figura 81B) y codifica para una proteína de 399 aminoácidos con un pI teórico de 8,36 y un peso molecular calculado de 45,4 kDa. Esta secuencia ha sido publicada con el número de acceso GenBank: [KX965683.1](#). La secuencia de arginina quinasa subrayada a continuación, ha sido confirmada y secuenciada mediante espectrometría de masas (nanoLC-ESI-orbitrap-MS/MS) resultando cubierto el 76% de la secuencia.

```

1 M A F L K N Q K A V F S S L L A I A G G
1 ATGGCTTTTCTCAAAAATCAAAAAGCAGTATTCAGCAGTCTTCTCGCTATTGCGGGTGGGA
21 A T A F A Y F Y P Y N R D V A L V N L Q
61 GCAACAGCTTTTCGCTACTTTTATCCGTATAATAGAGACGTTGCATTGGTGAATCTTCAG
41 I N E A D A S T V K K L E E A F Q R L Q
121 ATCAATGAAGCTGATGCATCTACTGTTAAGAACTCGAGGAAGCATTCCAGAGGTTGCAG
61 K A E D C H S L L K K H L S R D V L D Q
181 AAGGCTGAAGATTGTCATTACTGAAAAAGCACCTCAGTCGCGATGTACTAGACCAG
81 L K Y K K T K L G A T L Y D I I R S G V
241 CTGAAATACAAAAGACAAAATGGGCGCTACTCTCTATGATATTATTCGTTTCAGGCGTC
101 F N L D A N V G V Y A S D S E S Y K T F
301 TTTAACTTGGATGCGAATGTGGGCGTGTACGCTTCAGATAGTGAATCTTATAAGACATTC
121 A A L F D P I I E D Y H G F S P N Q K H

```

361 GCAGCACTCTTCGATCCGATCATCGAGGATTATCATGGTTTTTCGCCGAATCAAAAACAT
 141 P K V D L G V G R T A D F P P L D P D N
 421 CCAAAAGTCGATTTGGGTGTTGGCCGAACTGCTGATTTCCCTCCACTCGATCCTGACAAC
 161 K Y I L S T R I R C A R T V A G Y P F N
 481 AAATACATTCTTTGACAAGAATTCGATGTGCTCGTACAGTGGCCGGCTATCCATTCAAT
 181 P L L T Q D D Y L I L E Q K V K N S L S
 541 CCTTTATTGACACAGGACGATTATCTGATTTTAGAGCAGAAGGTGAAGAATAGCTTGTC
 201 L L D G E L N G N Y H P L E G M S K E V
 601 TTATTGGACGGTGAACGAAATTATCATCCGTTGGAAGGAATGAGTAAAGAGGTG
 221 Q S R L I Q E H F L F K E G D R H L K E
 661 CAGAGTCGGTTAATACAAGAGCATTTCCTCTTTAAAGAGGGTGATCGTCACTTGAAAGAG
 241 A K A C N Y W P K G R G I F H N K N K T
 721 GCTAAGGCGTGCAATTATTGGCCTAAGGGTCGCGGTATTTCCATAATAAAAAACAAAAC
 261 F L V W V N E E D H L R L I S M Q K G S
 781 TTCTTGGTATGGGTGAATGAAGAGGATCACTTACGGTTAATTTCAATGCAAAAAGGTAGC
 281 D V G E V L D R L N R G I Q L L Q S K L
 841 GACGTTGGTGAGGTACTCGATCGACTCAATCGAGGTATTCAGTTGTTACAATCGAAATTG
 301 S F A H D D R L G W L T F C P T N L G S
 901 TCATTTGCTCATGACGATCGCCTCGGTTGGTTGACGTTCTGTCCAACGAATCTCGGCTCT
 321 T I R A S V H I K L P K L S K R D D F K
 961 ACGATCCGTGCGTCAGTGCATATTAAGTTACCAAAAACCTCTCCAAAAGAGATGATTTCAAG
 341 E I C E K L N L Q A R G V H G E H S K S
 1021 GAGATATGCGAAAAGCTGAATTTACAAGCACGTGGTGTTCACGGGGAGCACTCGAAAAGC
 361 E G G V Y D I S N K N R L G I T E Y E A
 1081 GAAGGAGGAGTATACGATATTTCAAACAAGAACCGTCTCGGTATCACGGAGTATGAGGCT
 381 V K Q M Y D G V K E L I R L E E Q E K *
 1141 GTGAAACAGATGTATGATGGAGTTAAAGAATTAATTCGACTGGAAGAACAGGAAAAGTAG

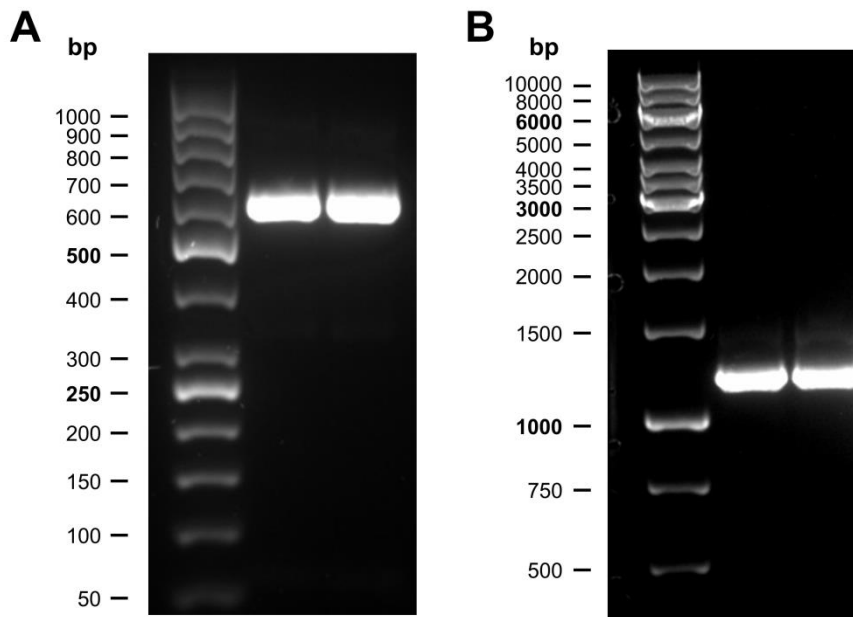


Figura 81. Amplificación mediante PCR de los genes que codifican para la miofilina de *Anisakis* (A) y para la arginina quinasa de *Anisakis* (B).

Al realizar la electroforesis de las proteínas recombinantes purificadas comprobamos que el peso molecular calculado de los monómeros de ambas proteínas coincidía con aproximadamente 18 kDa para la miofilina y 45 kDa para la arginina quinasa. Además se observó la presencia de bandas adicionales menos intensas a 12, 36 y 54 kDa para la miofilina y de 25, 30, 35 y 90 kDa para la arginina quinasa (Figura 82).

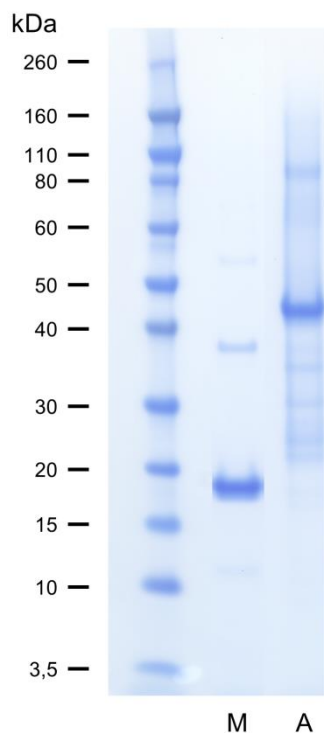


Figura 82. Tinción Coomassie de la miofilina (M) y de la arginina quinasa (A) recombinantes de *Anisakis simplex*. SDS-PAGE realizado en condiciones no reductoras.

4.6.3. Inmunización de ratones con miofilina de *Anisakis* y reacciones cruzadas

Con la intención de tener un suero control de miofilina en inmunotransferencia, inmunizamos dos ratones con miofilina recombinante de *Anisakis* dializada y renaturalizada. Esto no se realizó con la arginina quinasa debido a que disponíamos de un anticuerpo policlonal de conejo anti-arginina quinasa no específico para la de *Anisakis*.

Comprobamos que la miofilina de *Anisakis* es inmunogénica. La IgG1 específica inducida en los ratones reconoció la miofilina recombinante, pero presentó niveles muy bajos frente al extracto total de *Anisakis* mediante ELISA indirecto (Figura 83).

Para comprobar el reconocimiento de la IgG1 anti-miofilina del suero murino sobre el extracto total de *Anisakis*, realizamos una inmunotransferencia con el suero inhibido y no inhibido por la propia miofilina recombinante. Esta inmunotransferencia confirmó el reconocimiento de una banda intensa a 54 kDa en el extracto total de *Anisakis* que no se inhibía tras la incubación con la miofilina recombinante de *Anisakis* (Figura 84).

Además comprobamos la existencia de reactividad cruzada de la IgG1 de los ratones inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* con otros organismos parásitos, mariscos, carnes y pescados (Figura 85). Considerando que el monómero de miofilina puede estar a 18-20 kDa, el dímero a 36-

40kDa y el trímero a 54-60kDa, existe un tenue reconocimiento en los extractos de *Ascaris*, langostino y cerdo.

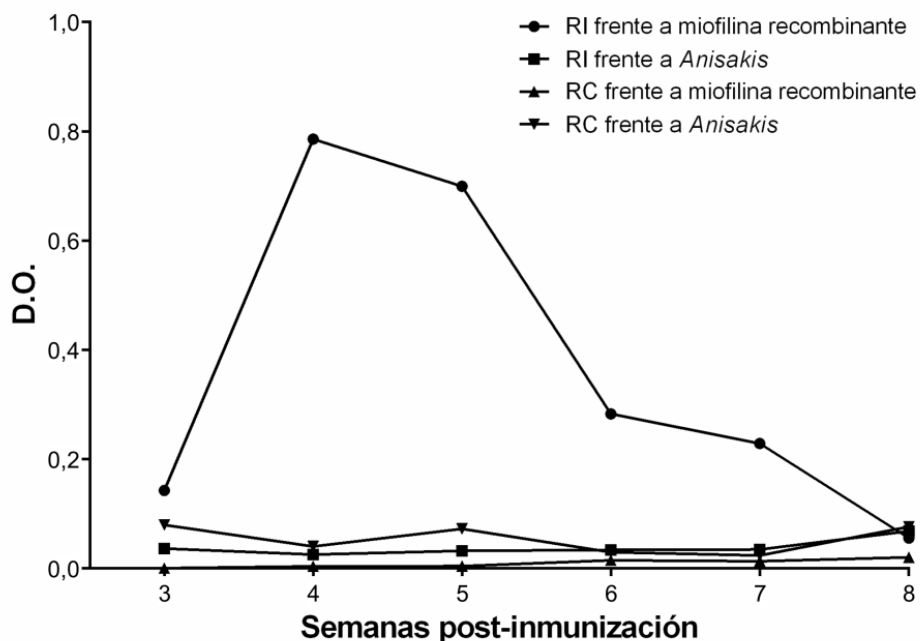


Figura 83. Niveles de IgG1 inducidos por la miofilina recombinante de *Anisakis*. Se inmunizaron ratones BALB/c (N=2) con la miofilina recombinante purificada. Las muestras de suero fueron obtenidas semanalmente y los ELISA indirectos se realizaron frente a la miofilina recombinante o frente al extracto total de *Anisakis*. Se muestran los valores medios de D.O. a 490 nm. RI: Ratón inmunizado. RC: Ratón control.

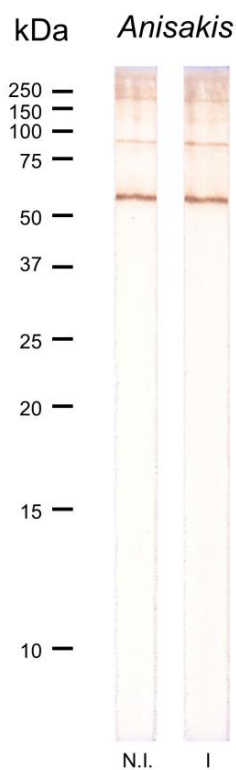


Figura 84. Inmunotransferencia de inhibición de IgG1 con miofilina recombinante de *Anisakis*. El suero de ratón inmunizado con miofilina recombinante de *Anisakis* se incubó con la miofilina recombinante y tras la precipitación de los posibles inmunocomplejos el sobrenadante fue incubado frente al extracto total transferido de *Anisakis*. N.I.: Suero de ratón no inhibido. I: Suero de ratón inhibido.

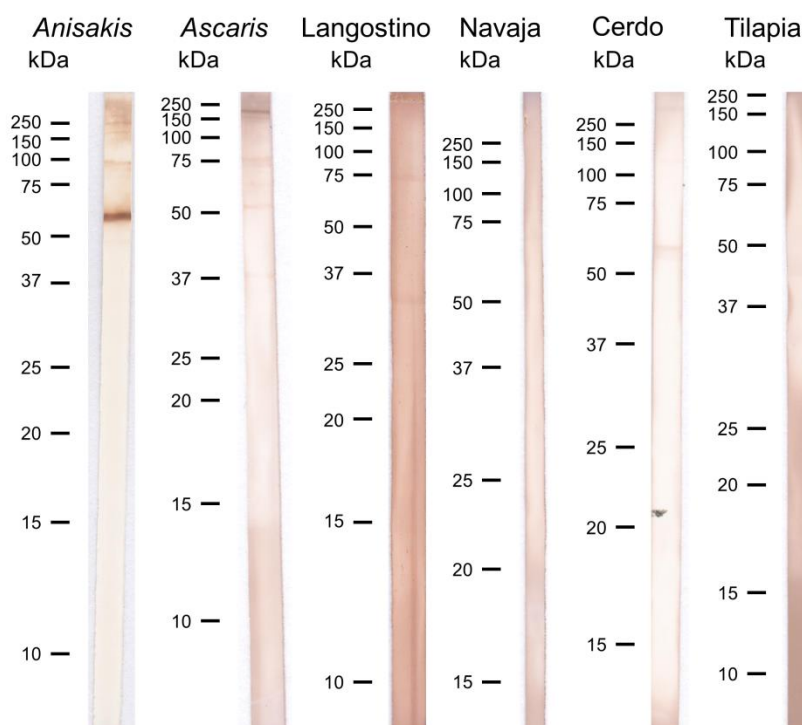


Figura 85. Patrones de inmunorreconocimiento de IgG1 de ratón inmunizado con miofilina recombinante de *Anisakis*. Las inmunotransferencias han sido realizadas frente a los extractos de *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Litopenaeus vannamei*, *Ensis arcuatus*, *Sus scrofa* y *Oreochromis mossambicus* en condiciones no reductoras.

4.6.4. IgE específica frente a la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis*

Ambas proteínas recombinantes se enfrentaron a 43 sueros de pacientes sensibilizados a *Anisakis* mediante inmunotransferencia (Figura 86). En la Figura 86A (miofilina recombinante de *Anisakis*), la banda de 12 kDa observada en la tinción Coomassie de la miofilina recombinante (Figura 82) fue reconocida por los pacientes: 24, 33, 36, 38, 40, 65, 70, 74, 78, 79, 98 y 319. Este reconocimiento fue considerado una reacción frente a trazas de alguna proteína bacteriana tras la purificación de la recombinante debido a que también estaba presente en los mismos pacientes cuando se incubaron con las tiras con arginina recombinante de *Anisakis* transferida (Figura 86B).

La banda de 18 kDa observada en la tinción Coomassie de la miofilina recombinante (Figura 82), se corresponde con el monómero de la miofilina [banda ancha de 16-17 kDa reconocida por el suero control (C) de ratón inmunizado con la miofilina de *Anisakis*] (Figura 86A). Los pacientes 36, 38 y 53, reconocieron una banda a 18 kDa (Figura 86A) que también estaba compartida en el panel B de la Figura 86 (arginina quinasa).

La banda de 36 kDa observada en la tinción Coomassie de la miofilina recombinante (Figura 82) se corresponde con el dímero de la miofilina de *Anisakis* [banda de alrededor de 37 kDa del suero control (C) de ratón inmunizado con la miofilina de *Anisakis*] (Figura 86A). Está presente de forma muy difusa en el paciente 36 (que también la reconoció en la Figura 86B), y en los pacientes 84, 99 y 319 (Figura 86A). Asimismo, como se puede observar en la Figura 86A, existe una banda a 40 kDa en los pacientes 3, 5, 13, 22, 28, 30, 32, 44, 46, 65, 66, 71, 77, 88 y 91; presentando los pacientes subrayados la misma banda en la Figura 86B.



Figura 86. Patrones de inmunoreconocimiento de la IgE de pacientes sensibilizados a *Anisakis* frente a la miofilina (A) y arginina quinasa (B) recombinantes de *Anisakis*. C: IgG1 sérica de ratón inmunizado con miofilina recombinante de *Anisakis* (A) o anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa (IgG1) (B). AnM: IgG1 sérica de ratón inmunizado con extracto total de *Anisakis*.

Por último, la banda de 54 kDa observada en la tinción Coomassie de la miofilina recombinante (Figura 82), se corresponde con el trímero de miofilina de *Anisakis* [banda oscura de alrededor de 60 kDa del suero control (C) de ratón inmunizado con la miofilina de *Anisakis*] (Figura 86A). Esta banda está presente en la tira incubada con el suero del paciente 99 (Figura 86A).

En la Figura 86B se muestran las bandas reconocidas por los mismos sueros frente a la arginina quinasa recombinante de *Anisakis*. La banda de 25 kDa observada en la tinción Coomassie de la arginina quinasa recombinante (Figura 82) fue débilmente reconocida por el anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa utilizado como control (C) (Figura 86B).

La banda de 30 kDa observada en la tinción Coomassie de la arginina quinasa recombinante (Figura 82) fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa utilizado como control (C) y por la IgE de los pacientes 36, 70, 71, 78 y 79 (Figura 86B).

La banda de 35 kDa observada en la tinción Coomassie de la arginina quinasa recombinante (Figura 82) también fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa utilizado como control (C) (Figura 86B).

La banda de 45 kDa observada en la tinción Coomassie de la arginina quinasa recombinante (Figura 82), se corresponde con el monómero de arginina quinasa de *Anisakis* [banda intensa de 40 kDa del anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa utilizado como control (C)]. Fue reconocida por el suero de ratón inmunizado con el extracto total larvario de *Anisakis* (AniM) y por el suero del paciente 76 (Figura 86B).

Por último, la banda de 90 kDa observada en la tinción Coomassie de la arginina quinasa recombinante (Figura 82) se corresponde con el dímero de arginina quinasa de *Anisakis* [banda débil de alrededor de 75 kDa del anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa utilizado como control (C)]. Esta banda estaba presente en las tiras incubadas con el suero de los pacientes 36, 70, 74 y 76 (Figura 86B).

En segundo lugar, se analizaron los niveles de IgE específica frente a la miofilina y arginina quinasa recombinantes y renaturalizadas de *Anisakis* mediante ELISA indirecto en un total de 82 sueros: 21 AGA, 23 UC+, 24 UC- y 14 C. Los niveles de IgE específica frente a ambas proteínas fueron bajos, siendo la positividad frente a la miofilina recombinante de *Anisakis* prácticamente indetectable (Figura 87). Cuando realizamos el análisis de los resultados por grupos pudimos observar que los pacientes de los grupos C, UC- y UC+ presentaron niveles de IgE anti-arginina quinasa significativamente más elevados que los pacientes del grupo de AGA ($P=0,003$, $P<0,001$ y $P=0,004$, respectivamente) (Figura 88). Dado que los niveles de IgE anti-arginina quinasa más elevados estaban presentes en los individuos no sensibilizados a *Anisakis* (UC- y C), se agrupó a los 38 individuos UC- y C (no sensibilizados a *Anisakis*) y se compararon con los 44 pacientes de los grupos AGA y UC+ (sensibilizados a *Anisakis*) observándose niveles de IgE anti-arginina quinasa más elevados en los sujetos no sensibilizados a *Anisakis* (UC- y C) ($P=0,007$). Finalmente, los pacientes 307 (C) y 51 (UC-) se incubaron con tiras de arginina quinasa recombinante confirmándose su reconocimiento mediante inmunotransferencia (Figura 89).

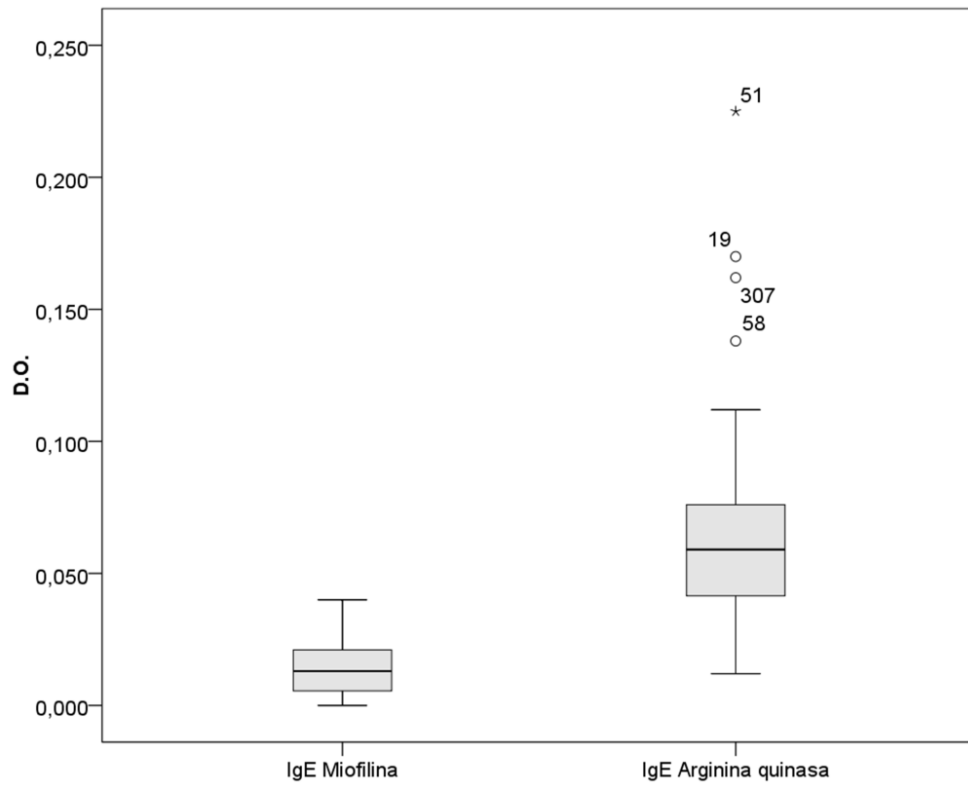


Figura 87. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-miofilina y anti-arginina quinasa recombinantes de *Anisakis*. Los pacientes fueron analizados en conjunto (N=82).

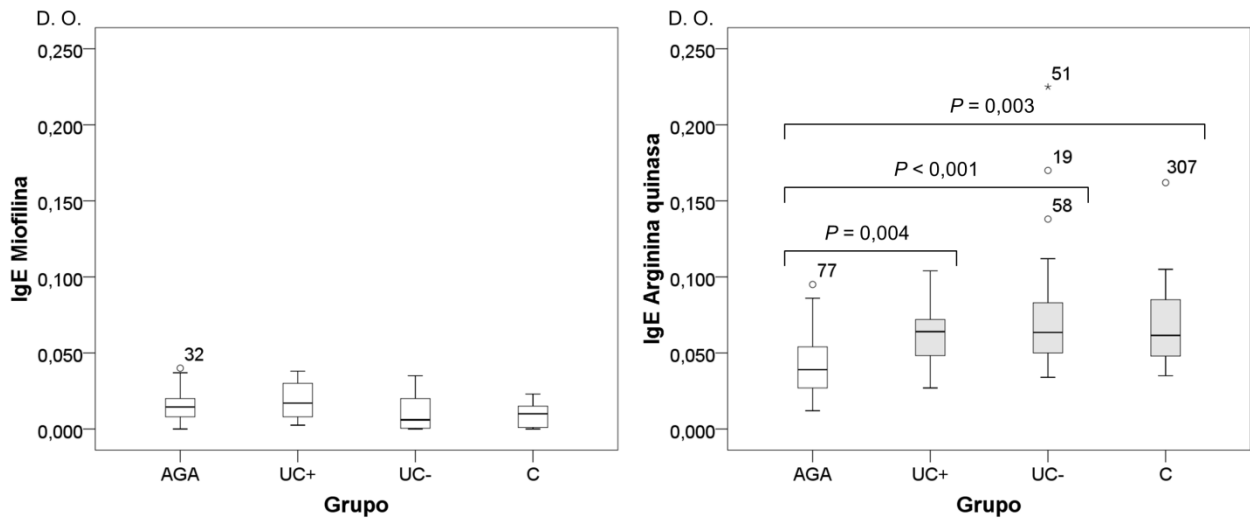


Figura 88. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-miofilina y anti-arginina quinasa recombinantes de *Anisakis* por grupos. AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=21). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=23). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=24). C: Controles (N=14).

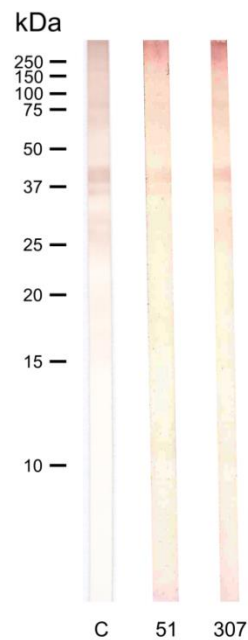


Figura 89. Reconocimiento de la arginina quinasa recombinante de *Anisakis* por la IgE de los sueros 307 (grupo control) y 51 (grupo de urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*) mediante inmunotransferencia. C: Anticuerpo policlonal anti-arginina quinasa (IgG1).

4.6.5. Miofilina e IgE frente a las proteínas de *Anisakis*

Debido a la ausencia de reconocimiento de la miofilina recombinante en ELISA por los pacientes sensibilizados a *Anisakis*, analizamos los patrones de inmunorreconocimiento de IgE de estos mismos pacientes analizados por ELISA con la miofilina recombinante de *Anisakis* pero, en este caso, incubados frente al extracto total de *Anisakis*. En 14 pacientes del grupo AGA (2, 3, 5, 24, 60, 62, 64, 65, 69, 71, 92, 93, 99, 319) y en 9 pacientes del grupo UC+ (9, 21, 29, 30, 38, 66, 74, 84, 91) se observó una banda de 60 kDa compatible con el trímero de miofilina detectado por la IgG1 del suero (M) de los ratones inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* (Figura 90).

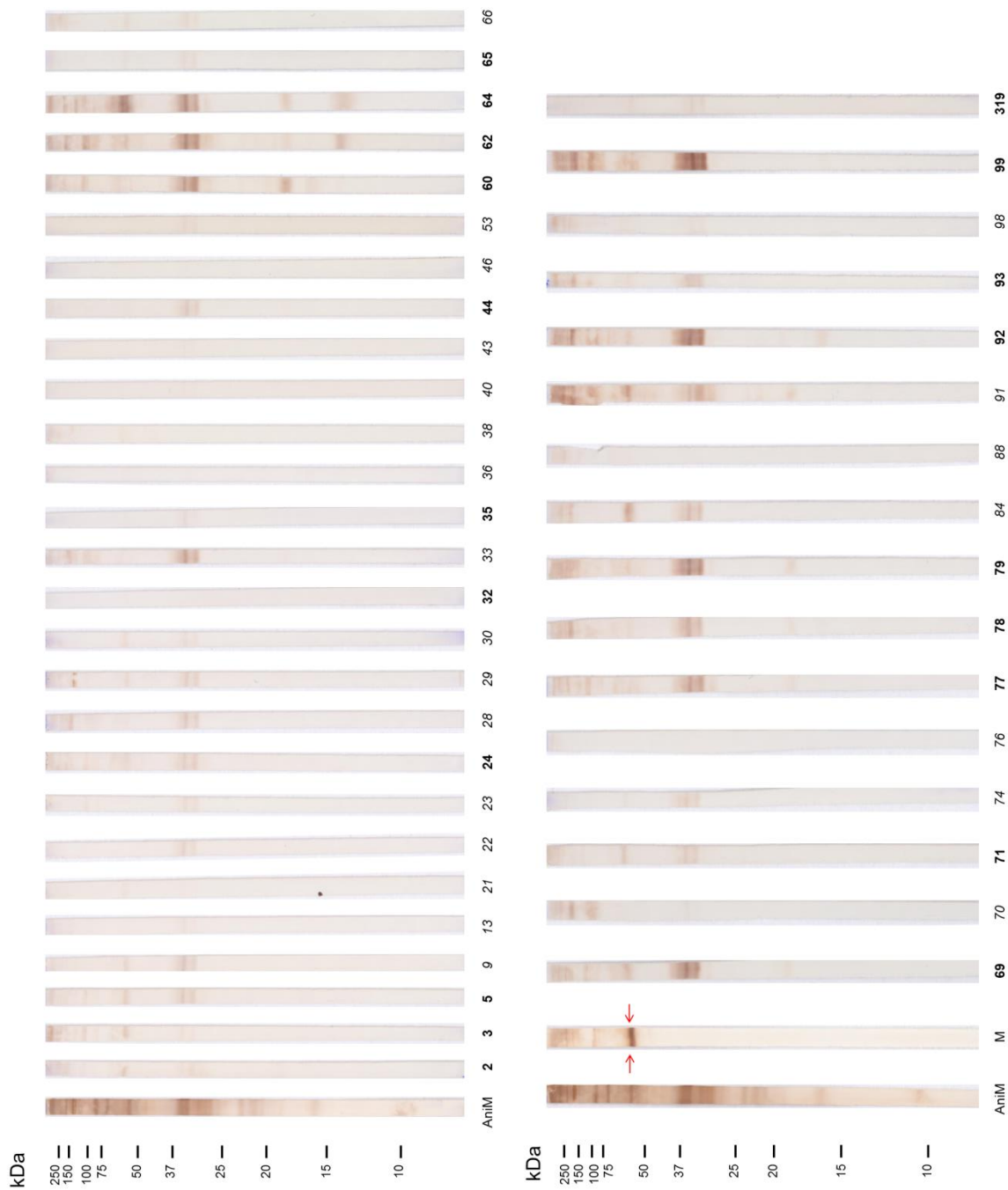


Figura 90. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (cursiva) frente al extracto total de *Anisakis*. Las flechas indican la banda de 60 kDa reconocida por la IgG1 de ratón inmunizado con miofilina recombinante (M). AniM: IgG1 sérica de ratón inmunizado con extracto total de *Anisakis*.

4.7. Estudio de la reactividad cruzada entre *Anisakis simplex* y otros invertebrados: el papel de la tropomiosina

4.7.1. Resumen

Anisakis simplex es el único helminto parásito que se considera productor de alergias asociadas a su parasitación. Estudios previos han demostrado que las pruebas cutáneas y la IgE específica frente al extracto de *Anisakis*, en cierta medida, son falsamente positivas en sujetos sanos. Aunque la tropomiosina no parece ser un alérgeno importante en la sensibilización al parásito, desconocemos su papel en la aparición de falsos positivos en su diagnóstico.

Por ello, en primer lugar, se determinaron los niveles de IgE, IgG e IgA mediante ELISA indirecto frente a diferentes organismos de nuestro entorno involucrados en procesos alérgicos como nematodos parásitos, artrópodos domésticos y mariscos. También se incluyó el atún como vertebrado debido a que peces como la tilapia mozambiqueña (*Oreochromis mossambicus*) tienen una tropomiosina alérgica. Para el estudio se dispuso de un banco de 94 sueros de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* como la anisakiosis gastroalérgica (AGA) (N=21) y la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis* (UC+) (N=26). Asimismo se determinaron los niveles de estos isotipos de inmunoglobulinas en pacientes con urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) (N=28) y en sujetos control (C) (N=19) que no presentaban urticaria ni síntomas asociados a la parasitación por *Anisakis*.

Con respecto a la IgE, se detectaron 39 sueros IgE positivos a *Anisakis* y en ellos el porcentaje de reacción cruzada con todos los extractos de los organismos crudos estudiados fue mayor al 60%. La positividad frente a los extractos cocidos de mejillón y pulpo se redujo un 38,5% y un 85%, respectivamente tras el proceso de cocción. También se observó que los pacientes con urticaria crónica presentaron niveles significativamente superiores de IgE frente a la mayoría de los extractos con respecto a los que no padecían esta enfermedad (AGA y C).

Con respecto a la IgG, los extractos de los nematodos parásitos estudiados, presentaron el mayor número de positivos. Además, el reconocimiento de la IgG no se vio reducido frente a los extractos cocidos de pulpo y mejillón. Asimismo, existía una tendencia de niveles más elevados de IgG en los sueros de los grupos UC- y C frente a los extractos de los artrópodos *Blatella germanica* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, y frente a los de los moluscos crudos. Frente al extracto de atún, se produjo esta elevación en los niveles de IgG únicamente en los sueros del grupo C.

Con respecto a la IgA, los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* presentaron el mayor número de positivos para IgA, seguidos por el extracto de cangrejo de río. Sorprendentemente, los sueros del grupo control presentaron niveles más elevados de IgA frente a los extractos de ácaro, pulpo crudo y cocido; mejillón crudo y cocido; y almeja, que los sueros del resto de grupos. El reconocimiento de la IgA tampoco se vio afectado por el proceso de cocción.

Por otro lado y debido a la aparente reactividad cruzada observada entre *Anisakis* y crustáceos, sumado a la importancia de la tropomiosina en los pacientes sensibilizados al marisco, quisimos estudiar en detalle la reacción cruzada entre las tropomiosinas Ani s 3 y Pan b 1 de *A. simplex* y *Pandalus borealis*

(camarón nórdico), respectivamente; y entre los extractos totales de *A. simplex* y *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco). Dada la elevadísima identidad (97%) entre la tropomiosina del langostino blanco (Lit v 1) y la del camarón nórdico (Pan b 1) fue posible utilizar la tropomiosina Pan b 1 recombinante en su lugar.

Para este segundo estudio se emplearon 90 sueros: AGA (N=21), UC+ (N=25), UC- (N=26) y C (N=18) junto con 12 sueros de pacientes sensibilizados a crustáceos. En primer lugar se determinaron, mediante ELISA indirecto, los niveles de IgE, IgG4 e IgA frente a los extractos y las tropomiosinas recombinantes de *Anisakis* y langostino empleando los primeros 90 sueros. Del mismo modo, se determinaron los niveles de IgE frente al extracto de *Anisakis* y langostino y frente a la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) recombinante empleando los 12 sueros de pacientes sensibilizados a crustáceos. Finalmente se determinaron, mediante inmunotransferencia, los perfiles de inmunorreconocimiento de la IgE frente a los extractos de *Anisakis* y langostino y frente a la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) recombinante.

El 15,4% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* (AGA y UC+) presentaron niveles positivos de IgE frente a Ani s 3, lo que confirma que la tropomiosina no es un alérgeno principal de *Anisakis*. De 16 sueros positivos frente a alguna de las dos tropomiosinas recombinantes estudiadas (Ani s 3 y Pan b 1), tres sueros resultaron positivos a ambas tropomiosinas y 13 mostraron especificidad en su reconocimiento. Por otro lado, cuando estudiamos los 12 sueros de pacientes sensibilizados a crustáceos cuatro (33%) fueron positivos frente a las tropomiosinas de *Anisakis* y langostino. Lo que permite concluir que, agrupando a los 20 pacientes positivos frente a alguna de las tropomiosinas, siete (35%) fueron positivos frente a ambas, indistintamente. En relación a la reactividad cruzada de los extractos totales, de los 38 pacientes positivos a *Anisakis* (IgE), solo dos pacientes fueron positivos frente al extracto de langostino y, de los seis pacientes positivos a langostino, solo uno fue positivo frente a *Anisakis* lo que demuestra una baja reactividad cruzada entre ambos extractos.

Para estudiar la reactividad cruzada entre *Anisakis* y langostino mediante inmunotransferencia, seleccionamos seis pacientes AGA y seis UC+ con los niveles más elevados de IgE frente a *Anisakis*. Además seleccionamos seis pacientes del grupo de sensibilizados a crustáceos con los niveles más elevados de IgE frente a langostino. En las inmunotransferencias, se observó que de los 12 pacientes sensibilizados a *Anisakis* seleccionados, solo un paciente presentó reacción cruzada con la tropomiosina del langostino. Por el contrario, una banda a 20 kDa que parece corresponderse con la tropomiosina de *Anisakis* fue reconocida por dos pacientes del grupo de seis pacientes seleccionados sensibilizados a crustáceos.

En conclusión, existe una baja reactividad cruzada entre *Anisakis* y el resto de organismos cuando consideramos los niveles de IgE. Además, la cocción parece ser un mecanismo eficaz para reducir la unión de IgE, pero no la de la IgG ni IgA. Asimismo, se ha demostrado el papel protector de la IgG4 anti-tropomiosina y la IgA ya que están disminuidas en los pacientes con urticaria comparado con los sujetos control. Finalmente se ha propuesto que una sensibilización previa a tropomiosina de langostino podría generar un reconocimiento cruzado de la de *Anisakis* contribuyendo a la aparición de falsos positivos diagnosticados mediante ImmunoCAP®.

4.7.2. Niveles de inmunoglobulinas en pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* frente a otros parásitos, artrópodos asociados a manifestaciones alérgicas, mariscos y pescados

Se estudió mediante ELISA indirecto la reactividad cruzada de *A. simplex* con distintos mariscos y pescados como: pulpo (*Octopus vulgaris*) crudo y cocido, almeja (*Ruditapes philippinarum*), mejillón (*Mytilus edulis*) crudo y cocido, cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) y atún (*Thunnus thynnus*); y con parásitos y otros artrópodos asociados a manifestaciones alérgicas como: *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum*, cucarachas (*Blatella germanica*) y ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Para ello se utilizó un banco de 94 sueros de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* como la AGA (N=21) y la UC+ (N=26) además de pacientes con urticaria crónica y no sensibilizados a *Anisakis* UC- (N=28); y sujetos control (C) (N=19) que no presentaban urticaria ni síntomas asociados a la parasitación por *Anisakis*.

4.7.2.1. Niveles de IgE y reacciones cruzadas

En primer lugar se decidió un criterio de positividad para la IgE específica de *Anisakis* con la D.O. media de los pacientes controles (M=0,026) más tres desviaciones estándar (SD=0,032), lo que significa que aquellos valores de D.O.>0,123 fueron considerados positivos. Con este criterio, fueron seleccionados el 95% (19/20) de los AGA y el 66,67% (16/24) de los UC+, habiendo sido excluidos el mayor número de pacientes UC-. Dado que este criterio incluye al mayor número de pacientes con AGA y deja fuera al mayor número de UC-, se aplicó este criterio de positividad [D.O.>M+3SD] para los valores de IgE obtenidos con los mismos sueros frente a cada uno de los diferentes extractos proteicos. Empleando este criterio se calcularon los porcentajes de positividad de la IgE de los sueros frente a todos los extractos analizados (Tabla 25 y Figuras 92-103).

Tabla 25. Porcentajes de reconocimiento de la IgE del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.

Especie	AGA (N=13)*	UC+ (N=18)*	UC- (N=23)	C (N=19)	M+3SD (D.O.)
<i>Anisakis simplex</i>	95	66,67	13,04	5,26	0,123
<i>Procambarus clarkii</i>	100	100	100	0	0,025
<i>Thunnus thynnus</i>	100	100	100	0	0,040
<i>Ruditapes philippinarum</i>	100	100	91,30	0	0,033
<i>Blatella germanica</i>	84,62	94,44	95,65	0	0,034
<i>Trichinella spiralis</i>	76,92	94,44	100	0	0,020
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	61,54	88,89	86,96	0	0,023
<i>Mytilus edulis</i>	84,62	77,78	78,26	0	0,038
<i>Ascaris suum</i>	70	54,17	78,26	0	0,052
<i>Octopus vulgaris</i>	30,77	83,33	47,82	0	0,038
<i>Mytilus edulis</i> (cocido)	46,15	61,11	34,78	0	0,035
<i>Octopus vulgaris</i> (cocido)	0	16,67	4,35	5,26	0,109

AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. M+3SD indica la absorbancia umbral de positividad. * Para los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* el número de pacientes fue: AGA (N=20) y UC+ (N=24).

Un total de 39 pacientes resultaron positivos a *Anisakis* (19 AGA, 16 UC+, tres UC- y un C). En ellos, se analizó su positividad frente a los demás extractos para determinar los porcentajes de reactividad

cruzada siendo en el cangrejo de río, almeja, atún, cucaracha, *Trichinella*, mejillón crudo, ácaro del polvo, pulpo crudo y *Ascaris* superiores al 60% (Figura 91). La positividad frente a los extractos de mejillón cocido y pulpo cocido se redujo un 38,5% y un 85%, respectivamente tras el proceso de cocción.

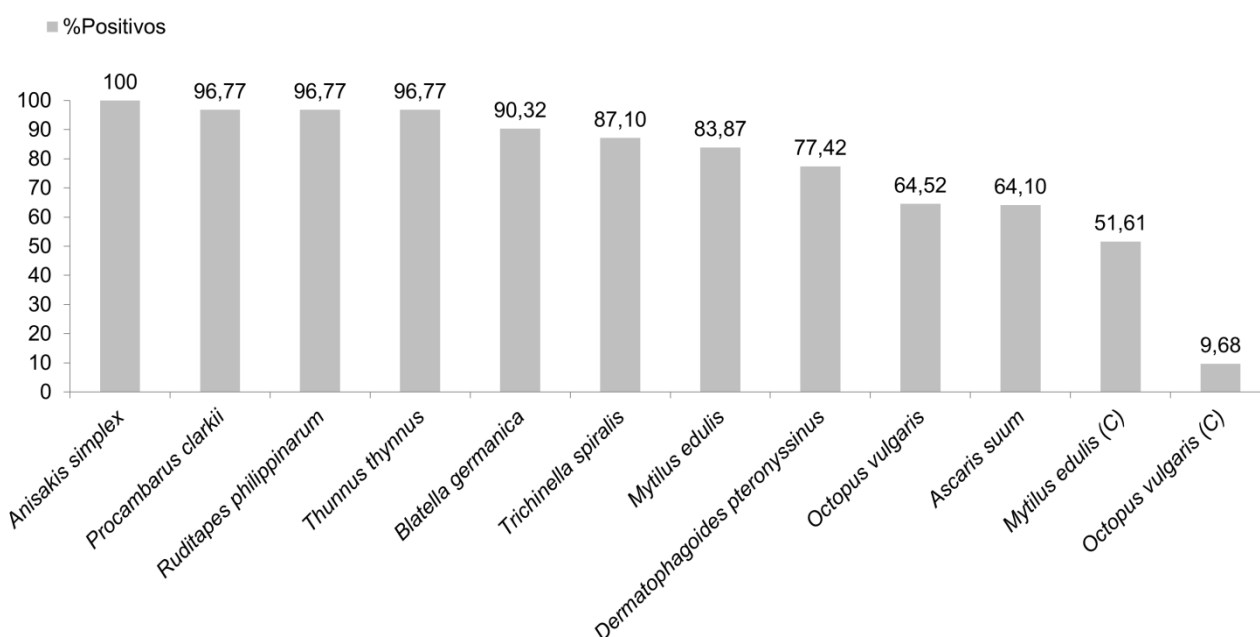


Figura 91. Porcentajes de reacción cruzada de la IgE los pacientes positivos a *Anisakis simplex* frente a los extractos de los organismos estudiados. C: Cocido.

Cuando se analizaron las reacciones cruzadas de los pacientes positivos a *Anisakis* por grupos, los pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-) presentaron, generalmente, porcentajes de positividad más elevados que los pacientes de los grupos AGA y C (sin urticaria crónica) (Tabla 26).

Tabla 26. Porcentaje de reacción cruzada de la IgE de los pacientes positivos a *Anisakis simplex* por grupos frente a los extractos de los organismos estudiados.

Especie	AGA (N=13)*	UC+ (N=14)*	UC- (N=3)	C (N=1)
<i>Anisakis simplex</i>	100	100	100	100
<i>Procambarus clarkii</i>	100	100	100	0
<i>Ruditapes philippinarum</i>	100	100	100	0
<i>Thunnus thynnus</i>	100	100	100	0
<i>Blatella germanica</i>	84,62	100	100	0
<i>Trichinella spiralis</i>	76,92	100	100	0
<i>Mytilus edulis</i>	84,62	85,71	100	0
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	61,54	100	66,67	0
<i>Octopus vulgaris</i>	30,77	92,86	100	0
<i>Ascaris suum</i>	73,68	56,25	66,67	0
<i>Mytilus edulis</i> (cocido)	46,15	64,29	33,33	0
<i>Octopus vulgaris</i> (cocido)	0	14,29	33,33	0

AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. * Para los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* el número de pacientes fue: AGA (N=19) y UC+ (N=16).

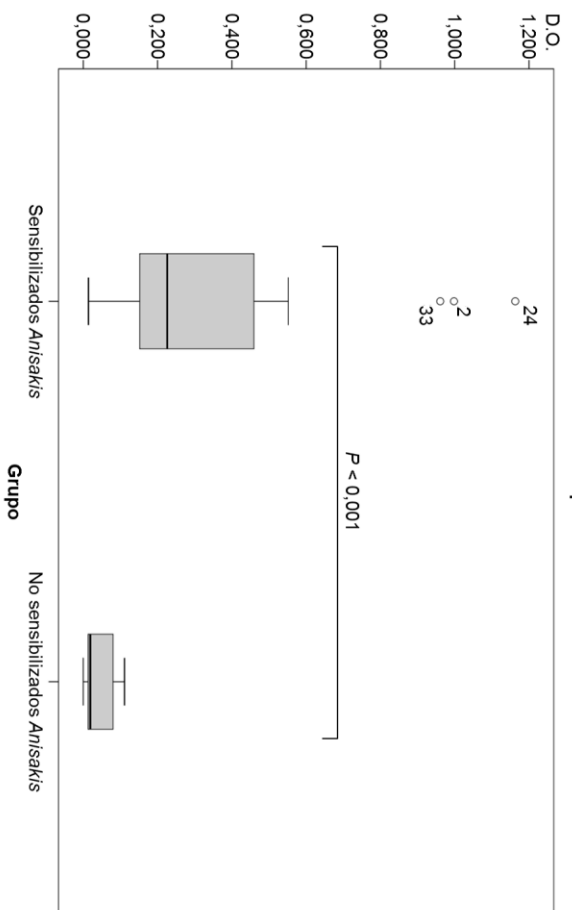
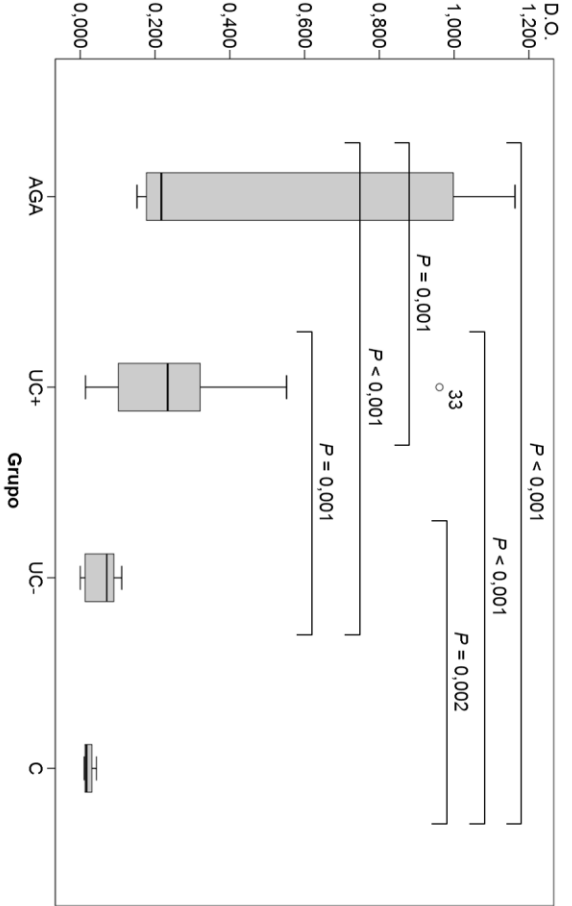
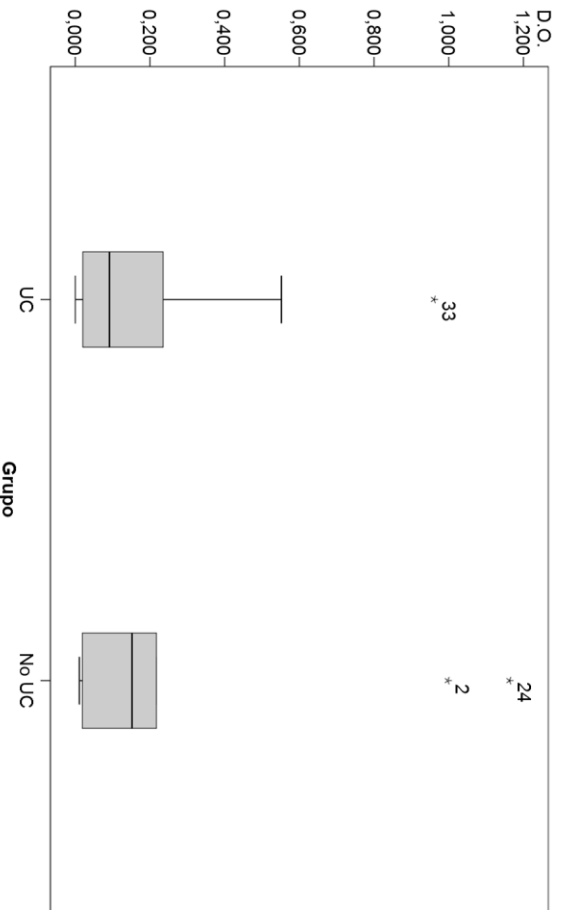
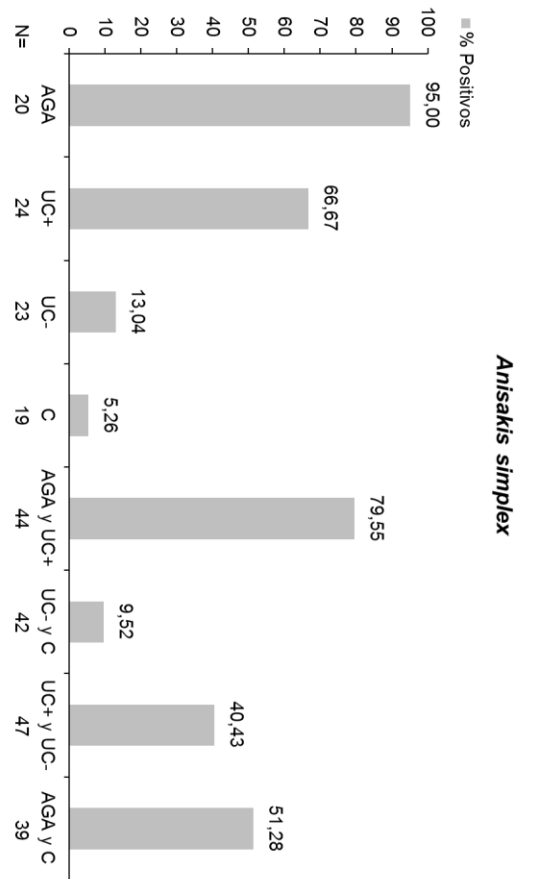


Figura 92. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de *Anisakis* empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

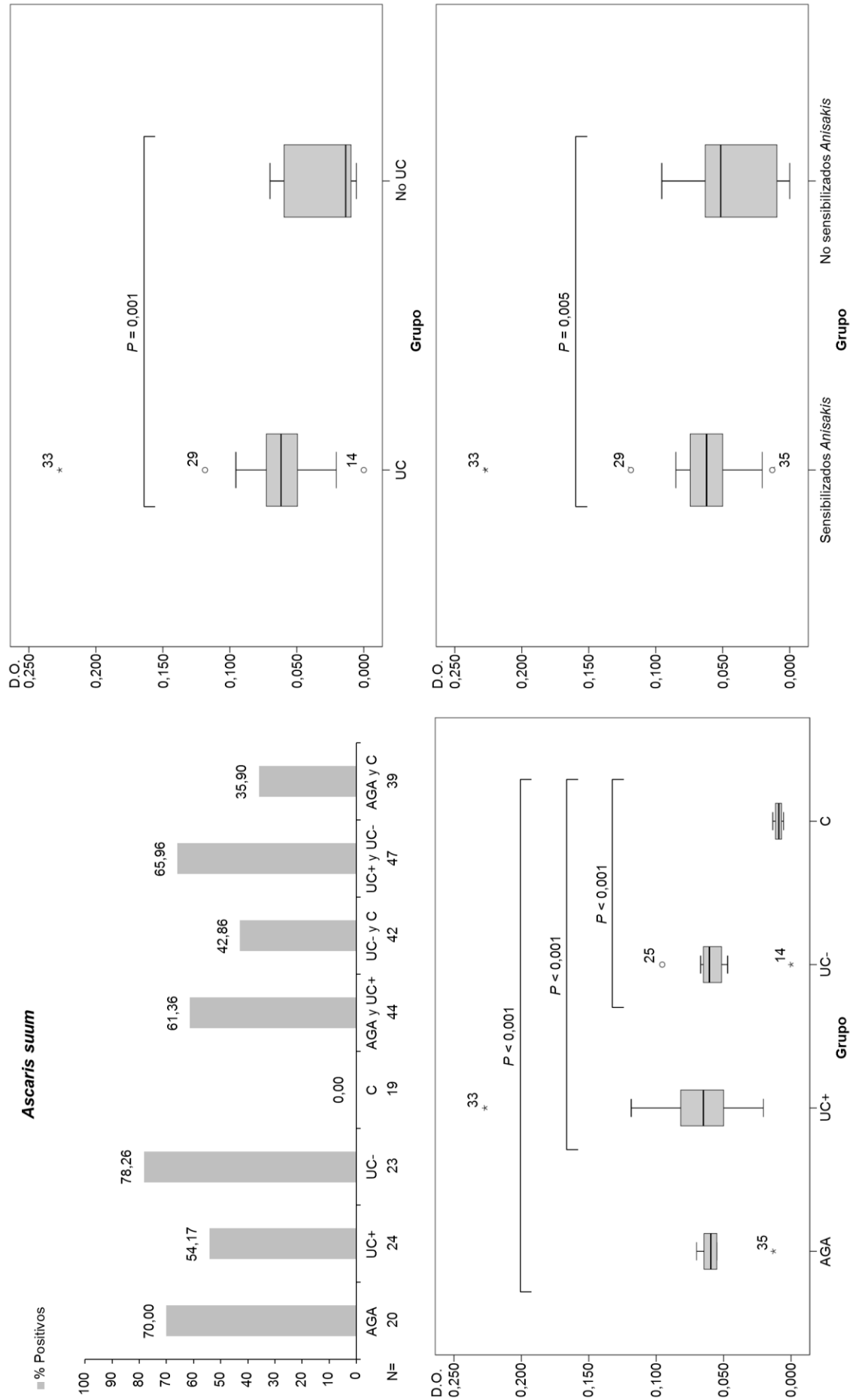


Figura 93. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de *Ascaris* empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

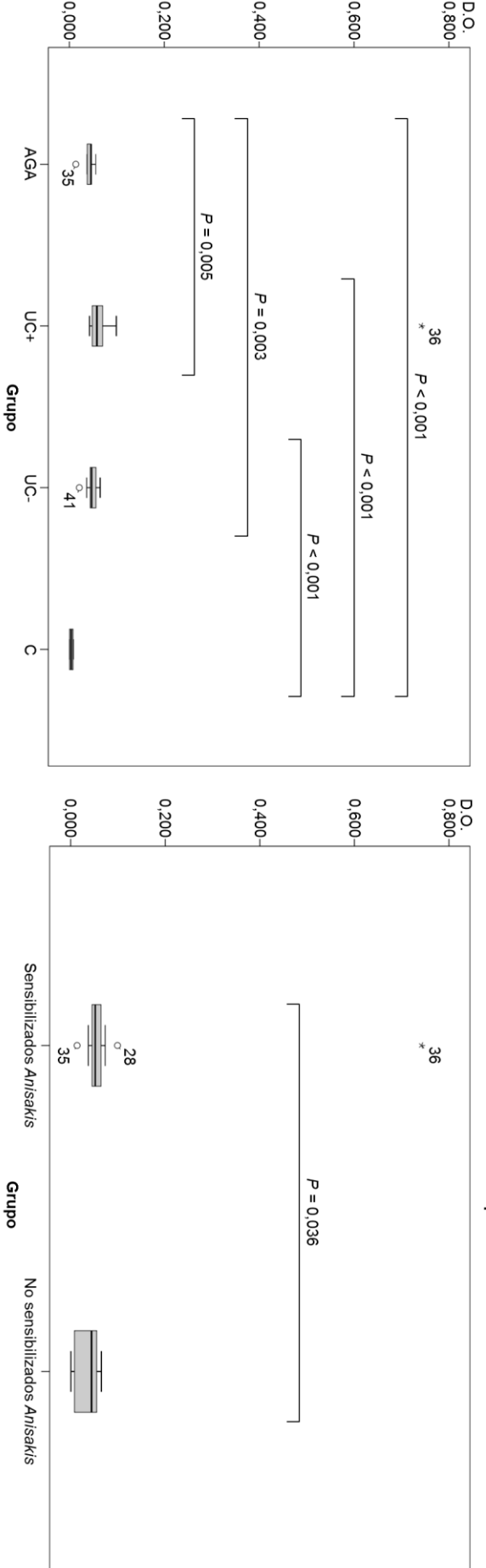
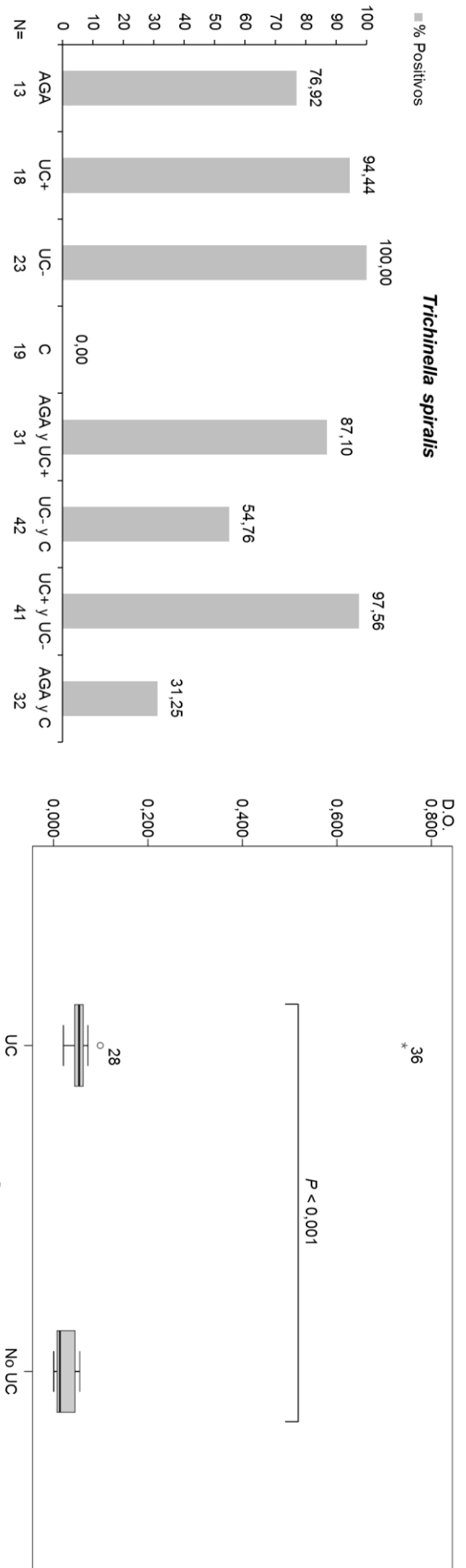


Figura 94. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de *Trichinella* empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

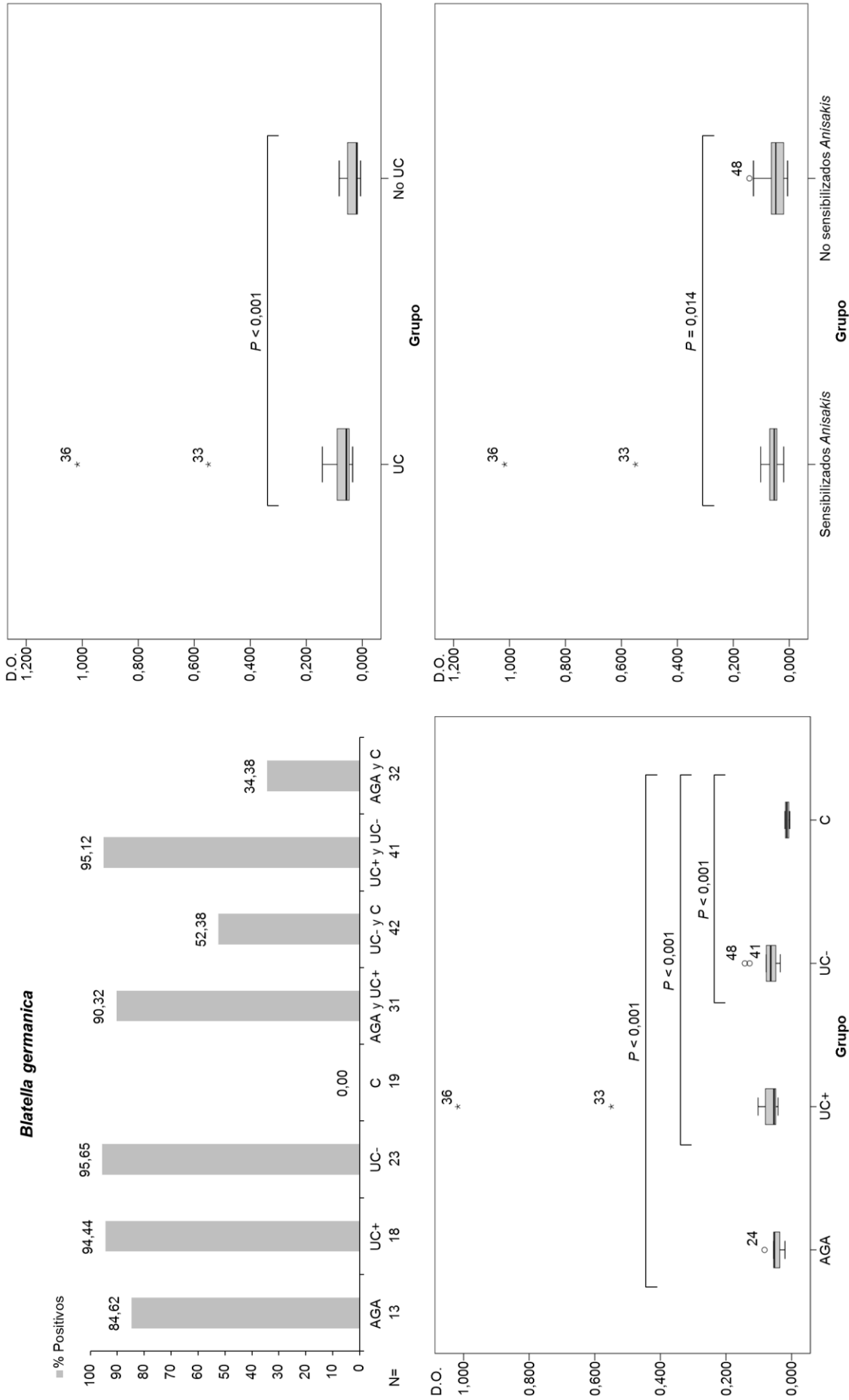


Figura 95. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de cucaracha empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

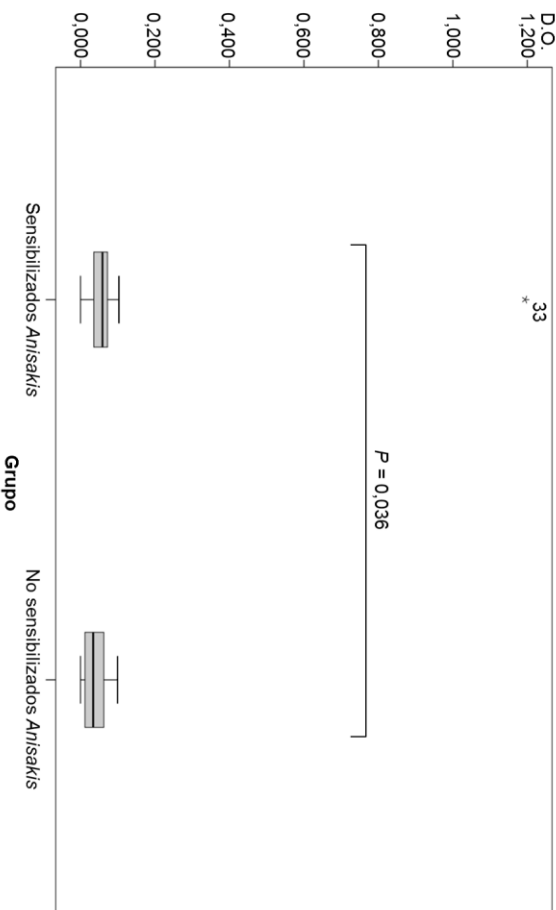
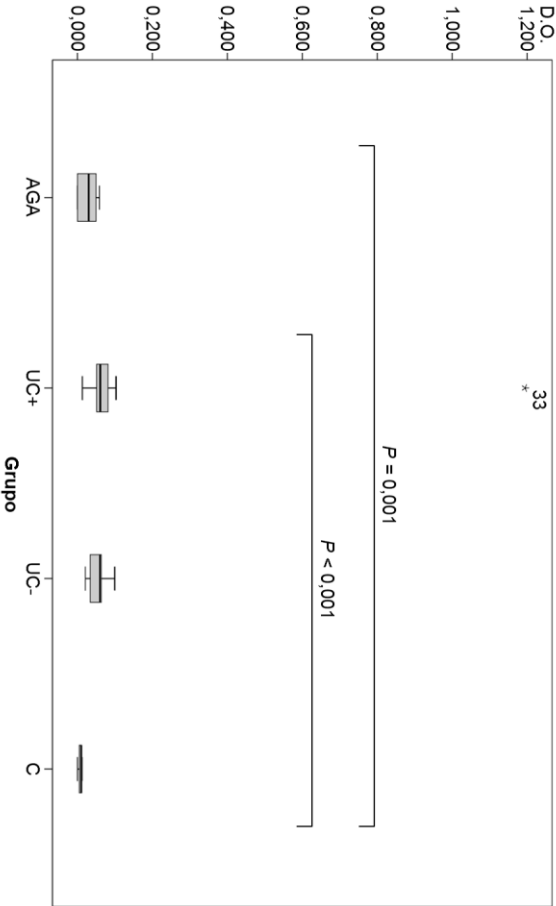
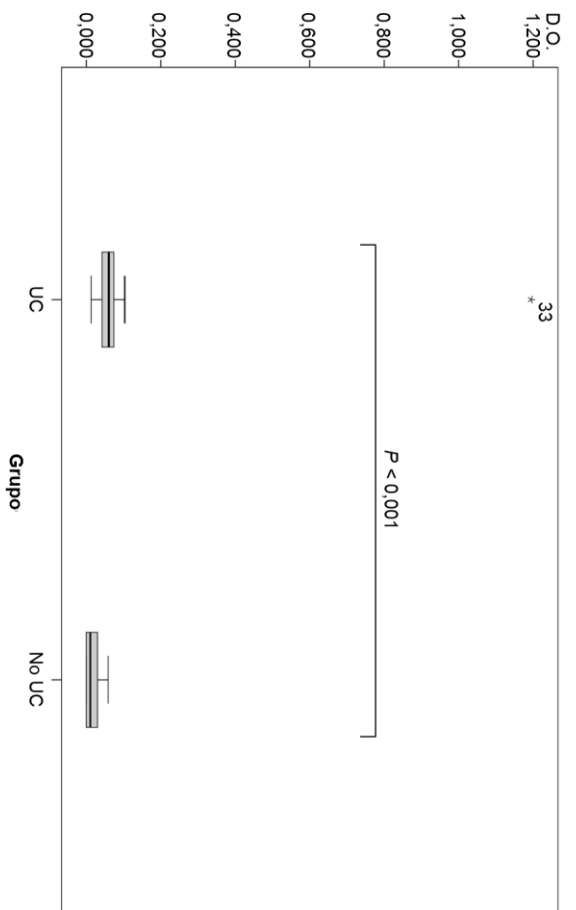
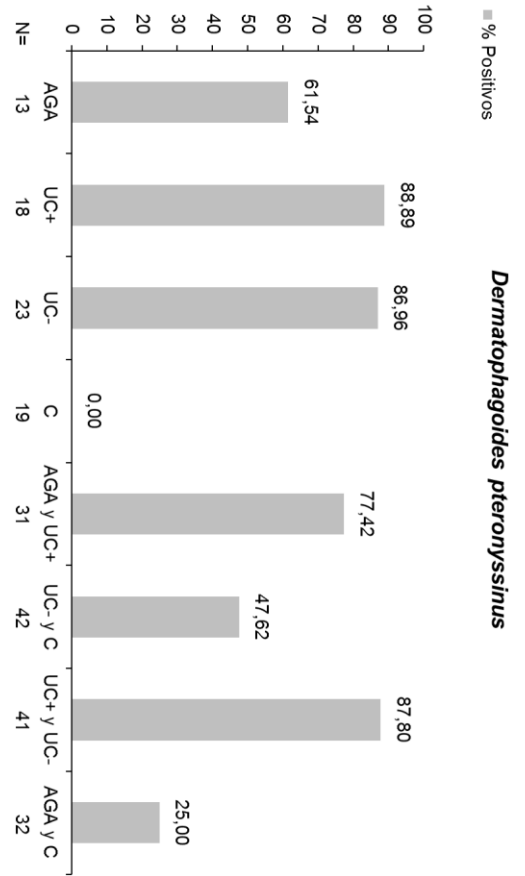


Figura 96. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de ácido empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

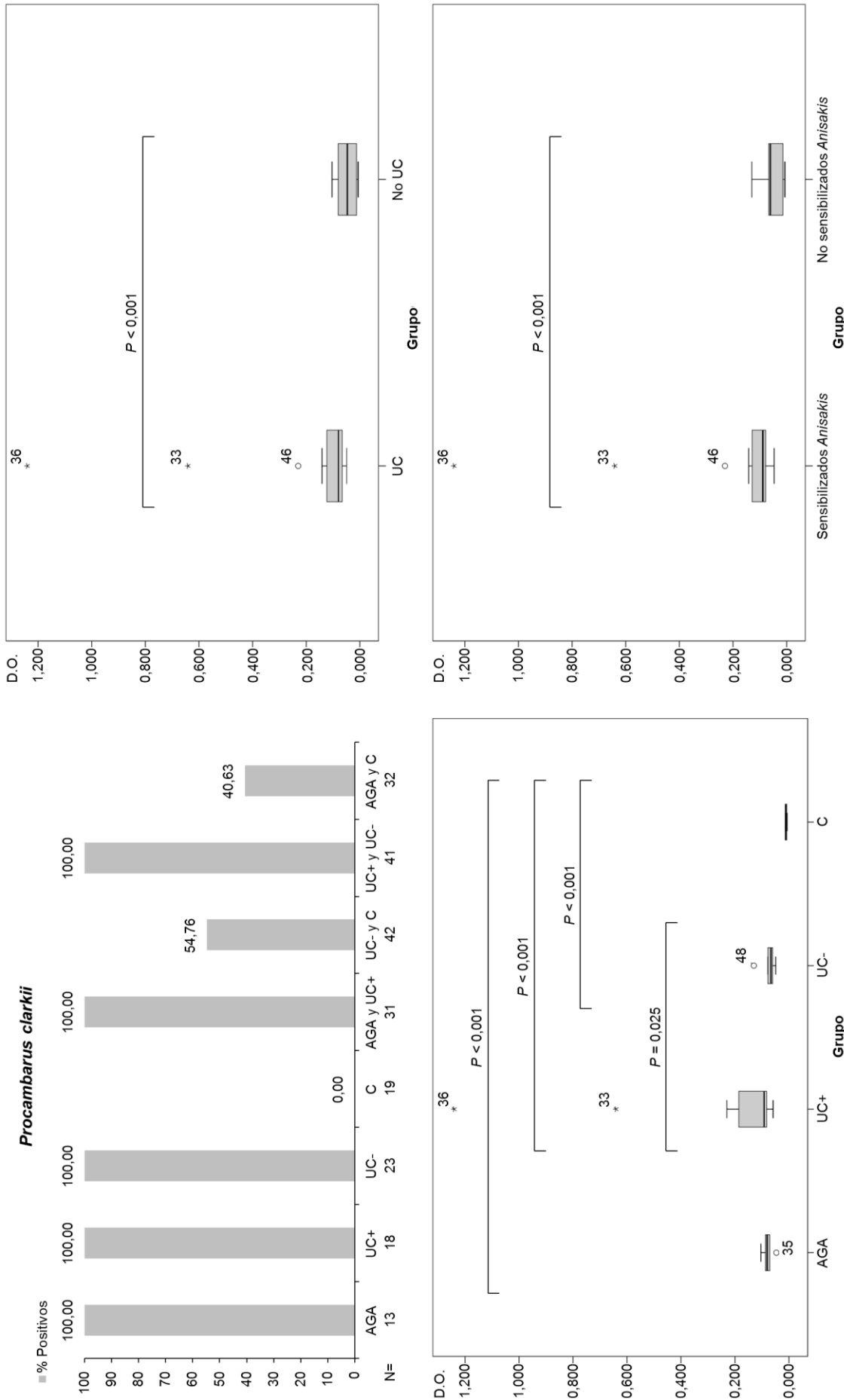


Figura 97. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de cangrejo de río empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

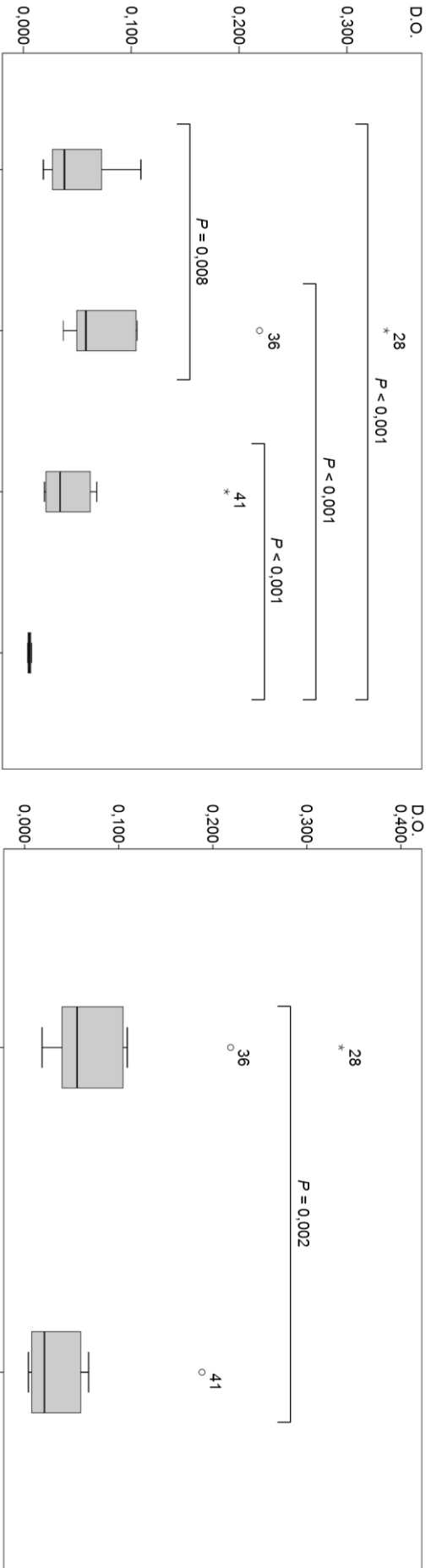
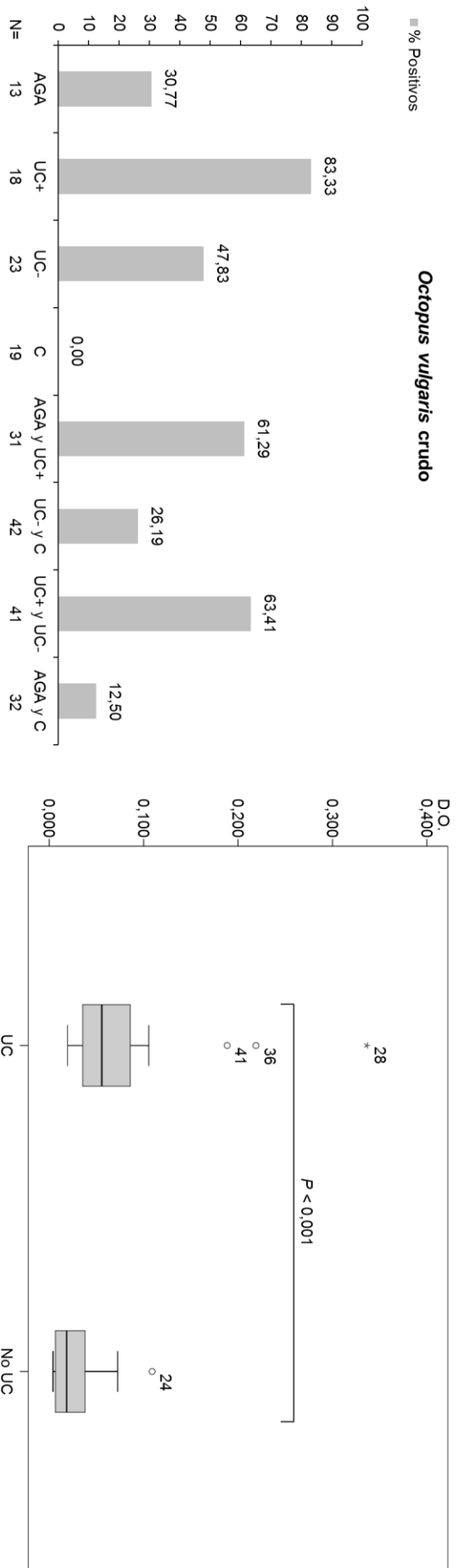


Figura 98. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de pulpo empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

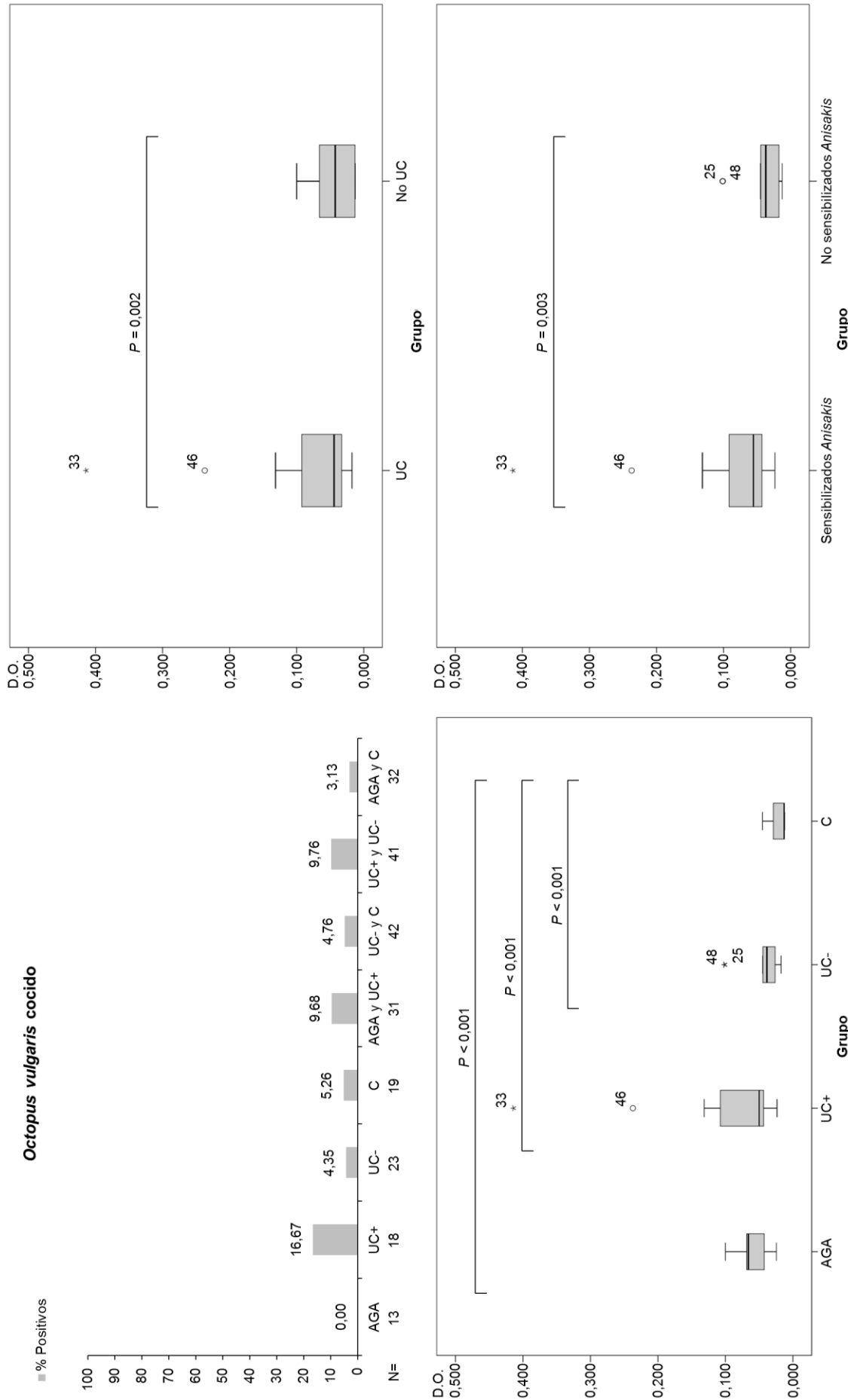


Figura 99. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de pulpo cocido empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

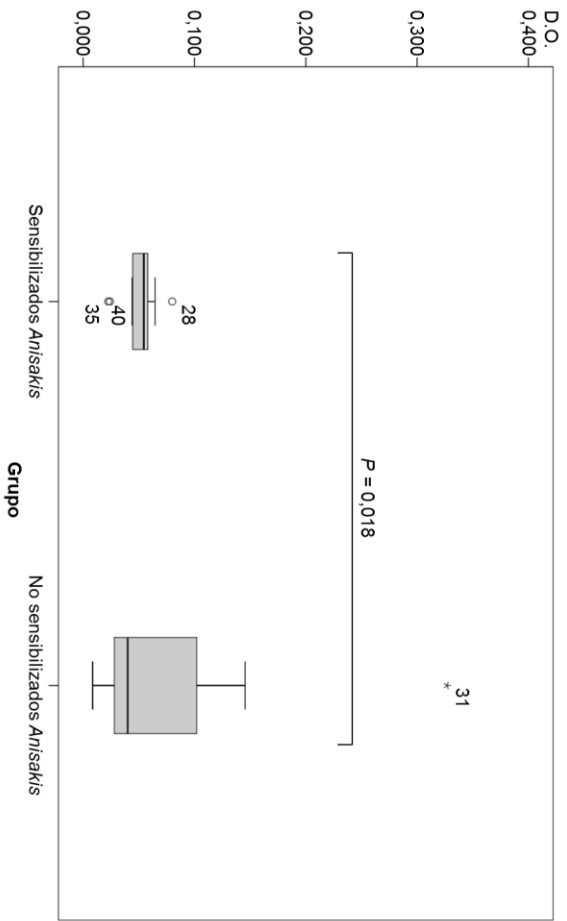
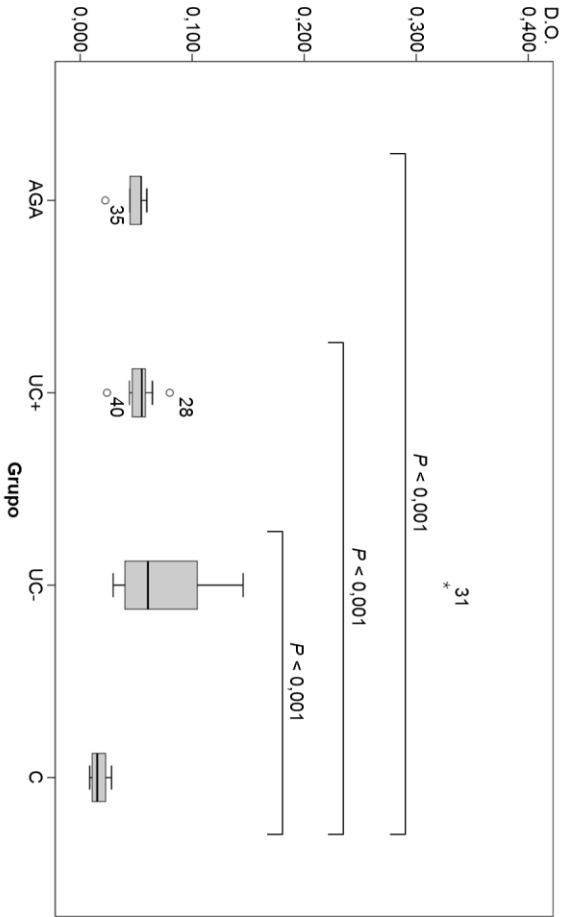
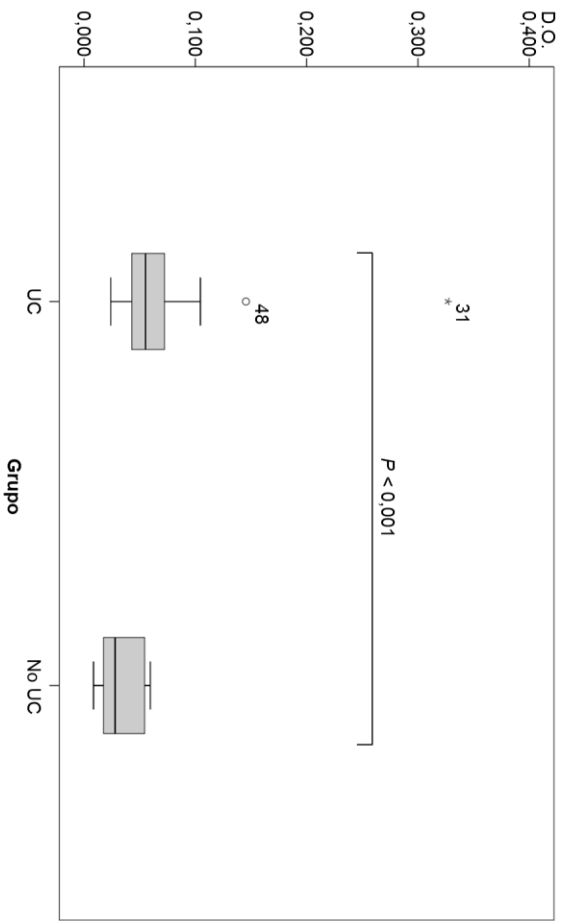
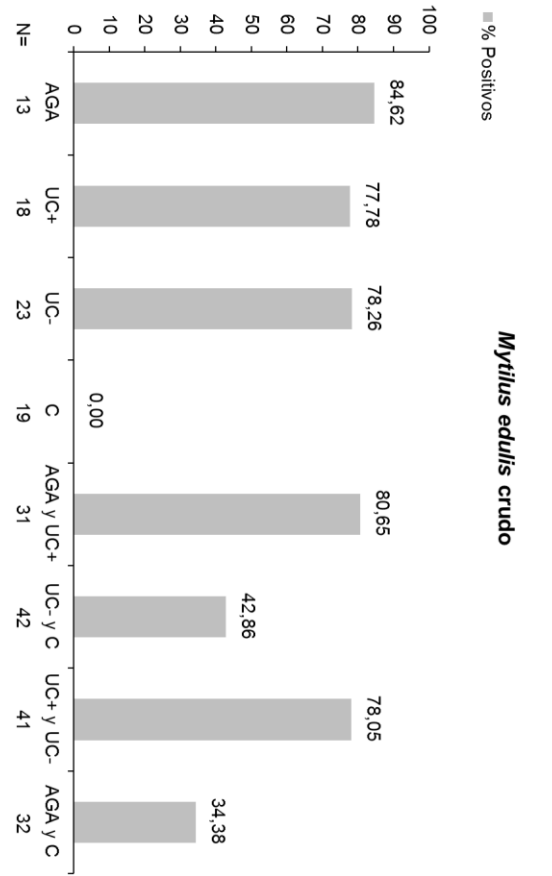


Figura 100. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de mejillón empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

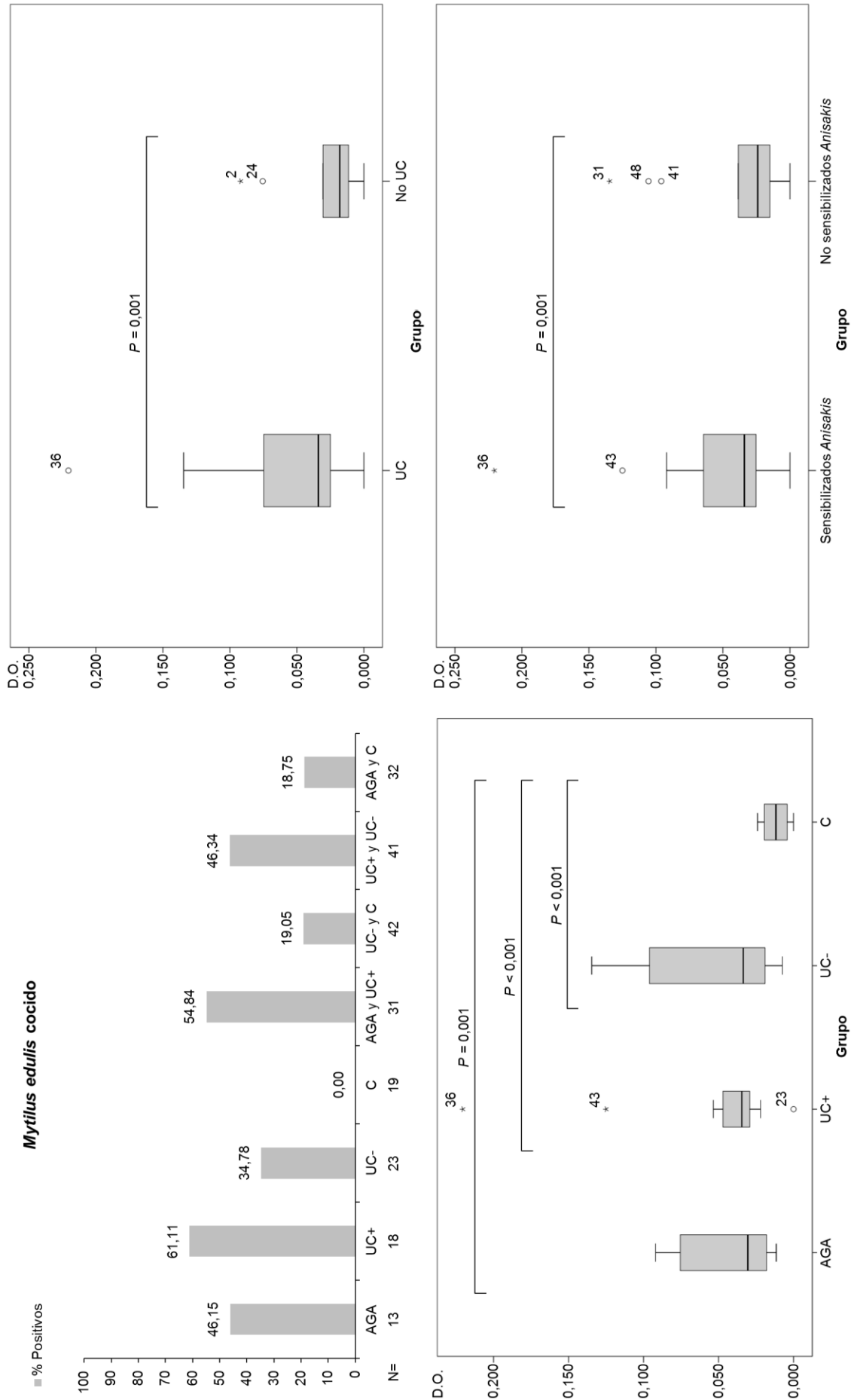


Figura 101. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de mejillón cocido empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

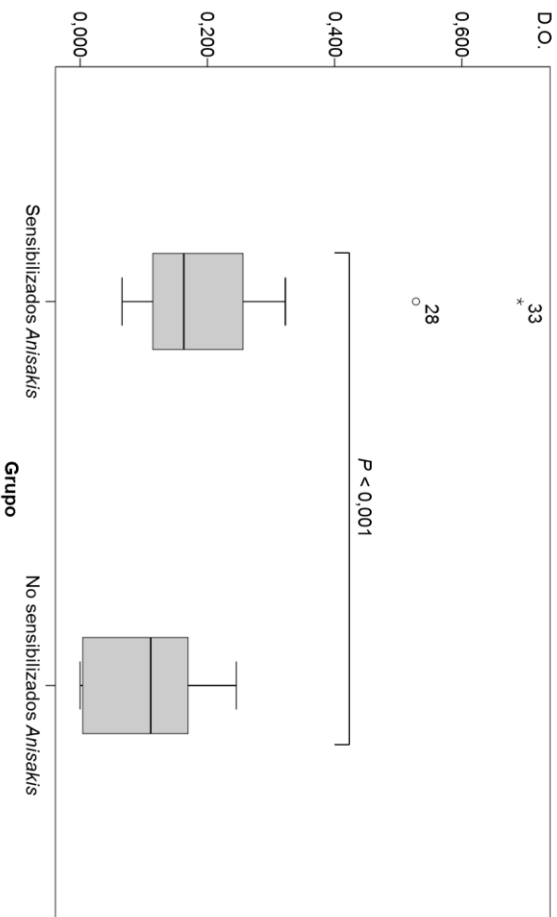
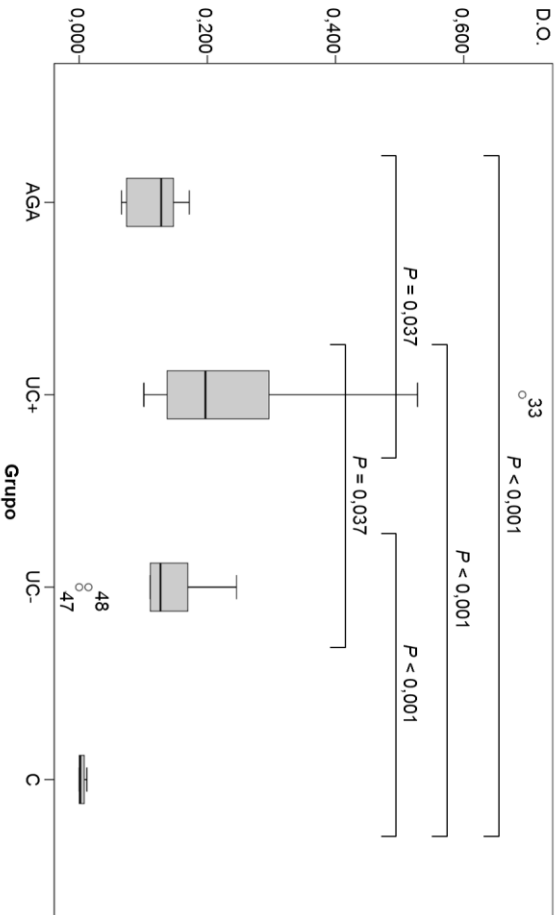
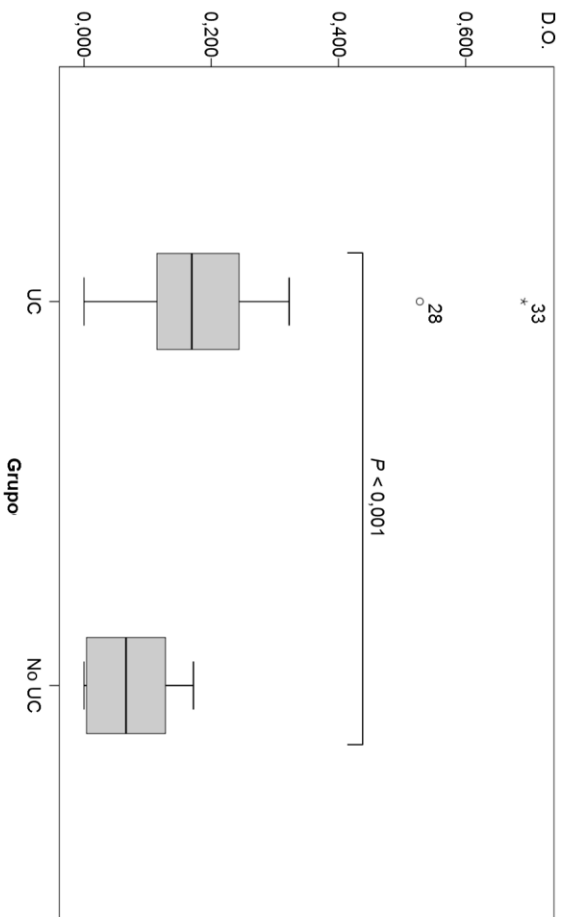
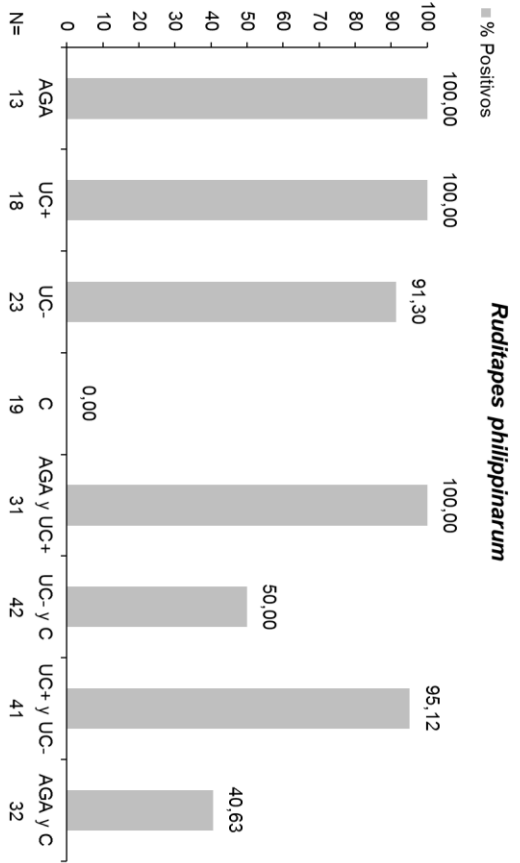


Figura 102. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de almeja empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

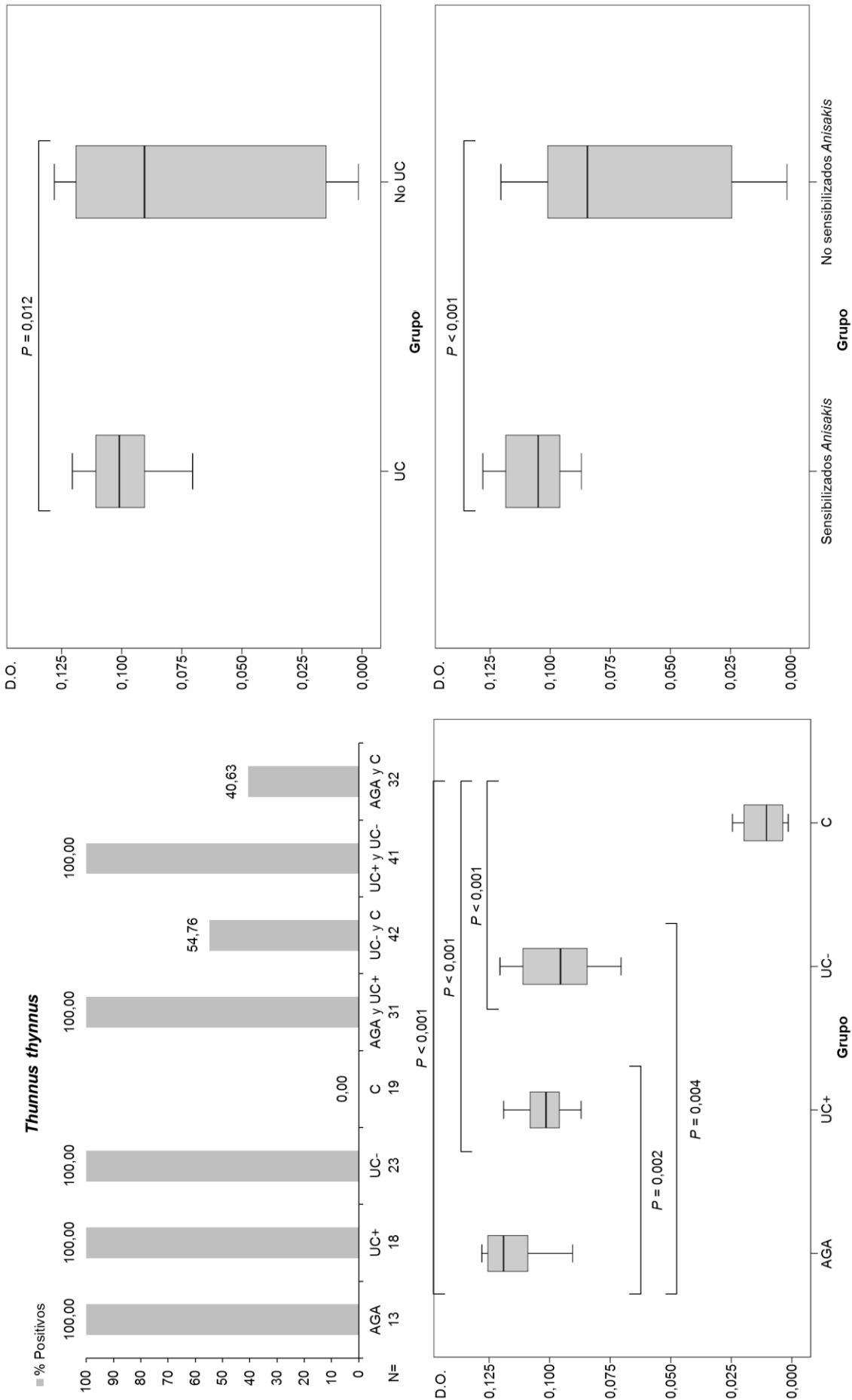


Figura 103. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de atún empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C). N: Número total de sueros. UC: Engloba los grupos UC+ y UC-. No UC: Engloba los grupos AGA y C. Sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos AGA y UC+. No sensibilizados *Anisakis*: engloba los grupos UC- y C.

Por otro lado, se analizaron los niveles de IgE y positividad por grupos; y también agrupando a todos los pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-) o a todos los pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* (AGA y UC+) (Figuras 92-103).

En el caso de *Anisakis*, se observó el perfil de reconocimiento de IgE: AGA>UC+>UC->C con claras diferencias de reconocimiento entre los cuatro grupos. Los sujetos del grupo control (C) presentaron niveles significativamente menores de IgE en comparación con el resto de grupos frente a todos los extractos estudiados. Este hecho se relaciona con el elevado porcentaje de pacientes positivos observado frente a cada uno de los extractos porque el criterio de positividad (M+3SD) fue calculado en función de la IgE de los sueros del grupo control (C) frente a cada extracto (Tabla 25).

Los pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-), presentaron niveles superiores de IgE frente a todos los extractos comparado con los que no tenían urticaria crónica (AGA y C), exceptuando el extracto de *Anisakis*.

Finalmente, agrupando por un lado a los pacientes sensibilizados a *Anisakis* (AGA y UC+) y, por otro, a los no sensibilizados (UC- y C); se observaron niveles de IgE superiores en los pacientes sensibilizados a *Anisakis* comparado con los niveles de IgE de los sujetos no sensibilizados frente a todos los extractos.

4.7.2.2. Niveles de IgG

Se calculó el porcentaje de sueros positivos para la IgG aplicando el mismo criterio que para la IgE (M+3SD) (Tabla 27). Los extractos de los parásitos *Anisakis*, *Trichinella* y *Ascaris*, presentaron el mayor número de positivos para IgG, siendo en el grupo de AGA para *Anisakis* y *Ascaris* el de mayor porcentaje de positividad. No fue así para *Trichinella* ni para el resto de extractos, en los que los grupos UC+ y UC- concentraron un mayor número de sueros positivos.

Tabla 27. Porcentajes de reconocimiento de la IgG del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.

Especies	AGA (N=14)	UC+ (N=18)	UC- (N=23)	C (N=18)	AGA y UC+ (N=32)	UC- y C (N=41)	UC+ y UC- (N=41)	AGA y C (N=32)	M+3SD (D.O)
<i>Anisakis simplex</i>	78,57	72,22	13,04	0,00	75,00	7,32	39,02	34,38	1,396
<i>Ascaris suum</i>	14,29	11,11	0,00	0,00	12,50	0,00	4,88	6,25	1,148
<i>Trichinella spiralis</i>	28,57	27,78	30,43	5,56	28,13	19,51	29,27	15,63	0,781
<i>Procambarus clarkii</i>	0,00	11,11	4,35	0,00	6,25	2,44	7,32	0,00	1,105
<i>Blatella germanica</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,234
<i>D. pteromyssinus</i>	0,00	0,00	8,70	0,00	0,00	4,88	4,88	0,00	0,977
<i>Octopus vulgaris</i>	0,00	0,00	8,70	5,56	0,00	7,32	4,88	3,13	0,926
<i>O. vulgaris</i> (cocido)	0,00	0,00	4,35	0,00	0,00	2,44	2,44	0,00	1,857
<i>Mytilus edulis</i>	0,00	0,00	4,35	0,00	0,00	2,44	2,44	0,00	1,615
<i>M. edulis</i> (cocido)	7,14	5,56	8,70	0,00	6,25	4,88	7,32	3,13	0,725
<i>R. philippinarum</i>	7,14	5,56	8,70	0,00	6,25	4,88	7,32	3,13	1,569
<i>Thunnus thynnus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,757

AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. M+3SD indica la absorbancia umbral de positividad.

También se compararon los niveles de IgG por grupos del mismo modo que se realizó con la IgE (Figuras 104 y 105). Al analizar los valores de IgG obtenidos frente a *Anisakis*, nos encontramos con un perfil de absorbancia similar al de la IgE (AGA>UC+>UC->C) con los grupos claramente diferenciados.

Los sujetos del grupo control presentaron niveles más bajos de IgG frente a los extractos de *Ascaris*, *Trichinella*, mejillón cocido, cangrejo de río y mejillón cocido (Figuras 104 y 105). Asimismo, los individuos pertenecientes a los grupos AGA y C presentaron niveles más bajos que los pacientes con urticaria (UC+ y UC-) frente al extracto de pulpo cocido (Figura 105). Además, observamos que el reconocimiento de la IgG no se vio reducido frente a los extractos cocidos de pulpo y mejillón, como si ocurría con la IgE, presentando incluso una D.O. más elevada frente al extracto de pulpo cocido que frente al crudo.

Por otro lado, observamos que existía una tendencia de niveles más elevados de IgG en los sueros pertenecientes a los grupos UC- y C frente a los extractos de los artrópodos *B. germanica* y *D. pteromyssinus*, y frente a los de los moluscos crudos pulpo, mejillón y almeja. Además, se observaron niveles significativamente elevados de IgG en los sujetos del grupo control (C) frente a extracto de atún (Figura 105).

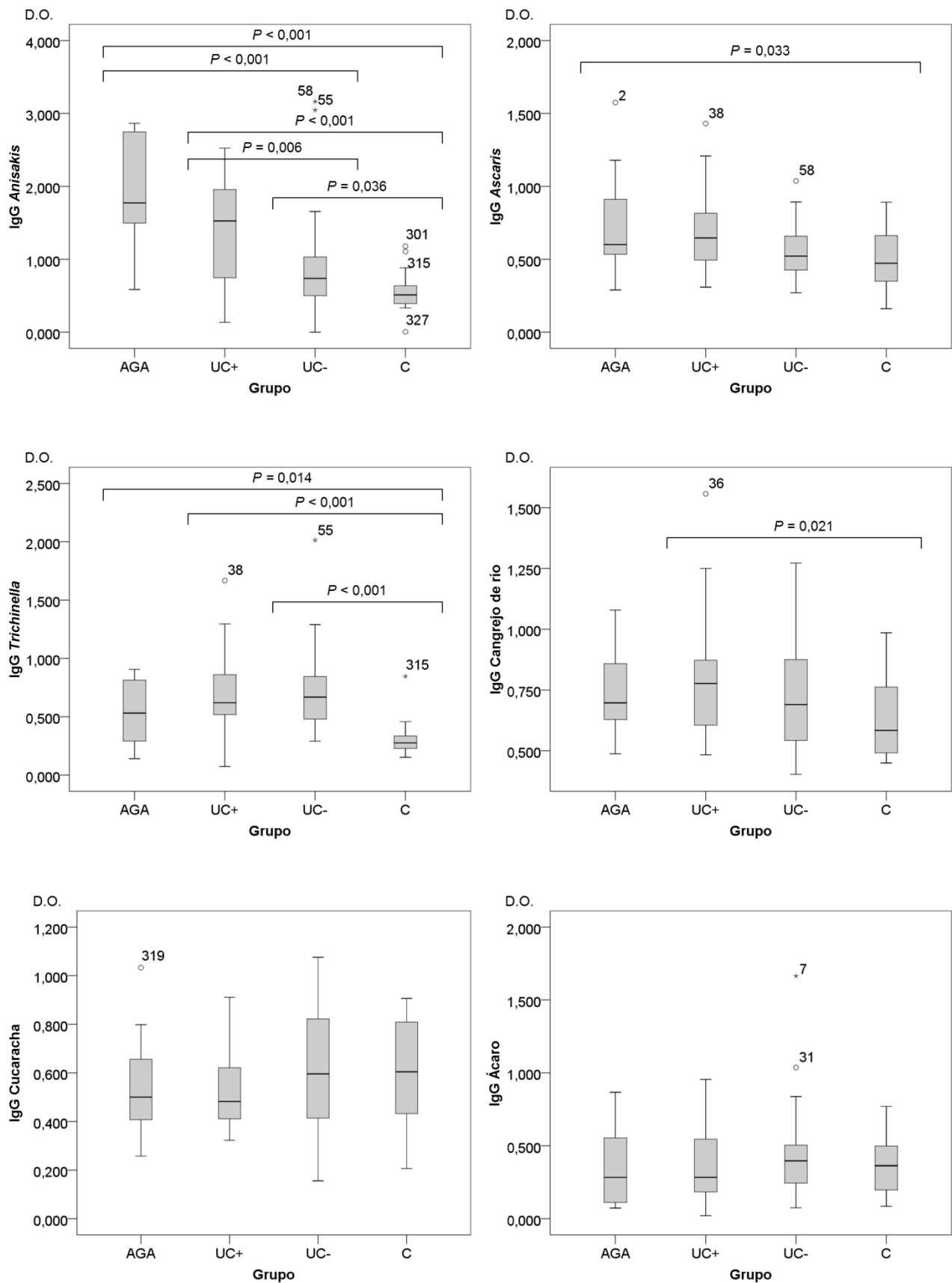


Figura 104. Medianas y rangos intercuartiles de la IgG frente a los extractos de *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Procambarus clarkii*, *Blatella germanica* y *Dermatophagoides pteronyssinus*. AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=14). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=18). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=23). C: Controles (N=18).

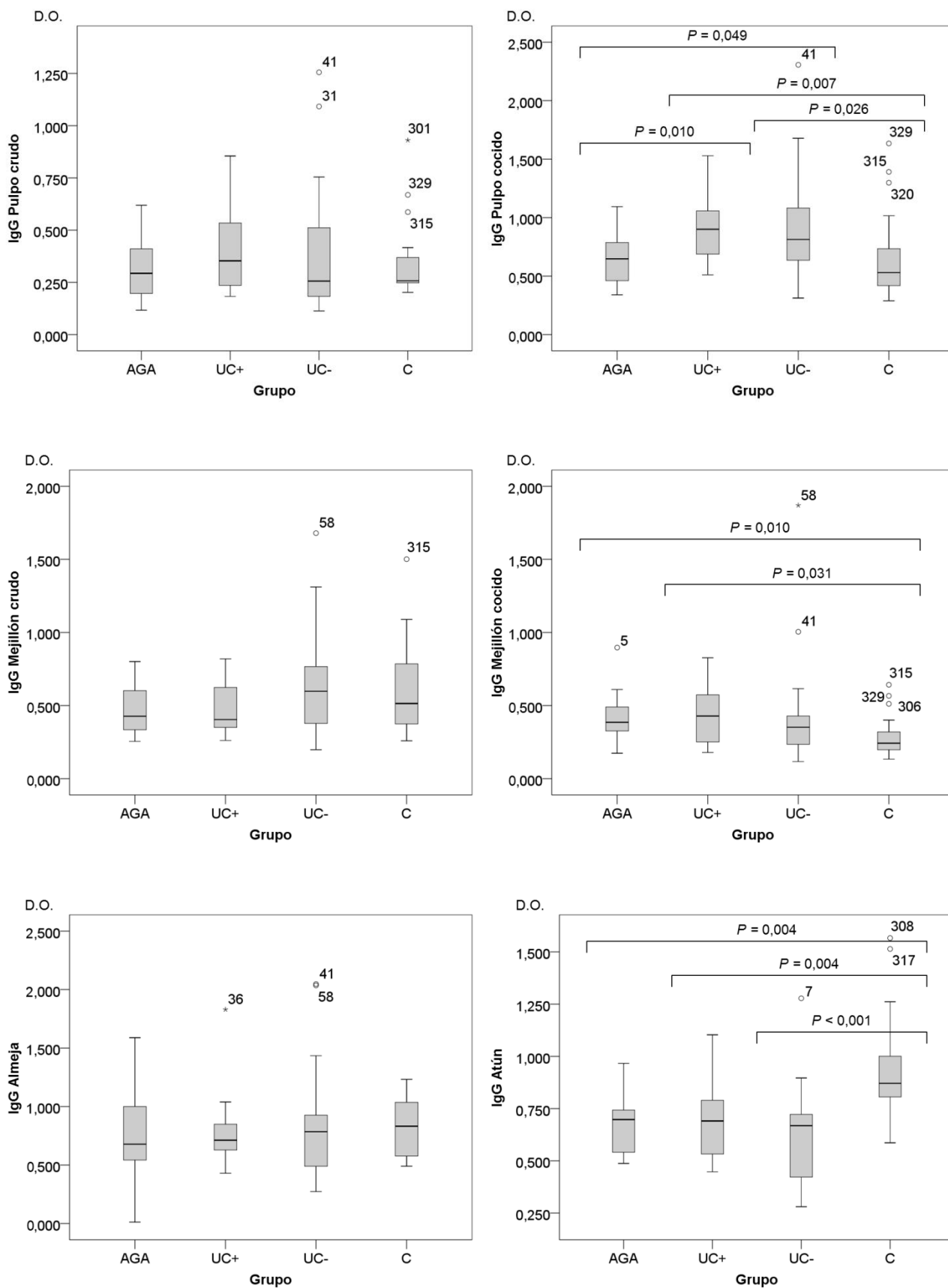


Figura 105. Medianas y rangos intercuartiles de la IgG frente a los extractos de *Octopus vulgaris* crudo y cocido, *Mytilus edulis* crudo y cocido, *Ruditapes philippinarum* y *Thunnus thynnus*. AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=14). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=18). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=23). C: Controles (N=18).

Los porcentajes de positividad para la subclase IgG4 únicamente fueron estudiados frente a los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* (Figura 106). Aunque la intensidad de reconocimiento por parte de la IgG4 frente al extracto de *Anisakis* fue superior al de *Ascaris*, el perfil de positividad fue similar al de la IgE de *Anisakis* AGA>UC+>UC->C; siendo los niveles de IgG4 en el grupo de AGA significativamente mayores en comparación con los del resto de grupos frente a ambos extractos (Figura 106). Esta mayor cantidad de positivos en el grupo AGA conllevó un aumento del porcentaje de positivos al realizar el análisis agrupado, siendo en los grupos de pacientes sensibilizados a *Anisakis* (AGA y UC+) en los que se observó una mayor tasa de positivos.

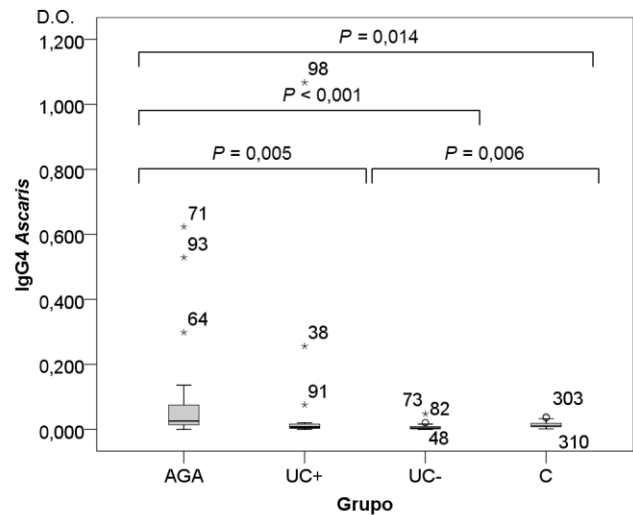
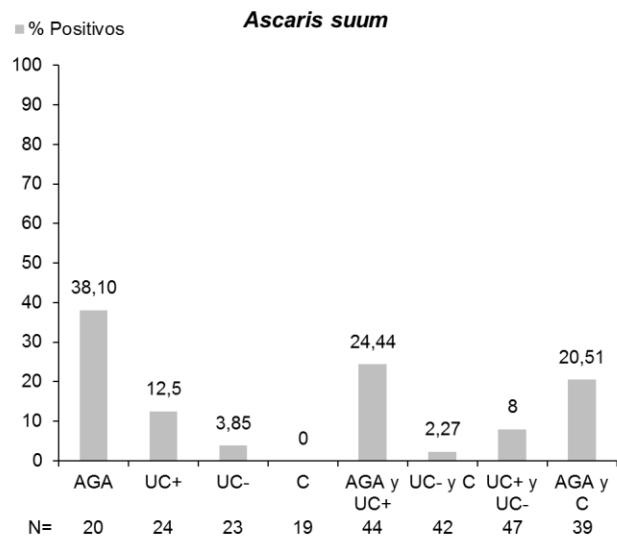
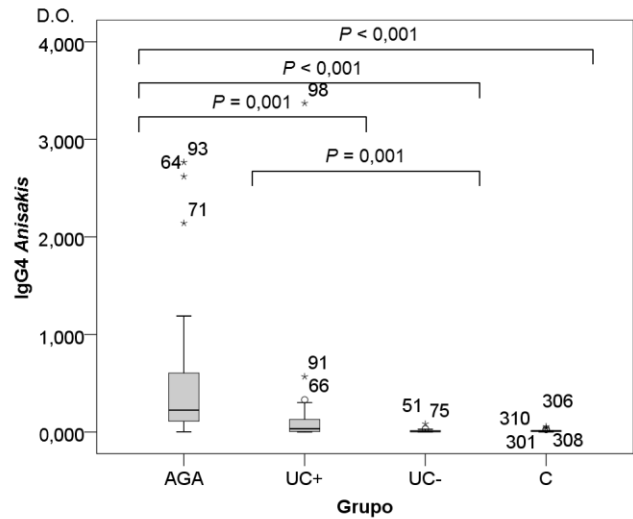
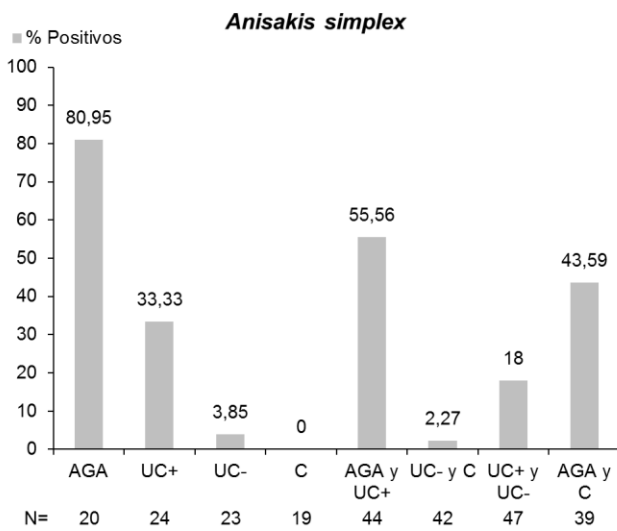


Figura 106. Porcentajes de positividad y niveles de IgG4 sérica medidos mediante ELISA indirecto frente a los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* y sujetos control (C). N: Número total de sueros.

4.7.2.3. Niveles de IgA

Se calculó el porcentaje de sueros positivos para la IgA aplicando el mismo criterio que para la IgE y la IgG (M+3SD) (Tabla 28). Los extractos de los parásitos *Anisakis* y *Ascaris* presentaron el mayor número de positivos para IgA, seguidos por el extracto de cangrejo de río. El perfil de positividad de la IgA frente a *Anisakis* se asemeja al obtenido con la IgE e IgG (AGA>UC+>UC->C) pero con menor número de positivos, sin embargo fueron los grupos de UC+ y UC- los que presentaron más IgA frente al extracto de *Ascaris* y los grupos UC- y C frente al de *Trichinella*. Con respecto a los extractos de organismos no parásitos, los grupos UC+ y UC- presentaron pacientes positivos frente a los extractos de cangrejo de río, pulpo crudo y cocido; y excepcionalmente el 28,57% de los pacientes AGA resultaron positivos para IgA frente al cangrejo de río (Tabla 28).

Tabla 28. Porcentajes de reconocimiento de la IgA del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.

Especies	AGA (N=14)	UC+ (N=18)	UC- (N=23)	C (N=19)	AGA y UC+ (N=32)	UC- y C (N=42)	UC+ y UC- (N=41)	AGA y C (N=33)	M+3SD (D.O)
<i>Anisakis simplex</i> *	55,56	25,00	8,00	0,00	38,10	4,65	16,33	27,78	1,492
<i>Ascaris suum</i>	14,29	38,89	30,43	0,00	28,13	16,67	34,15	6,06	0,312
<i>Trichinella spiralis</i>	0,00	0,00	4,35	5,26	0,00	4,76	2,44	3,03	0,645
<i>Procambarus clarkii</i>	28,57	11,11	34,78	0,00	18,75	19,05	24,39	12,12	0,488
<i>Blatella germanica</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,889
<i>D. pteronysinus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,072
<i>Octopus vulgaris</i>	0,00	5,56	13,04	0,00	3,13	7,14	9,76	0,00	3,026
<i>O. vulgaris</i> (cocido)	0,00	11,11	13,04	0,00	6,25	7,14	12,20	0,00	2,240
<i>Mytilus edulis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,934
<i>M. edulis</i> (cocido)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,202
<i>R. philippinarum</i>	0,00	0,00	4,35	0,00	0,00	2,38	2,44	0,00	3,426
<i>Thunnus thynnus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,561

AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. M+3SD indica la absorbancia umbral de positividad. *El número de sueros (N) enfrentados al extracto de *Anisakis* fue: AGA (N=18), UC+ (N=24), UC- (N=25) y C (N=18).

También se compararon los niveles de IgA por grupos del mismo modo que se realizó con la IgE y la IgG (Figuras 107 y 108). Con respecto al extracto de *Anisakis*, el perfil de absorbancia fue similar al de la IgE (AGA>UC+>UC->C) con los grupos claramente diferenciados. No se observaron diferencias en los niveles de IgA entre los grupos frente a los extractos de *Ascaris*, *Trichinella*, cucaracha y atún, sin embargo los controles mostraron niveles más bajos de IgA que el resto de grupos frente al extracto de cangrejo de río. Al contrario sucedió frente al resto de extractos (ácaro, pulpo crudo y cocido; mejillón crudo y cocido; y almeja) en los que los controles presentaron niveles más elevados de IgA que los sueros del resto de grupos. El reconocimiento de la IgA no se vio afectado por el proceso de cocción.

Agrupando los sueros, observamos que había mayores niveles de IgA frente a los moluscos crudos en pacientes sin urticaria crónica (AGA y C vs UC+ y UC-) (pulpo: $P=0,069$; mejillón: $P=0,006$ y almeja: $P=0,015$, respectivamente). Por otro lado la IgA fue mayor en los pacientes con urticaria vs no urticaria frente al extracto de cangrejo de río ($P=0,025$).

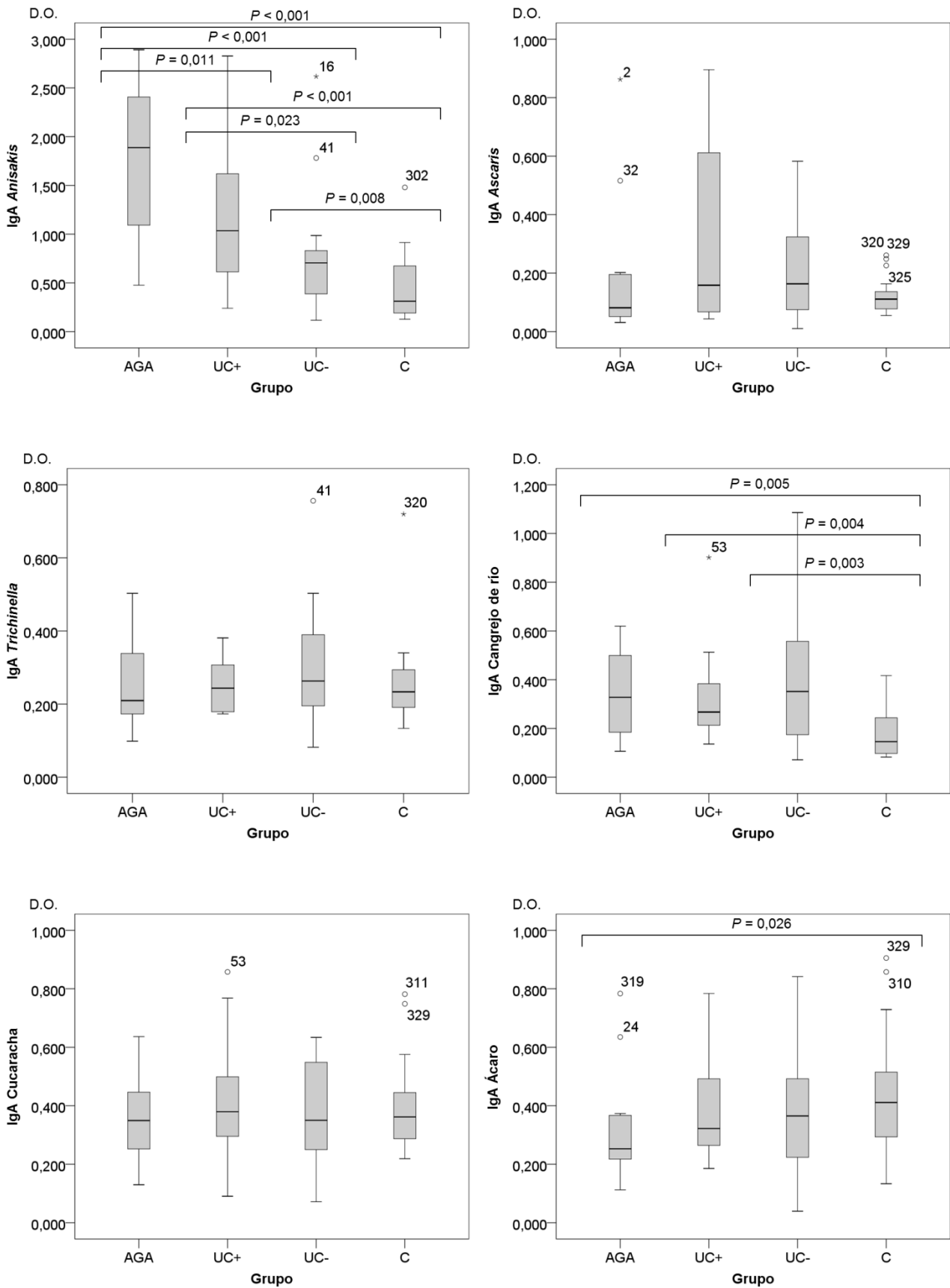


Figura 107. Medianas y rangos intercuartiles de la IgA frente a los extractos de *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Procambarus clarkii*, *Blatella germanica* y *Dermatophagoides pteronyssinus*. AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=14). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=18). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=23). C: Controles (N=19). En *Anisakis*: AGA (N=18), UC+ (N=24), UC- (N=25) y C (N=18).

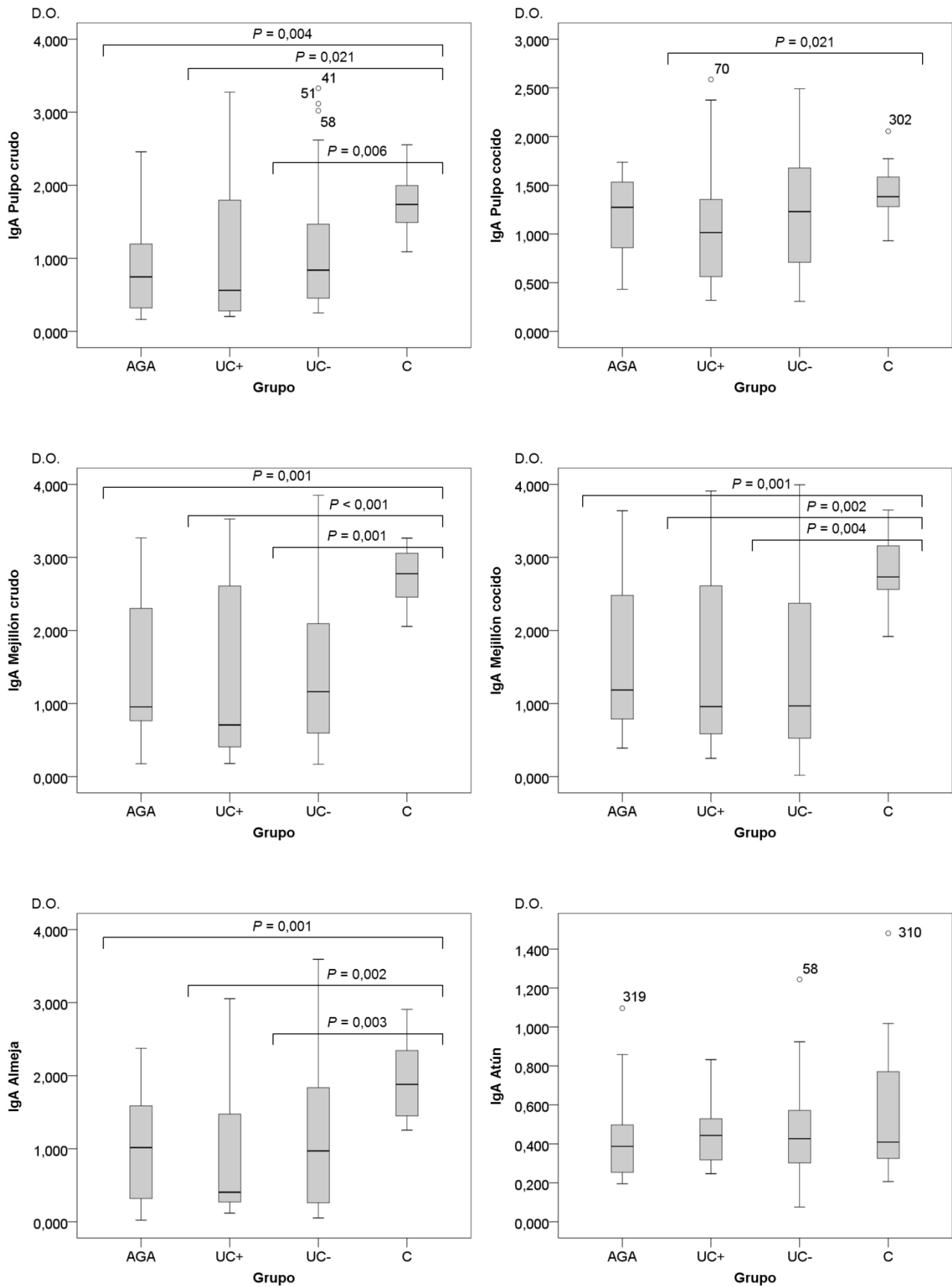


Figura 108. Medianas y rangos intercuartiles de la IgA frente a los extractos de *Octopus vulgaris* crudo y cocido, *Mytilus edulis* crudo y cocido, *Ruditapes philippinarum* y *Thunnus thynnus*. AGA: Anisakiosis gastroalérgica (N=14). UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (N=18). UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (N=23). C: Controles (N=19).

4.7.3. Estudio de la tropomiosina en las reacciones cruzadas entre *Anisakis* y langostino

Debido a la aparente reactividad cruzada observada entre *Anisakis* y crustáceos, sumado a la importancia de la tropomiosina en los pacientes alérgicos al marisco, quisimos estudiar en detalle la reacción cruzada entre las tropomiosinas de *A. simplex* (Ani s 3) y *Pandalus borealis* (Pan b 1) (camarón nórdico) y entre los extractos totales de *A. simplex* y *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco). Dada la elevadísima identidad (97%) entre Lit v 1 y Pan b 1 fue posible utilizar la tropomiosina Pan b 1 recombinante, de la que se disponía en ese momento, en lugar de Lit v 1. Para este estudio se emplearon 90 sueros: AGA (N=21), UC+ (N=25), UC- (N=26) y C (N=18) junto con 12 sueros de pacientes sensibilizados a crustáceos. En primer lugar se determinaron, mediante ELISA indirecto, los niveles de IgE, IgG4 e IgA frente a los extractos y las tropomiosinas recombinantes de *Anisakis* y langostino empleando los primeros 90 sueros. Asimismo, se determinaron los niveles de IgE frente al extracto de *Anisakis* y langostino y frente a la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) recombinante empleando los 12 sueros de pacientes sensibilizados a crustáceos. En segundo lugar se determinaron, los perfiles de inmunorreconocimiento de la IgE frente a los extractos de *Anisakis* y langostino; y frente a la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) recombinante empleando los seis sueros AGA y UC+ con niveles de IgE más elevados frente al extracto de *Anisakis* y los seis sueros de los pacientes sensibilizados a crustáceos con los niveles de IgE más elevados frente al extracto de langostino.

4.7.3.1. Niveles de IgE, IgG4 e IgA frente a langostino en pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis*

Para determinar la positividad de los sueros por ELISA indirecto, se empleó el mismo criterio que se había empleado para la IgE frente a *Anisakis* (M+3SD) (Tabla 29).

Tabla 29. Porcentajes de reconocimiento de la IgE, IgG4 e IgA del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con *Anisakis* frente a las tropomiosinas recombinantes de *Anisakis* (Ani s 3) y camarón nórdico (Pan b 1) y frente a los extractos totales de *Anisakis* y langostino blanco mediante ELISA indirecto.

		AGA	N	UC+	N	UC-	N	C	N	M+3SD (D.O.)
IgE	Ani s 3	11,76	17	18,18	22	12,00	25	0,00	18	0,087
	Pan b 1	11,76	17	22,73	22	12,00	25	0,00	18	0,087
IgG4	Ani s 3	4,76	21	4,35	24	3,85	26	0,00	18	0,235
	Pan b 1	0,00	21	0,00	24	0,00	26	0,00	18	0,241
IgA	Ani s 3	17,65	17	14,29	22	0,00	26	5,56	18	0,230
	Pan b 1	29,41	17	13,64	23	23,08	26	0,00	18	0,152
IgE	AS	95,00	20	66,67	25	8,33	24	5,56	18	0,126
	LV	0,00	19	8,33	25	0,00	26	0,00	18	0,035
IgG4	AS	80,95	21	34,78	24	3,85	26	0,00	18	0,057
	LV	0,00	18	9,09	23	3,85	26	0,00	17	0,072
IgA	AS	55,56	18	26,09	24	8,33	24	0,00	17	1,526
	LV	0,00	21	0,00	25	0,00	26	5,56	18	1,791

N: Número de pacientes. AS: Extracto total de *Anisakis simplex*. LV: Extracto total de *Litopenaeus vannamei*. AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. M+3SD indica la absorbancia umbral de positividad.

Como se puede calcular a partir de los porcentajes de la Tabla 29, seis (15,40%) de 39 pacientes sensibilizados a *Anisakis* (AGA y UC+) presentaron niveles positivos de IgE frente a Ani s 3, lo que

confirma que la tropomiosina no es un alérgeno principal de *Anisakis*. Además Ani s 3 presentó bajos niveles de positividad para la IgG4 de los pacientes AGA y UC+ (4,76% y 4,35%, respectivamente), similar al 3,85% de positivos en el caso de UC- y para la IgA de los pacientes AGA y UC+ (17,65% y 14,29%, respectivamente) aunque en este caso ningún paciente UC- resultó positivo.

Frente a Pan b 1 hubo un paciente positivo más del grupo UC+, lo que incrementó el porcentaje de positivos en este grupo para IgE hasta el 22,73%, comparado con el 11,76% de AGA y el 12% de UC-. Esta tropomiosina no presentó niveles positivos de IgG4 pero sí de IgA, habiendo casi el doble de positivos que frente a Ani s 3 en el grupo de AGA (29,41% vs 17,65%, respectivamente), un porcentaje similar a Ani s 3 en el grupo UC+ (13,64% vs 14,29%, respectivamente) y un 23,08% de positivos en el grupo UC- (Tabla 29).

Los positivos para el extracto de *Anisakis* fueron analizados previamente (apartado [4.7.2.1.](#)) mostrando ligeras modificaciones por las variaciones en el número de sueros empleados en este estudio. Finalmente los positivos al extracto de langostino fueron escasos, encontrándose únicamente en los grupos UC+ (8,33% IgE y 9,09% IgG4), UC- (3,85% IgG4) y C (5,56% IgA) (Tabla 29).

Al estudiar las reacciones cruzadas mediante ELISA indirecto entre los extractos totales de *Anisakis* y langostino, observamos que de los 38 sueros positivos para IgE frente al extracto de *Anisakis* solo dos (5%) reconocieron el extracto de langostino. Cuando nos centramos en el análisis de sus tropomiosinas, de 38 positivos a *Anisakis* solo cinco (13%) lo fueron frente a Ani s 3 y ocho (21%) frente a Pan b 1. Los dos sueros positivos al extracto de langostino también lo fueron frente a Ani s 3 y Pan b 1. En total, de 16 sueros positivos frente a alguna de las dos tropomiosinas recombinantes estudiadas (Ani s 3 y Pan b 1), tres sueros resultaron positivos a ambas tropomiosinas y 13 mostraron especificidad en su reconocimiento, lo que confirma que no hay una fuerte reactividad cruzada entre ambas tropomiosinas.

Los niveles de IgE, IgG4 e IgA de estos pacientes frente a las tropomiosinas recombinantes y los extractos de *Anisakis* y langostino fueron analizados por grupos (Figuras 109 y 110).

La IgE anti-tropomiosina de los pacientes 33 y 36 presentó una mayor intensidad de reconocimiento frente a Ani s 3 que frente a Pan b 1. Los controles (C) presentaron niveles más bajos de IgE frente a Pan b 1 que los pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-). Con respecto a la IgG4, se observó que los niveles de IgG4 anti-tropomiosina (Ani s 3 y Pan b 1) fueron más elevados en los sueros del grupo control que en el resto de grupos. Todo lo contrario sucedió al observar los niveles de IgA anti-tropomiosina, que fueron significativamente más bajos en el grupo control.

En relación a los extractos totales, los niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas analizados frente al extracto de *Anisakis* han presentado un perfil similar de reconocimiento entre los grupos estudiados (AGA>UC+>UC->C). Frente al extracto de langostino cabe destacar que los niveles de reconocimiento de IgE e IgG4 fueron mucho más bajos para todos los pacientes en comparación con el extracto de *Anisakis* sin detectarse diferencias entre los grupos y para la IgA se observaron niveles más elevados de IgA en el grupo control que en los grupos de pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-).

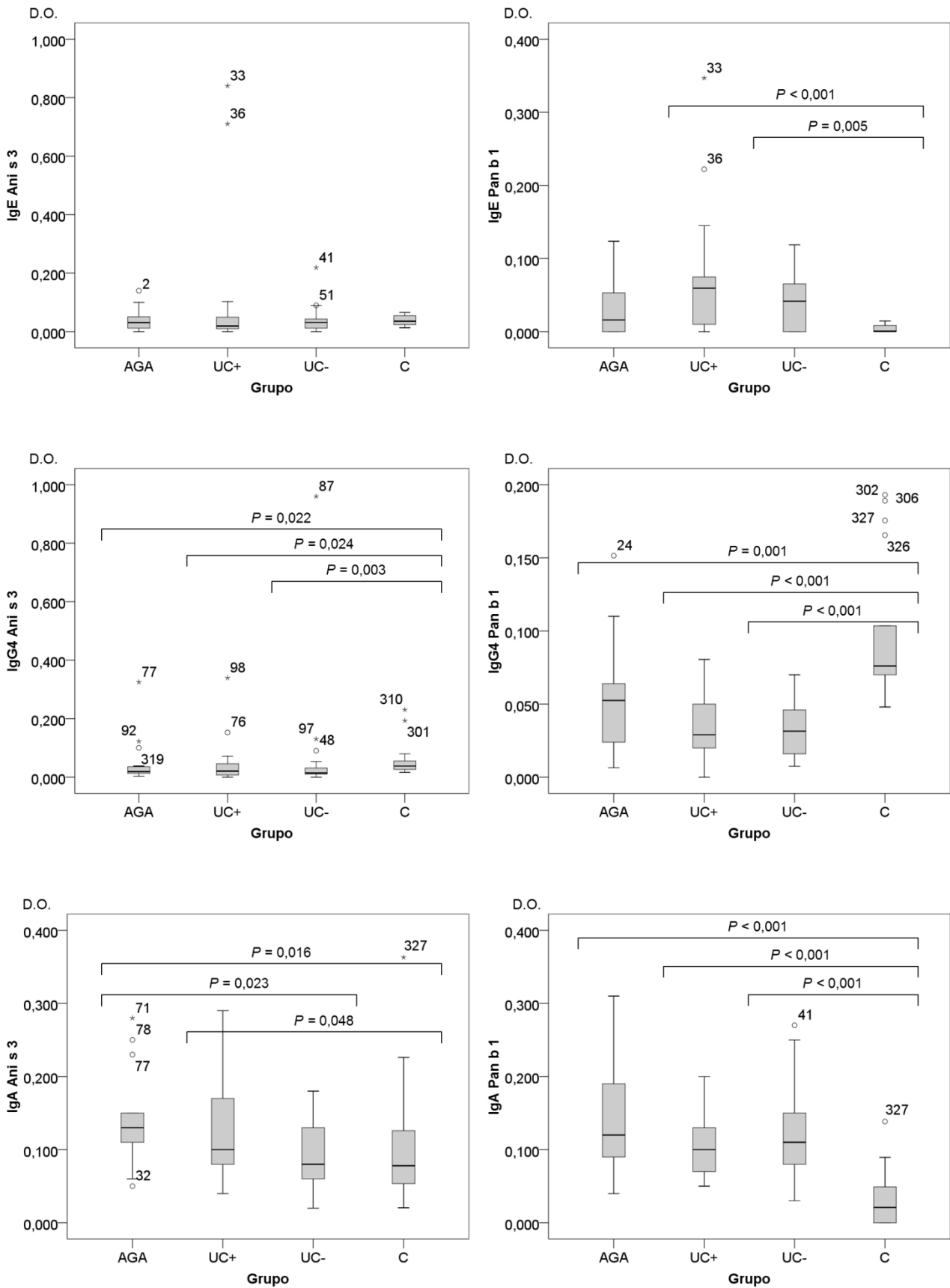


Figura 109. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE, IgG4 e IgA frente a las tropomiosinas recombinantes de *Anisakis* (Ani s 3) y camarón nórdico (Pan b 1). AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. Ver número de pacientes (N) en la Tabla 29.

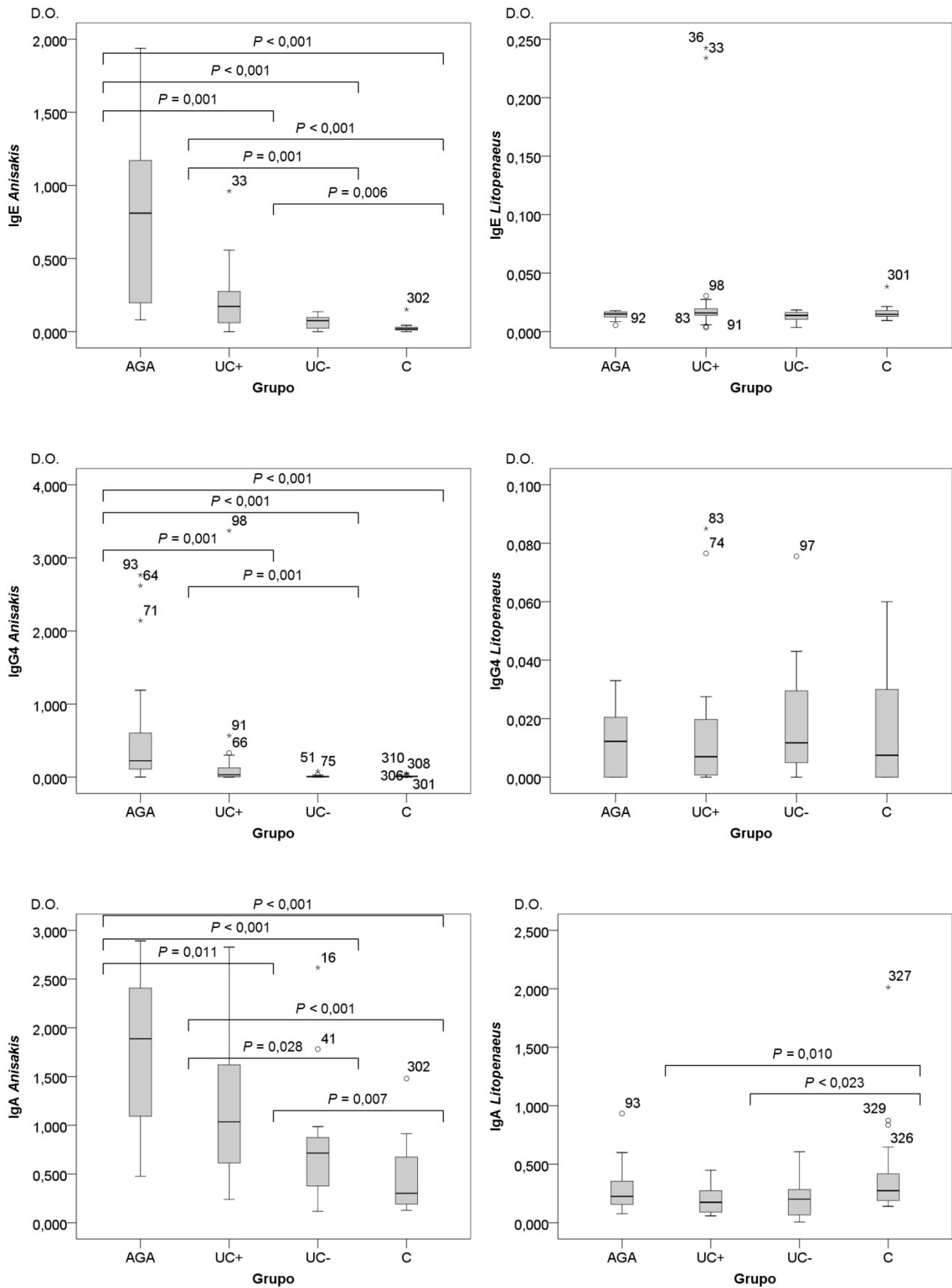


Figura 110. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE, IgG4 e IgA frente a los extractos proteicos totales de *Anisakis simplex* y langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*). AGA: Anisakiosis gastroalérgica. UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*. C: Controles. Ver número de pacientes (N) en la Tabla 29.

Por otro lado, de los 12 pacientes sensibilizados a crustáceos (Tabla 13), seis (50%) resultaron positivos para IgE frente al extracto de langostino y, de éstos, cuatro (33%) frente a Ani s 3, mediante ELISA indirecto. Solo un paciente resultó positivo al extracto de *Anisakis*. Los cuatro pacientes positivos frente a Ani s 3 (G1, G2, G4 y G9) presentaron síndrome de alergia oral (SAO) o anafilaxia tras la ingesta de crustáceos (Tabla 13). Cabe destacar que el paciente G2 es el paciente alérgico a pescado y marisco analizado previamente (ver apartado [4.4.1.](#)).

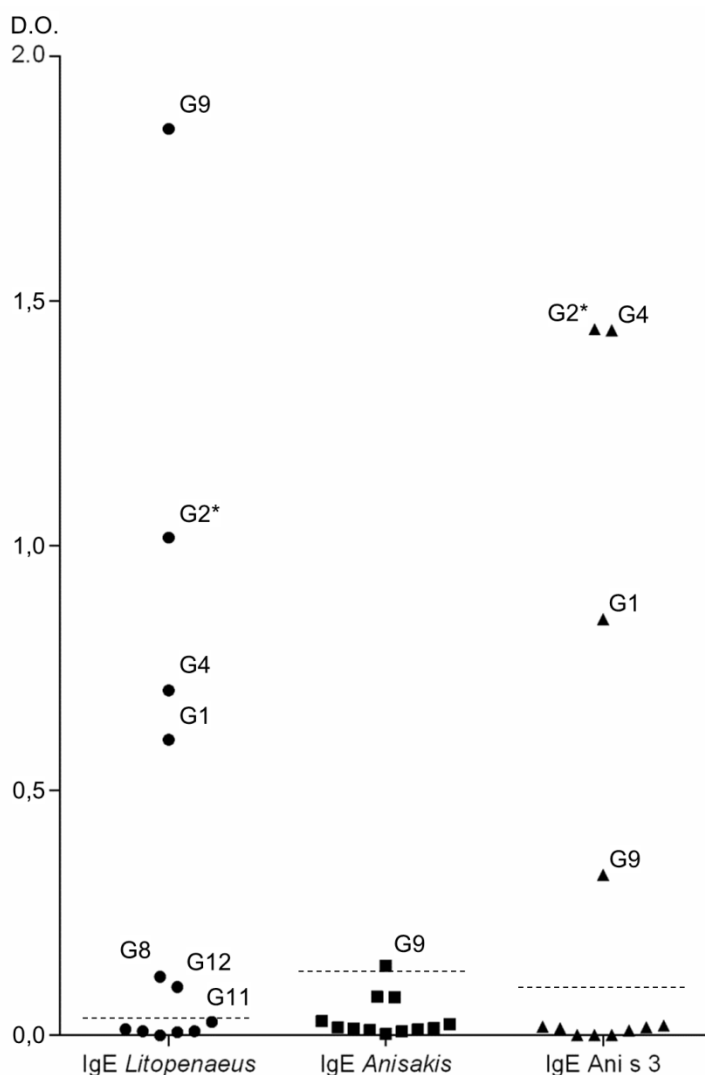


Figura 111. Niveles de IgE frente a los extractos proteicos totales de langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) y *Anisakis simplex* y frente a la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) recombinante, en pacientes sensibilizados a crustáceos (G1-G12), medidos mediante ELISA indirecto. Las líneas discontinuas marcan la absorbancia umbral de positividad (M+3SD) para la IgE frente a *Litopenaeus* (0,035), *Anisakis* (0,123) y Ani s 3 (0,087).

En resumen, de los 38 pacientes positivos a *Anisakis* (IgE mediante ELISA indirecto), solo dos (5%) fueron positivos frente al extracto de langostino y, de los seis pacientes positivos al extracto de langostino (IgE mediante ELISA indirecto), solo uno (17%) fue positivo frente a *Anisakis*, lo que demuestra una baja reactividad cruzada entre ambos preparados antigénicos. Con respecto a la reacción cruzada entre las tropomiosinas Ani s 3 y Pan b 1, tres pacientes (19%) (dos UC+ y un UC-), de los 16 positivos frente a alguna de las tropomiosinas reconocieron las dos tropomiosinas indistintamente, por

lo que la reacción cruzada entre las tropomiosinas parece ser mayor que entre los extractos. Por otro lado, de los cuatro pacientes positivos a Ani s 3 (G1, G2, G4 y G9) sensibilizados a crustáceos, el paciente G2 analizado previamente (ver apartado 4.4.1.) reconoció la tropomiosina recombinante Pan b 1 y la banda de 37 kDa correspondiente con la tropomiosina en el extracto de langostino. Para determinar si los pacientes G1, G4 y G9, también reconocían esta banda del extracto fue necesario realizar una inmunotransferencia de IgE frente al extracto de langostino ya que no disponíamos de cantidad suficiente de Pan b 1 recombinante (ver apartado 4.7.3.3.).

4.7.3.2. Inmunización de ratones con la tropomiosina recombinante de *Anisakis* (rAni s 3)

La tropomiosina recombinante de *Anisakis* rAni s 3 resultó ser inmunogénica. La IgG1 específica inducida en los ratones reconoció rAni s 3, aunque presentó niveles muy bajos frente al extracto total de *Anisakis* mediante ELISA indirecto (Figura 112).

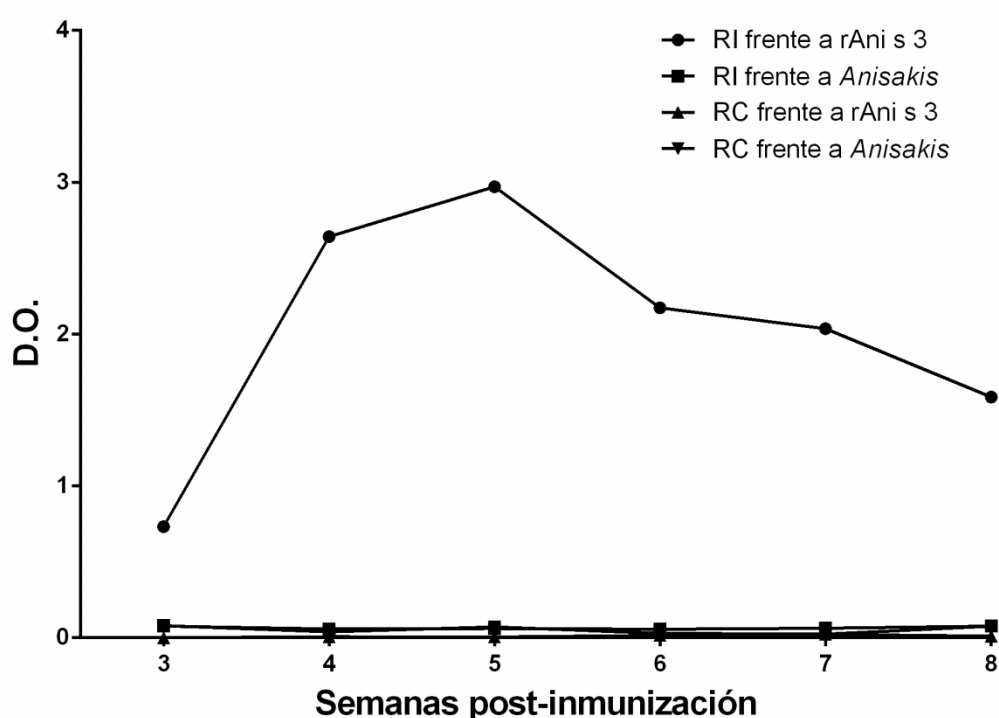


Figura 112. Niveles de IgG1 inducidos por la tropomiosina recombinante de *Anisakis* (rAni s 3). Se inmunizaron ratones BALB/c (N=2) con la tropomiosina recombinante purificada (rAni s 3). Las muestras de suero fueron obtenidas semanalmente y los ELISA indirectos se realizaron frente a rAni s 3 o frente al extracto total de *Anisakis*. Se muestran los valores medios de D.O. a 490 nm. RI: Ratón inmunizado. RC: Ratón control.

Además comprobamos la existencia de reactividad cruzada de la IgG1 de los ratones inmunizados con rAni s 3 con extractos de otros parásitos, mariscos, carnes y pescados (Figura 113). Considerando que el monómero de tropomiosina se encuentra alrededor de 37 kDa, se detectó reconocimiento de la tropomiosina en los extractos de *Ascaris*, nécora, langostino, almeja, salmón, rape y pollo. Curiosamente, frente al extracto de *Anisakis* se reconoció una banda de aproximadamente 20 kDa.

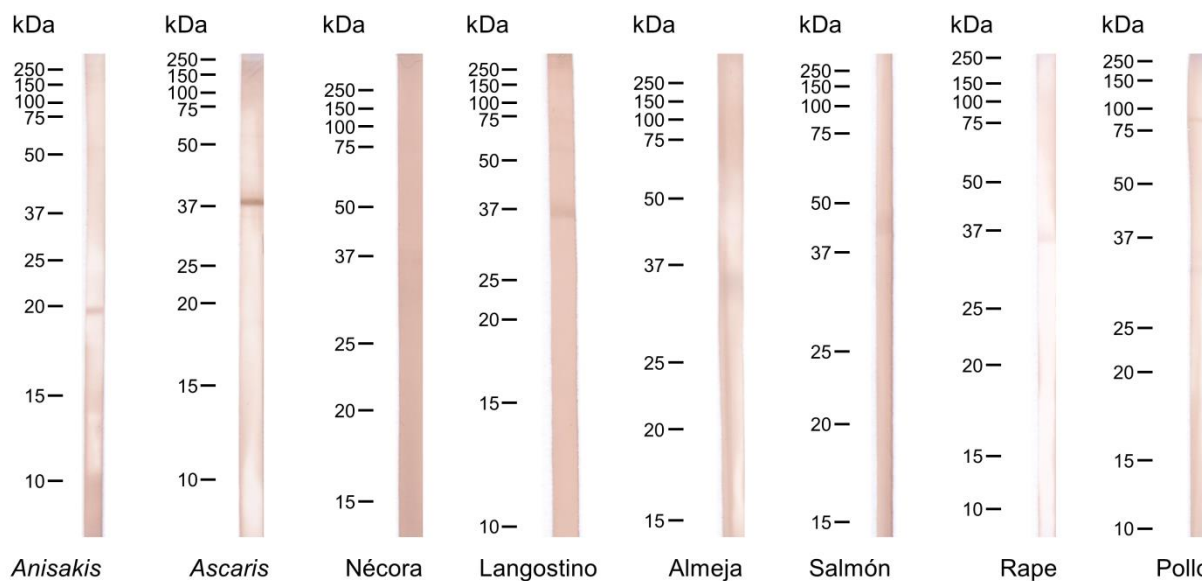


Figura 113. Patrones de inmunorreconocimiento de IgG1 de ratón inmunizado con tropomiosina recombinante de *Anisakis*. Las inmunotransferencias han sido realizadas frente a los extractos de *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Necora puber*, *Litopenaeus vannamei*, *Ruditapes philippinarum*, *Salmo salar*, *Lophius piscatorius* y *Gallus gallus* en condiciones no reductoras.

4.7.3.3. Determinación de los perfiles de inmunorreconocimiento de IgE frente a la tropomiosina recombinante de *Anisakis* (rAni s 3) y frente a los extractos de *Anisakis* y langostino

En primer lugar, realizamos una SDS-PAGE con rAni s 3, y la transferimos para ser incubada con sueros de 43 pacientes diagnosticados de sensibilización por *Anisakis* (20 AGA y 23 UC+) (Figura 114). En este experimento comprobamos que los pacientes 33 y 36, ambos pertenecientes al grupo UC+, presentaron la banda de 37 kDa correspondiente con el monómero de la tropomiosina de *Anisakis*. En el paciente 2 (grupo AGA), que también presentó niveles positivos de IgE frente a rAni s 3 mediante ELISA indirecto, también se observó una tenue banda a 37 kDa. La tropomiosina de *Anisakis* recombinante (banda a 37 kDa) también fue reconocida por la IgG1 de los ratones inmunizados con el extracto total de *Anisakis* (AniM), lo que confirma que en el extracto hay tropomiosina nativa que induce la producción de anticuerpos anti-tropomiosina. Asimismo se observaron cuatro bandas en torno a 20 y 30 kDa reconocidas por la IgG1 de ratón inmunizado con rAni s 3 (Figura 114).

Para analizar la reacción cruzada mediante inmunotransferencia escogimos, de entre los pacientes sensibilizados a *Anisakis*, los seis sueros de pacientes del grupo de AGA y los seis sueros de pacientes del grupo UC+ con los niveles de IgE más elevados frente al extracto de *Anisakis* medidos por ELISA indirecto. Asimismo, de los 12 pacientes sensibilizados a crustáceos, seleccionamos los seis sueros con niveles de IgE más elevados frente al extracto de langostino medidos por ELISA indirecto. De estos seis sueros descartamos el G2, por ya haber sido analizado previamente (ver apartado 4.4.1.) y en su lugar incorporamos el suero G11 por ser el siguiente con mayores niveles de IgE frente a langostino.

Estos 18 sueros seleccionados fueron incubados con tiras de nitrocelulosa que contenían los extractos de *Anisakis* y langostino y, de este modo, poder confirmar la reactividad cruzada entre sus tropomiosinas (Figura 115).

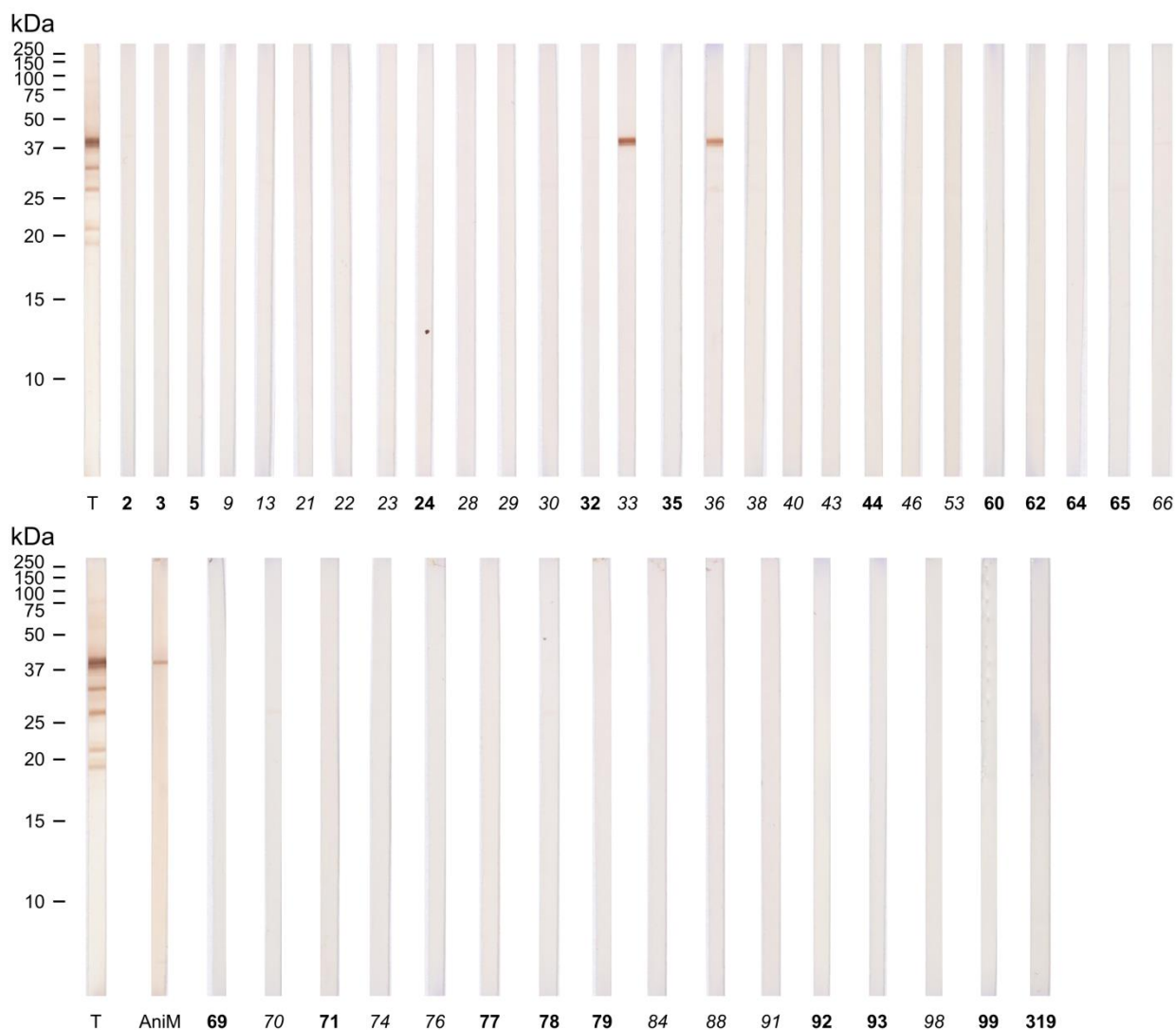


Figura 114. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de los pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (cursiva) frente a la tropomiosina recombinante de *Anisakis* (rAni s 3). T: IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 3. AniM: IgG1 sérica de ratón inmunizado con extracto total de *Anisakis*.

En la Figura 115 se puede observar como de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* seleccionados (seis AGA y seis UC+), solo el paciente 33 del grupo UC+ presentó reacción cruzada con la tropomiosina del extracto de langostino. Por el contrario, de los seis pacientes seleccionados sensibilizados a crustáceos, la banda correspondiente con la tropomiosina del extracto de *Anisakis* (reconocida por el suero del ratón sensibilizado con rAni s 3 a 20 kDa) fue reconocida por dos pacientes sensibilizados a crustáceos. Además, se confirmó que los sueros de los pacientes G1, G4 y G9 también presentaban IgE anti-tropomiosina de langostino, ya que reconocieron la banda de 37 kDa del extracto. Por consiguiente, los pacientes G1, G2, G4 y G9 reconocieron tanto la tropomiosina de *Anisakis* como la de langostino, indistintamente. Lo que permite concluir que, agrupando a los 20 pacientes positivos frente a alguna de las tropomiosinas, siete (35%) fueron positivos frente a ambas, indistintamente. Los pacientes G1, G8 y G12 también reconocieron una proteína de unos 50 kDa de *Anisakis* y los pacientes G4 y G9 también reconocieron proteínas de más de 250 kDa en el extracto de *Anisakis* (Figura 115).

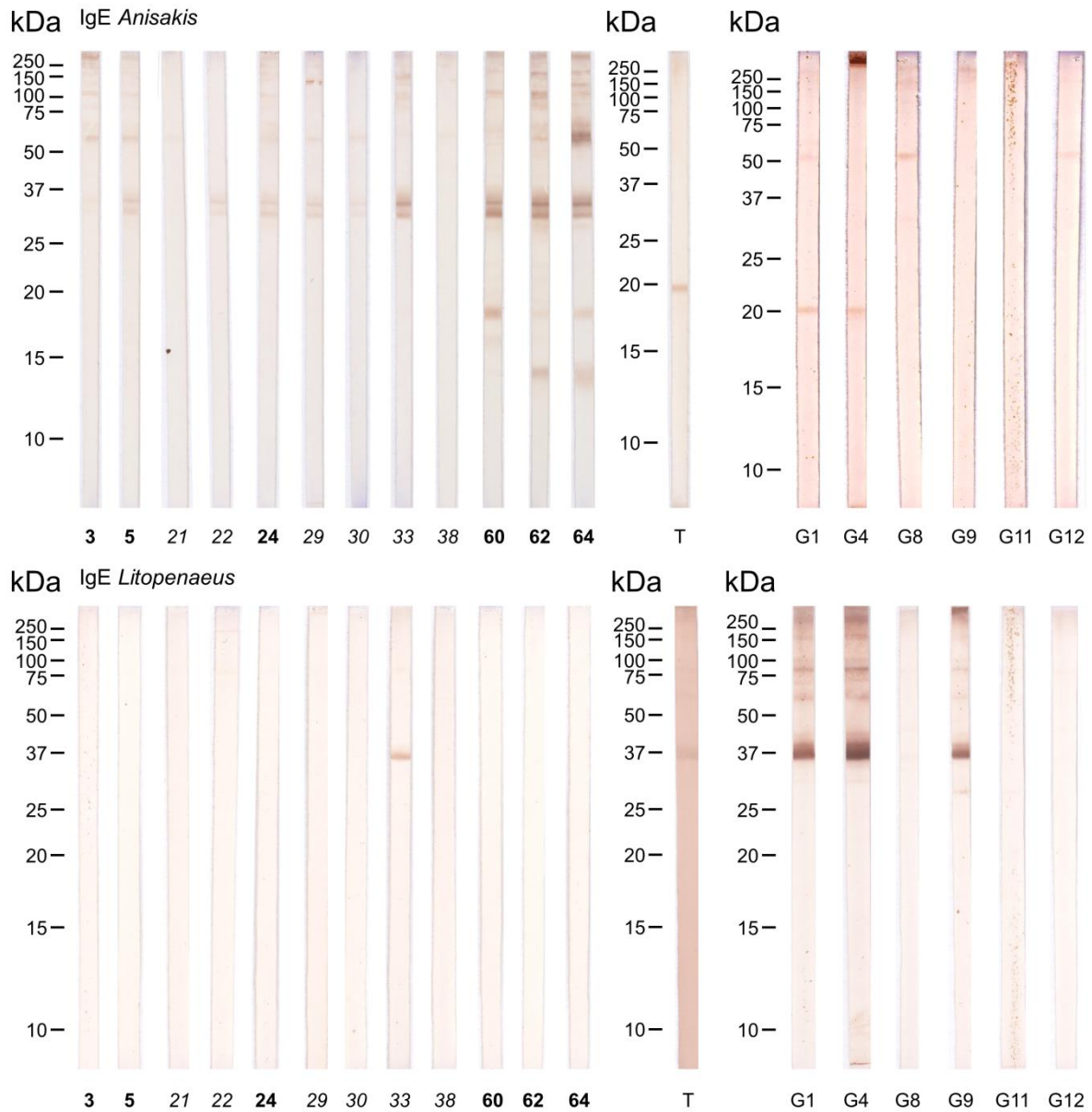


Figura 115. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de pacientes con anisakiosis gastroalérgica (**negrita**), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (*cursiva*) y sensibilizados a crustáceos (**G**) frente a los extractos de langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) y larvas de *Anisakis*. T: IgG1 sérica de ratón inmunizado con la tropomiosina recombinante de *Anisakis*.

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis *in silico* de la alergenicidad de la tropomiosina de *Anisakis simplex*

Las herramientas bioinformáticas son esenciales para manipular, entender e interpretar la gran cantidad de información disponible en las bases de datos. Como se ha evidenciado en el correspondiente capítulo de resultados, éstas han constituido un excelente recurso para la investigación sobre alérgenos específicos como la tropomiosina. En la primera parte del capítulo, mediante el empleo de secuencias aminoacídicas y no nucleotídicas para obtener árboles filogenéticos, se comparó la similitud de secuencia de 17 tropomiosinas buscando con ello una nueva aplicación de esos árboles. Por ejemplo, un árbol NJ no refleja relaciones evolutivas, es más bien una representación del grado de similitud entre las secuencias alineadas con las que se construye (Peña, 2011). Las tropomiosinas tienen una estructura secundaria extremadamente sencilla y muy parecida entre ellas, por lo que la comparación de sus secuencias podría ser útil para la prevención de la alergia y la identificación temprana de posibles reacciones cruzadas.

Según la FAO (FAO/WHO, 2001, 2009), si una proteína presenta una identidad $\geq 35\%$ en un segmento de 80 aminoácidos, o comparte al menos seis aminoácidos consecutivos en su secuencia aminoacídica con la de otra proteína, que sea un alérgeno alimentario, debería ser considerada potencialmente alérgica por una posible reactividad cruzada, pudiendo producir síntomas tras su ingestión. Para investigar la reactividad cruzada entre los alérgenos procedentes de los distintos alimentos que se ingieren, no se debe considerar únicamente el estudio taxonómico de los organismos sino también la estructura molecular de sus alérgenos (García y Lizaso, 2011).

En pacientes alérgicos sensibilizados a varias especies de pescado, se ha afirmado que cualquier pescado podría producir síntomas clínicos tras su ingestión y, por consiguiente, todo pescado debería ser evitado (García y Lizaso, 2011). Esta situación es, por ejemplo, causada por las parvalbúminas, cuyos patrones de unión a IgE están conservados siempre que se trate de especies de peces filogenéticamente relacionadas (van Do *et al.*, 2005). En el caso del marisco, la tropomiosina es el alérgeno principal y además está implicada en las reacciones cruzadas ya que la identidad entre las diferentes tropomiosinas es muy alta, por lo que se recomienda que estos pacientes eviten cualquier contacto con marisco hasta que no aparezca tolerancia (Tsabouri *et al.*, 2012). Se ha propuesto incluso que la tropomiosina de diferentes fuentes podría desencadenar reacciones anafilácticas en pacientes previamente sensibilizados ya que se detectó sensibilización al marisco mediante pruebas cutáneas en judíos ortodoxos que nunca comieron marisco, probablemente causadas por una sensibilización previa a la tropomiosina de los ácaros del polvo (Fernandes *et al.*, 2003).

Los expertos de la FAO afirmaron que la similitud estructural de las proteínas puede inducir reacciones cruzadas con otras proteínas alérgicas aunque la similitud de secuencia no sea muy elevada (FAO/WHO, 2001). Además se ha demostrado el importante papel que juega la superficie en la alergenicidad de una proteína. La proteína T1 de la familia de proteínas similares al alérgeno Bet v 1, podría ser no alérgica por la falta de unos aminoácidos que sí están presentes en Bet v 1 y están relacionados con su dimerización. Como consecuencia, esta proteína T1 monomérica no podría

producir el entrecruzamiento de los receptores de los mastocitos sensibilizados frente a Bet v 1 (Ghosh y Gupta-Bhattacharya, 2008).

Fue muy interesante el hecho de haber obtenido unos valores aceptables de Bootstrap ($\geq 95\%$) y una topología similar a la obtenida en estudios taxonómicos previos empleando secuencias nucleotídicas (Blair, 2009). Este no fue el caso para las tropomiosinas de los vertebrados *G. gallus* y *T. thynnus* ya que deberían encontrarse más distanciados de los mamíferos y más cerca de las tropomiosinas de invertebrados (Fitch y Margoliash, 1967) y es este el motivo por el que nuestros árboles no presentaron una topología correcta. Sin embargo, el árbol correcto sería perfectamente consistente con nuestros datos de porcentaje de plegamiento en hélice alfa (Figura 20). De hecho, las tropomiosinas de *G. gallus* y *T. thynnus* son potencialmente las más alergénicas dentro de las moléculas de vertebrados analizadas. La descripción de la reactividad cruzada entre las parvalbúminas del pollo y del atún (González-de-Olano *et al.*, 2012) junto con los escasos casos de alergias a proteínas musculares de la carne (actina, miosina y tropomiosina) (Restani *et al.*, 2009) apoyan esta hipótesis.

Las tropomiosinas de los parásitos *A. simplex*, *A. suum* y *T. spiralis*, mostraron mayores porcentajes de hélice alfa que los obtenidos en las de otros invertebrados. Este hecho podría ser entendido como un mecanismo de adaptación al hospedador ya que cuando nosotros estudiamos los porcentajes de hélice alfa de las tropomiosinas de esos parásitos, resultó más difícil distinguirlas de las de los vertebrados.

Con respecto a la estructura secundaria aperiódica aleatoria localizada en la región 50-60 de las tropomiosinas de los moluscos *O. vulgaris*, *M. edulis* y *R. philippinarum*, ésta no fue considerada importante ya que también aparecía en las de vertebrados aunque en menor medida.

La tropomiosina experimenta múltiples transiciones térmicas siendo en la primera de éstas en la que se separan las hélices que conforman la superhélice por la región central de la molécula, entre los residuos 130-190 (Greenfield y Hitchcock-DeGregori, 1995). Es posible que, en las tropomiosinas de invertebrados, esta región pueda ser desplegada más fácilmente que en las de los vertebrados. Además, la ruptura enzimática con tripsina sucede rápidamente en la arginina de la posición 133 de la tropomiosina nativa del pollo (Sumida *et al.*, 2008). Esta posición está dentro de la región 133-135 de baja probabilidad de plegamiento en hélice alfa descrita en este trabajo como candidata a ser responsable de la alergenicidad de la tropomiosina de invertebrados.

Las posiciones 127 y 144 podrían estar rompiendo la hélice alfa en el primer valle de baja probabilidad (posiciones 133-135) observado en la Figura 21. Del mismo modo, la posición 201 también podría distorsionar el plegamiento en hélice alfa observado en el segundo valle: posiciones 201-206.

Cabe destacar que, en la tropomiosina del atún (vertebrado), el valle 133-135 es el mismo que el de las tropomiosinas de invertebrados y, en la región 189-198, predominó la estructura secundaria aperiódica aleatoria. Por lo tanto, creemos que el segundo valle estaría desplazado hacia el extremo N-terminal en *T. thynnus*. Esta similitud con las tropomiosinas de invertebrados debería ser investigada con detalle para intentar poder explicar el primer caso de una tropomiosina alergénica de vertebrados (Ore m 4) de la tilapia mozambiqueña (Liu *et al.*, 2013).

El diagnóstico inmunológico de las enfermedades alérgicas asociadas a *A. simplex* se ve a menudo afectado por la aparición de reacciones cruzadas que disminuyen su especificidad. Esto es debido a la existencia de panalergenos presentes en numerosos invertebrados que se adquieren a través de los alimentos o mediante inhalación. Dentro de estos panalergenos destaca la tropomiosina que, como se ha mencionado anteriormente, es considerada el alérgeno principal de los crustáceos y ha sido identificada como uno de los alérgenos presentes en las larvas de *A. simplex* bajo la denominación de Ani s 3. Actualmente, las nuevas herramientas bioinformáticas existentes nos permiten la predicción de epitopos sobre estructuras tridimensionales modeladas por homología y la predicción de posibles puntos de corte enzimáticos y de modificaciones postraduccionales que intervengan en la propensión de las moléculas a inducir una respuesta alérgica.

En la segunda parte de este capítulo se han buscado herramientas bioinformáticas para intentar predecir las reacciones cruzadas causadas por este panalérgeno mediante la identificación de epitopos B conformacionales en 26 tropomiosinas. Así mismo, se ha estudiado la fragmentación enzimática digestiva *in silico* y su afectación por posibles modificaciones postraduccionales tanto en el alérgeno Ani s 3 como en otras tropomiosinas que pueden ser ingeridas por vía oral.

De la amplia variedad de métodos de modelado de proteínas disponible, se escogió HHPred (Söding *et al.*, 2005) por su rapidez y fácil utilización, ya que dispone de un acceso sin registro y posibilidad de automatización en el modelado. La principal ventaja que comparte con Phyre2.0 (Kelly *et al.*, 2015) es el modelado de la secuencia completa introducida aunque las proteínas “plantilla” no estén disponibles para un fragmento determinado de la secuencia. En nuestro caso existen bastantes fragmentos de tropomiosinas en la base de datos PDB aunque solo se encuentran completas las tropomiosinas del cerdo (*S. scrofa*) y del conejo (*O. cuniculus*).

De todos los métodos para estimar la calidad de los modelos, empleamos QMEAN por su rapidez y no necesidad de registro web, como ya se ha indicado anteriormente. El QMEAN-Score medio para las 26 tropomiosinas analizadas fue de 0,686 con una desviación estándar de 0,02. Este valor indica que nuestros modelos son válidos, ya que el valor máximo sería 1. Al comparar la calidad de las estructuras modeladas (Modelos UCM) mediante QMEAN con los modelos existentes en la base de datos de alérgenos SDAP (Modelos SDAP) observamos que, estos últimos, no superaron en ningún caso a la de nuestros modelos nuevos lo que confirma la utilidad del modelado HHPred para el estudio de estas proteínas.

La estimación de la calidad de un modelo es un componente esencial en toda predicción bioinformática ya que, en última instancia, es la exactitud del modelo lo que determina su utilidad en aplicaciones específicas. La calidad absoluta, que es independiente del tamaño de la proteína, se compara relacionando los rasgos estructurales del modelo con estructuras similares de alta resolución resueltas experimentalmente por cristalografía de rayos X mayoritariamente, siendo el valor final un reflejo del grado de naturalidad del modelo (Benkert *et al.*, 2011). La obtención de valores de QMEAN-Score tan parecidos entre todos los modelos era de esperar teniendo en cuenta la similitud de las estructuras predichas y, de ahí, que el valor de desviación estándar sea bajo.

Para la predicción de epitopos se obtuvo el *Discotope Score* para los aminoácidos de las tropomiosinas analizadas. Se calcularon los valores medios en las tropomiosinas de vertebrados, parásitos e invertebrados no parásitos y se compararon con el nivel umbral de predicción (*Discotope Score*=-3,7) y con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1 (tropomiosina alergénica del langostino blanco *Litopenaeus vannamei*). Los resultados confirmaron que las diferencias en tropomiosinas de vertebrados se concentran en el último tercio de la molécula mientras que, en las de los invertebrados, es el primer tercio de la tropomiosina el que presenta mayor variabilidad interespecífica.

Mediante la comparativa con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1, el perfil de *Discotope Score* generado con nuestras tropomiosinas coincide fielmente con el porcentaje experimental descrito previamente (Ayuso *et al.*, 2010) empleando fragmentos lineales, lo que es bastante lógico debido a que la tropomiosina presenta una estructura secundaria muy sencilla en hélice alfa. Las únicas discrepancias se obtuvieron a partir de la posición 200 hacia el extremo C-terminal.

Sorprendentemente, en la región central de las tropomiosinas, el *Discotope Score* más elevado es el de las tropomiosinas no alergénicas de vertebrados. Este hecho podría deberse a que, aunque en todos los casos esa región supera el umbral de -3,7 y es predicha como un epitopo, el programa está diseñado para la predicción de epitopos B. Sería necesario investigar si en estas moléculas procedentes de vertebrados no existen epitopos T capaces de desencadenar una respuesta Th2 necesaria para inducir la producción de IgE específica. Otros motivos causantes podrían ser las diferencias en modificaciones postraduccionales (glicosilaciones), o conformaciones flexibles (se introducen estructuras rígidas), que no son consideradas por Discotope 2.0 para la predicción de los epitopos (Kringelum *et al.*, 2012).

Estos valores tan elevados de *Discotope Score* en el epitopo central parecen confirmar que sean los aminoácidos de las posiciones 127 y 144 los responsables de la no existencia del plegado en hélice alfa de la región 133-135 en invertebrados, región anteriormente descrita como candidata a ser responsable de la alergenicidad de las tropomiosinas de invertebrados.

El empleo de modelos basados en estructuras obtenidas por difracción de rayos X no se aproxima enteramente a la realidad. Las técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) en solución son las más adecuadas, pero muy pocos grupos de investigación elucidan moléculas en solución de 30-40 kDa como es el caso de la tropomiosina (Xu *et al.*, 2006). Además, ambas son técnicas caras y requieren gran cantidad de tiempo (Sun *et al.*, 2013).

Cuando se analizaron los valores de *Discotope Score* en las tropomiosinas estudiadas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados (vertebrados, parásitos e invertebrados no parásitos), resaltando el hecho de la existencia de estas diferencias entre los dos grupos de invertebrados, parásitos y no parásitos, siendo el de estos últimos más cercano al de los vertebrados. En cualquier caso, el hecho de que el grupo de los parásitos analizados tenga *Discotope Score* intermedios entre vertebrados e invertebrados puede ser debido al mecanismo de adaptación parásito-hospedador causante de la aparición de mecanismos inmunomoduladores por parte de los parásitos capaces de regular o inhibir las respuestas de tipo alérgico.

Se constató que los dendrogramas construidos con información estructural no resolvían las relaciones evolutivas de manera correcta cuando se analizaba la proteína entera. Existe la posibilidad de que dos

tropomiosinas muy diferentes en su estructura pero con gran homología en un epitopo B causante de reacciones cruzadas no sean agrupadas como similares en el dendrograma. Por ello se realizaron los dendrogramas fragmentando las tropomiosinas. A pesar de analizar los fragmentos, estos árboles tampoco resolvían la filogenia cuando se analizaba la superficie tridimensional de los residuos 115-183, es decir, la zona en la que se encuentra el epitopo central de la molécula. El perfil de *Discotope Score* de esta región coincidió con los estudios experimentales de unión a IgE sobre los péptidos de esa región en la tropomiosina del langostino blanco (Ayuso *et al.*, 2010) y con el análisis de secuencia realizado anteriormente sobre la propensión a generar alergenicidad de este epitopo. Este hecho muestra la importancia de un análisis estructural en la predicción de reacciones cruzadas ya que éstas no siempre siguen reglas filogenéticas (Aalberse *et al.*, 2001). Nuestro análisis por fragmentos demostró que este epitopo es similar en los dos ascáridos estudiados, *A. simplex* y *Ascaris suum*, y a su vez se parecía mucho estructuralmente al de las tropomiosinas de crustáceos productores de alergias como son *F. aztecus*, *Pandalus borealis* y *L. vannamei*. Por el contrario, este epitopo central de nuestra tropomiosina (*Homo sapiens*), así como el de la del conejo (*O. cuniculus*) y del cerdo (*S. scrofa*) se agruparon en el nivel más alejado.

Nuestros resultados confirman que esta metodología de análisis (obtención de la secuencia, modelado, análisis de epitopos, comparación de superficies de epitopos) puede ser útil para la predicción de reacciones cruzadas sentando las bases para el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas con aplicación clínica.

La digestión gástrica disminuye el potencial de unión a IgE de las proteínas que se ingieren con los alimentos ya que los anticuerpos, incluyendo la IgE, se espera que se produzcan específicamente frente a regiones estables de la estructura terciaria de las proteínas (Mikita y Padlan, 2007). La minuciosa digestión que sufren las proteínas genera péptidos de menos de ocho aminoácidos, que debido a su tamaño no reaccionan con las estructuras responsables del reconocimiento y presentación de antígenos, y que por lo tanto son ignorados inmunológicamente (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2008). Esta incapacidad de ensamblaje a los surcos de unión de las moléculas de histocompatibilidad impide la generación de la respuesta Th2 adecuada para el estímulo de la respuesta humoral específica. En nuestro caso, las tropomiosinas de los vertebrados presentaron el menor número de péptidos con más de siete aminoácidos tras la digestión virtual, lo que confirmó la hipótesis de Mikita y Padlan (2007) en la que estos autores afirman que las tropomiosinas de invertebrados generan péptidos más grandes tras su digestión que las de los vertebrados pudiendo originar más fácilmente reacciones alérgicas. Destaca el hecho de que los parásitos con alguna fase del ciclo asociada al tracto gastrointestinal presentaron péptidos mayores de siete aminoácidos tanto en torno a la posición 200 como 135. Pero, curiosamente a este nivel se observó una gran diferencia entre los dos grupos de invertebrados no parásitos causantes de alergias alimentarias ya que en los moluscos estudiados estos péptidos derivados de tropomiosina, potencialmente capaces de desencadenar respuestas específicas, se situaron en torno a la posición 200 mientras que en los crustáceos analizados se evidenciaron hacia la posición 135. Este interesante hallazgo necesita ser estudiado experimentalmente *in vitro* mediante el empleo de sueros de individuos sensibilizados a moluscos o crustáceos.

La mayoría de los epitopos de unión a IgE de la tropomiosina han sido definidos para el alérgeno principal del langostino blanco *L. vannamei* (Lit v 1) (Ayuso *et al.*, 2010). Estos investigadores descubrieron los motivos LExxL y LExxN en la mayoría de los epitopos de unión a IgE. En nuestro caso observamos que los motivos LExxL fueron más numerosos que los motivos LExxN. Los motivos conservados que aparecían en todas las tropomiosinas analizadas en las posiciones 193-197 y 256-260 no fueron considerados responsables de las respuestas alérgicas ya que serían tolerados por las células del sistema inmunológico de vertebrados no siendo inductores de la producción de IgE. Por el contrario, los motivos LExxL que solo aparecen en las tropomiosinas de invertebrados (posiciones 95-99 y 144-148) son candidatos a ser responsables no solo de la alergenicidad sino también de la aparición de reacciones cruzadas entre distintos organismos. Estos epitopos son clínicamente relevantes por ser capaces de inducir manifestaciones de tipo alérgico independientemente de cual haya sido la causa de la primosensibilización.

Finalmente, se estudiaron los sitios candidatos de N-glicosilación que aparecen en las asparaginas de las posiciones del epitopo central en la mayoría de las tropomiosinas de invertebrados, no estando presentes en ninguna de las tropomiosinas de vertebrados. Estas modificaciones postraduccionales tienen lugar cuando las proteínas salen de la célula y son secretadas. La tropomiosina no contiene péptido señal, sin embargo, es interesante su estudio ya que esas modificaciones podrían suceder en nuestro tracto gastrointestinal o en cualquier momento previo a la ingestión y son importantes ya que modifican la superficie de los epitopos (Aalberse, 2000). Por ello, las diferencias observadas en la N-glicosilación de las asparaginas de los residuos 133-135, que aparecen en invertebrados, podrían estar involucradas en la formación del epitopo de unión a IgE que se predijo con Discotope 2.0. En la región 201, también candidata a generar alergenicidad, observamos la existencia de un sitio de posible O-glicosilación única en las tropomiosinas de vertebrados. Esta última modificación podría alterar la superficie de un posible epitopo en las tropomiosinas vertebrados, convirtiéndolas en no alérgicas.

5.2. Niveles de diamino-oxidasa y urticaria crónica

La urticaria crónica está considerada una enfermedad multifactorial con una etiología incierta. Perteneció al grupo de las enfermedades inflamatorias crónicas, afecta normalmente a los países ricos y tiene con frecuencia una base autoinmune (Bingham, 2008). Se han formulado varias hipótesis para intentar explicar el aumento de estas enfermedades inflamatorias, relacionadas generalmente con diferentes versiones de la hipótesis de la higiene, donde las características de la dieta y la diversidad y composición de la microbiota resultan cruciales (Haahtela *et al.*, 2013; Maslowski y Mackay, 2011).

Los protocolos actuales son cautelosos al abordar la relación de la urticaria crónica con la dieta. De cualquier modo, aproximadamente un 40% de los pacientes atribuyen sus síntomas urticariales a la ingesta de ciertos alimentos (Guida *et al.*, 2000). Además, varios estudios afirman que hay alimentos cuya ingesta puede ser beneficiosa en pacientes con urticaria crónica (Wagner *et al.*, 2016). La controversia existente podría deberse a diferencias geográficas y a preferencias alimentarias en las regiones estudiadas.

En nuestra región se dan tanto factores alimentarios como epidemiológicos, que contribuyeron a la realización del presente estudio centrándonos en una de las enzimas más importantes encargadas del

metabolismo de la histamina en la urticaria crónica. El primero de ellos es la asociación de la ingesta de pescado crudo con una alta prevalencia de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), constituyendo un fenotipo diferente de urticaria crónica y el segundo factor es la elevada tasa de consumo de pescado en nuestra región que constituye un pilar básico de la dieta Mediterránea (Daschner *et al.*, 2010b; Maslowski y Mackay, 2011; Puente *et al.*, 2008).

En la urticaria crónica, la determinación de la DAO, por el momento, no ha demostrado ser útil, ya que sus niveles se encuentran dentro de los observados en los sujetos control (Cho *et al.*, 2013). Por lo tanto, al plantear este estudio, no se esperaba detectar valores patológicos altos o bajos cuando se compararan con los valores normales de nuestro grupo control. Lo que pudimos observar, fue un conjunto de asociaciones significativas e interesantes entre los niveles de DAO con diferentes entidades clínicas. Pudimos, de este modo, demostrar diferentes situaciones tanto mediante la comparación entre los grupos UC+ y UC-, como al evaluar la exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado. Se sabe que los niveles de DAO sérica muestran una alta variabilidad interindividual pero, por otro lado, son relativamente estables en el tiempo en cada individuo (Ventura *et al.*, 2013). Por lo tanto, incluso si los niveles de DAO entrasen dentro del rango de los valores considerados “normales” y no se pudiese diferenciar entre pacientes con urticaria crónica y controles, podríamos aportar nuevos datos mediante el análisis de factores conocidos que pudieran contribuir a esos niveles de DAO sérica observados en los diferentes fenotipos de urticaria crónica estudiados y su relación con ciertos parámetros dietéticos.

Los pacientes del grupo UC- presentaron niveles más bajos de DAO sérica que los pacientes del grupo UC+. Los niveles de DAO sérica en los pacientes UC- no se correlacionaron ni con el UAS, ni con el número de antihistamínicos necesarios para el alivio de los síntomas. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre los niveles de DAO y la frecuencia de consumo de pescado azul fresco y enlatado. Ya se conocía la existencia de diferencias clínicas e inmunológicas entre los pacientes UC- y UC+ (Cuéllar *et al.*, 2013; Daschner *et al.*, 2011, 2013, 2014), tales como la asociación de la UC- con la ingesta de pescado azul. Estos pescados son capaces de generar gran cantidad de aminas biógenas que podrían ser desencadenantes de síntomas en la urticaria crónica. Por otra parte, el pescado azul es rico en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 cuyas propiedades antiinflamatorias se han asociado con un pronóstico favorable en la urticaria crónica (Daschner *et al.*, 2013). Se podría especular que, en los pacientes UC-, la ingesta de pescado azul pudiera ejercer una regulación positiva sobre la DAO entérica para conseguir metabolizar las grandes cantidades de histamina ingerida, lo que se reflejaría en unos niveles de DAO sérica más elevados cuanto más pescado azul se consuma (Daschner *et al.*, 2013). Sin embargo, esto no explicaría los niveles más bajos de DAO en pacientes del grupo UC- *vs* UC+. Por consiguiente, los ácidos grasos ω -3 podrían ser los responsables de la disminución de la actividad de la DAO sérica en UC-. De acuerdo con esta idea, previamente ha sido reportado que en un modelo animal con daño intestinal, el aceite de pescado mejoró la morfología intestinal y su función barrera, disminuyendo la actividad de la DAO en el plasma e incrementándose en la mucosa (Liu *et al.*, 2012). Si los niveles bajos de DAO sérica observados en nuestros pacientes estuvieran asociados con un incremento de la DAO en la mucosa, el estudio anteriormente mencionado estaría en concordancia con nuestros resultados en el grupo de UC-, donde la urticaria asociada a la ingesta de pescado (FIAE) no

estuvo relacionada con unos niveles diferentes de DAO, probablemente debido a una cantidad suficiente de DAO entérica capaz de metabolizar las aminas biógenas ingeridas.

Por otra parte, los pacientes con UC+ que presentaron un empeoramiento de la urticaria tras ingerir pescado (pescado azul), tuvieron unos niveles más bajos de DAO. Los síntomas de la intolerancia a la histamina, en la que los niveles de DAO extracelular son demasiado bajos para degradar adecuadamente las aminas biógenas, están finalmente relacionados con una sintomatología generalizada que incluye urticaria. En los seres humanos, las actividades más altas de la DAO se muestran en tejidos concretos como el intestino delgado y el colon ascendente (Maintz y Novak, 2007) y por lo tanto la DAO sérica refleja principalmente la producción de DAO en el intestino. Nuestras muestras de suero no reflejaron los niveles exactos de DAO en el momento de la reacción, pero si tenemos en cuenta la estabilidad relativa de la DAO en el tiempo, podemos concluir que estos niveles inferiores de DAO en pacientes UC+ predisponen al empeoramiento de la urticaria tras la ingesta de pescado. La DAO constituye la principal barrera para la absorción de la histamina intestinal (Schwelberger, 2010) y por lo tanto se pueden esperar reacciones adversas tras la ingesta de pescados productores de aminas si éstas exceden la capacidad de degradación de la DAO entérica.

Se ha propuesto que la DAO podría ser responsable de la degradación de histamina extracelular después de la liberación del propio mediador (Maintz *et al.*, 2006; Schwelberger *et al.*, 1998; Schwelberger y Bodner, 1997), siendo éste un hecho a considerar en el contexto de la urticaria crónica. Por lo tanto, es de esperar que la DAO deba de ser regulada positivamente en la urticaria crónica con el fin de hacer frente a las elevadas cantidades de histamina liberada por los mastocitos. En este escenario, argumentamos que la producción de DAO en los pacientes con urticaria crónica no es suficiente para degradar el propio excedente de histamina y simultáneamente eliminar la histamina generada por los alimentos ya que los niveles de DAO se mantienen prácticamente constantes en los pacientes que son sometidos a dietas libres de alimentos con histamina. En un estudio realizado por Guida *et al.*, (2000), la actividad de la DAO plasmática medida tras la inyección de heparina (para liberar hacia la sangre la DAO intestinal) en pacientes con urticaria crónica, solo se redujo ligeramente o cerca del límite inferior del intervalo normal cuando estos pacientes fueron sometidos a una dieta libre de histamina (Guida *et al.*, 2000).

Además, no se puede descartar que en algunos casos de urticaria crónica, la función barrera del intestino se encuentre dañada, lo que conduce a una elevada DAO sérica (Song *et al.*, 2009). Los sujetos sensibilizados a *Anisakis* presentan una mayor permeabilidad intestinal (Polimeno *et al.*, 2010) y además se ha demostrado que los alérgenos de *Anisakis* provocan lesiones de la mucosa gastrointestinal o alteraciones de la motilidad en estudios con animales (Sánchez-Monsálvez *et al.*, 2003) y humanos (Ubeira *et al.*, 2011). Por lo tanto, nuestros datos están en concordancia con estos trabajos, ya que la elevación de la DAO sérica de los pacientes UC+ en relación con los UC- se ha propuesto como resultado de una mucosa gastrointestinal lesionada y una elevada permeabilidad intestinal en estos pacientes (Song *et al.*, 2009). Otros estudios previos mostraron una reducción de la capacidad de degradación de la histamina en un subgrupo de pacientes con eccema atópico, donde la alergia alimentaria puede coexistir con una mucosa gastrointestinal dañada (Maintz *et al.*, 2006). Por tanto, los niveles de DAO sérica, aparentemente normales en la urticaria crónica, podrían ser paralelos a una

cantidad insuficiente de DAO entérica para tolerar alimentos ricos en aminos biógenas en el fenotipo UC+.

Los trastornos gastrointestinales han sido clásicamente asociados con la urticaria en pacientes que presentaban bajos niveles de DAO o baja capacidad de degradación de la histamina (Kanny *et al.*, 1993). En nuestro caso, no fue posible asociar los síntomas gastrointestinales tras ingesta de pescado con niveles más bajos de DAO debido a un sesgo al evaluar los síntomas ya que las molestias gastrointestinales y su relación con la ingesta de pescado son más imprecisas. Sin embargo, la exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado es fácil de evaluar por el paciente y el médico.

El segundo bloque de hallazgos en este estudio se relacionó con el perfil inmunológico de estos pacientes asociado con la DAO sérica. Los porcentajes de proliferación de linfocitos estimulados con *Anisakis* se correlacionaron perfectamente con los niveles de DAO sérica. Este fue un hecho esperable ya que la DAO se considera una enzima reguladora en tejidos de rápida proliferación (García-Martín *et al.*, 2009). La histamina y otras poliaminas son necesarias en muchos procesos celulares, especialmente para la proliferación de los tejidos. Las poblaciones de células que proliferan activamente presentan altos niveles de poliaminas que han demostrado ser agentes causales y no productos del crecimiento celular (Mondovi *et al.*, 2013). En este sentido, los niveles de DAO reflejan el papel regulador de esta respuesta proliferativa. En nuestro estudio, los pacientes del grupo UC+ presentaron mayores niveles de DAO que los UC- pero, en los UC+, también se detectó una correlación positiva entre la DAO y la IgE específica frente a *Anisakis*, así como con la IL-2 y la IL-6 séricas. Estas relaciones se podrían resumir de la siguiente manera: niveles más altos de IgE frente a *Anisakis* reflejan una mayor renovación de células productoras de anticuerpos (la IL-6 promueve la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas), lo que se refleja en mayores porcentajes de proliferación *in vitro*, donde se sabe que la IL-2 es necesaria para la proliferación de los linfocitos T.

Se ha demostrado que los niveles de poliaminas regulan la producción de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica humanas (Flescher *et al.*, 1989; Nakane *et al.*, 2004) pero, se ha de establecer si la relación entre las características inmunológicas detectadas y la DAO también puede ser validada en sujetos sin urticaria o, por el contrario, es una situación específica en la urticaria crónica y responsable del estado inflamatorio crónico de esta patología. La IL-6 es sintetizada por distintos tipos de células que intervienen en la inflamación identificadas en biopsias de pacientes con urticaria crónica como monocitos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T activados y neutrófilos (Kasperska-Zajac *et al.*, 2011). Esta citoquina actúa en los linfocitos B aumentando su supervivencia, crecimiento y maduración y, sobre los linfocitos T, activa su proliferación e inhibe a los linfocitos T reguladores (Hunter y Jones, 2015). También se ha demostrado que la IL-6 se correlaciona con la actividad de la urticaria crónica (Daschner *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2008) y en un estudio previo realizado por nuestro grupo se detectó una mayor concentración de TGF- β en pacientes de urticaria crónica sensibilizados por *Anisakis* (UC+) frente a pacientes con urticaria crónica pero no sensibilizados (UC-) (Daschner *et al.*, 2011). La IL-6, como citoquina pro-inflamatoria, encaja en el escenario de una elevada respuesta inmunológica; mientras que la correlación negativa de TGF- β inducido por Con A con la DAO en los pacientes del grupo UC+ actuaría como antagonista del proceso (Figura 116).

Una explicación alternativa podría ser que la DAO es, en última instancia, responsable del resto de las características inmunológicas encontradas, lo que conduciría a un estado pro-inflamatorio. En este sentido, se han caracterizado frecuentes polimorfismos genéticos asociados con diferentes actividades enzimáticas de la DAO (Agúndez *et al.*, 2012; Ayuso *et al.*, 2013) que podrían estudiarse en el futuro en relación a las características clínicas y asociadas a la dieta observadas en los pacientes con urticaria crónica. No se puede descartar que las variantes genéticas de nuestros pacientes puedan haber influido en los resultados, ya que se ha descrito una mutación perjudicial del gen que codifica para la DAO que está asociada con la respuesta clínica en la alergia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Agúndez *et al.*, 2012) y curiosamente, un subgrupo de pacientes con intolerancia a los AINES mostró síntomas cutáneos con urticaria. Además, existe variabilidad en la actividad de la DAO relacionada con el sexo de los sujetos estudiados siendo mayor en mujeres que en hombres sanos (García-Martín *et al.*, 2007), aunque nuestros datos no mostraron diferencias en ese sentido. Por lo tanto, no sabemos si la ausencia de diferencias en cuanto al sexo se debe a la propia enfermedad en la que el 80% de los pacientes con urticaria crónica son mujeres o si las posibles variantes genéticas están influyendo en nuestros hallazgos.

Cuando se evalúan los niveles de DAO sérica y su posible asociación con las características clínicas de la urticaria crónica, se deberían tener en cuenta los factores principales que actúan sobre estos niveles plasmáticos: variabilidad interindividual, regulación positiva por la existencia de tejidos en fase de proliferación, liberación endógena de histamina, permeabilidad intestinal y factores dietéticos. Finalmente, hay situaciones en las que un "exceso" de aminas biógenas alimentarias conduce a síntomas clínicamente evidentes. Por lo tanto, cabe esperar que, al menos, en un subgrupo de pacientes con urticaria crónica, las medidas dietéticas dirigidas a evitar la ingesta de alimentos ricos en histamina o la terapia de sustitución de DAO disponibles podrían ser útiles, como ya ha sido postulado anteriormente (Komericki *et al.*, 2011; Mušič *et al.*, 2013; Schwelberger, 2010).

Para este estudio, no se dispuso de las concentraciones de histamina en suero para analizar su interrelación con la DAO pero esto ya fue realizado en un estudio con pacientes de urticaria crónica comparando pacientes con y sin síntomas gastrointestinales (Cho *et al.*, 2013). Estos autores no encontraron ninguna asociación entre los parámetros clínicos, pero sí una correlación negativa clara y esperable entre los niveles de histamina plasmática y DAO. En otro estudio se encontró una disminución de la DAO, pero con niveles normales de histamina plasmática en pacientes con urticaria recurrente (Lessof *et al.*, 1990). En un tercer estudio, una dieta libre de aminas tuvo un efecto claro en la disminución de los niveles de histamina, pero la DAO no se modificó (Guida *et al.*, 2000).

En conjunto, nuestros resultados mostraron diferentes niveles de DAO en suero en función del fenotipo de urticaria crónica diagnosticado. Especialmente en el fenotipo UC+, la DAO sérica no solo se asoció con diferentes características inmunológicas de los pacientes, sino que también fue clínicamente relevante cuando se evaluó como un marcador de exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescados ricos en aminas. Estos resultados alientan la realización de futuros estudios enfocados en un posible asesoramiento dietético y/o terapia de sustitución de DAO en aquellos pacientes con urticaria crónica con niveles más bajos de DAO y/o previa exacerbación de la urticaria

tras la ingesta de determinados alimentos. Además, se han propuesto novedosos productos a base de DAO derivada de plantas en el tratamiento de enfermedades alérgicas (Mondovi *et al.*, 2013).

5.3. La hemoglobina, un nuevo alérgeno principal de *Anisakis simplex*

En este trabajo, la hemoglobina ha sido definida como un nuevo alérgeno principal de *Anisakis* (Ani s 13) no mostrando reactividad cruzada con la hemoglobina de *Ascaris*.

En primer lugar cabe destacar que las L3 de *Anisakis* y los adultos de *Ascaris* utilizados en el trabajo están en estadios biológicos diferentes. Por un lado, el extracto proteico total de las L3 de *A. simplex* empleado para los estudios, fue preparado a partir del estadio biológico que infecta al hospedador humano (Nieuwenhuizen y Lopata, 2013). Por otro lado, la hemoglobina de *Ascaris* solo se ha encontrado en los adultos (Barrett y Brophy, 2000; Blaxter, 1993; Hashimoto *et al.*, 2008). Por lo tanto, este es el único diseño posible, para el estudio, en cuanto a la fuente de hemoglobina.

Al realizar las determinaciones de los niveles de anticuerpos observamos que los pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) siempre presentaban niveles de inmunoglobulinas específicas frente a *Anisakis* más elevados que los pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+). Sucedió lo mismo en el caso de la hemoglobina, ya que estos pacientes con AGA presentaron niveles de IgE e IgG4 anti-hemoglobina de *Anisakis* más elevados que los pacientes del grupo UC+. Anteriormente, este hecho ya fue observado frente al extracto total y otros alérgenos recombinantes de *Anisakis* como Ani s 1 y Ani s 7. Sin embargo, el reconocimiento del alérgeno Ani s 7 por la IgE no difería mucho entre pacientes AGA y UC+, lo que sugería que ambas patologías estaban asociadas a un parasitismo agudo previo producido por larvas vivas (Cuéllar *et al.*, 2012b; Daschner *et al.*, 2014). La inclusión de la hemoglobina como un nuevo alérgeno de *Anisakis* para la evaluación de la IgE y la IgG4 específicas en estos pacientes podría ser de utilidad diagnóstica para distinguir los fenotipos AGA y UC+. Además, la hemoglobina podría ser importante en la sensibilización a *Anisakis* por vía inhalatoria, si esto fuera confirmado experimentalmente, en el entorno laboral de los manipuladores de pescado. En un estudio previo se determinó la prevalencia de sensibilización a *Anisakis* en 578 manipuladores de pescado, resultando ésta en un 8% y viéndose relacionada con dermatitis e hiperreactividad alérgica de las vías respiratorias (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006).

La hemoglobina de *A. simplex*, al ser reconocida por los anticuerpos de la clase IgE en más del 50% de los pacientes estudiados prospectivamente (64,3%) con síntomas cutáneos tras la parasitación por *Anisakis*, puede ser clasificada dentro del grupo de los alérgenos principales de *Anisakis* (Ani s 13). De manera similar, los alérgenos Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11.02, Ani s 12 y Ani s 14, fueron considerados previamente como alérgenos principales, por presentar porcentajes de reconocimiento de IgE del 85%, 88%, 81-100%, 78%, 57% y 54%, respectivamente, en pacientes sensibilizados (Tabla 4).

Al igual que sucedía con el extracto total, el porcentaje de sueros positivos a Ani s 13 fue mucho más elevado en el grupo de los pacientes diagnosticados de AGA con respecto al grupo de individuos con diagnóstico previo de UC+ (80,9% *vs* 47,8%). Otro alérgeno específico de *Anisakis*, Ani s 1, había mostrado en estudios anteriores unos porcentajes de reconocimiento muy similares: 82,1% *vs* 42,5%. Sin embargo, el alérgeno Ani s 7 presentó unos porcentajes de reconocimiento casi idénticos en ambos grupos de pacientes: 92,9% *vs* 92,5% (Cuéllar *et al.*, 2012b). Estos nuevos datos muestran como los

pacientes sensibilizados a *Anisakis* pertenecientes a ambas entidades clínicas presentan diferentes perfiles de reconocimiento frente a la hemoglobina del parásito, confirmando las hipótesis formuladas previamente en las que se postulaba que los pacientes del grupo UC+ presentaban un reconocimiento diferente de los alérgenos de *Anisakis*.

Con respecto a la reactividad de la IgG4, el 31,8% de los 44 pacientes sensibilizados mostraron IgG4 positiva frente a la hemoglobina de *A. simplex* (*s. l.*). La detección de IgG4 podría ser también de utilidad para distinguir los fenotipos AGA *vs* UC+ ya que solo el 17,3% de los pacientes del grupo UC+ presentaron niveles detectables en contraste con los pacientes con AGA, en los que su positividad alcanzó el 47,6%. Estas diferencias en la producción de IgG4 específica también han sido observadas previamente para los alérgenos Ani s 1 (65% *vs* 35%) y Ani s 7 (90% *vs* 28%) lo que podría indicar el papel protector de este anticuerpo frente a manifestaciones cutáneas crónicas mediante la competición con la IgE por la unión a los mismos epitopos (Daschner *et al.*, 2014; Ozdemir *et al.*, 2011; Wu y Zarrin, 2014).

Aunque existen diferencias morfológicas entre las L3 de las especies *A. simplex* y *A. pegreffii* (Quiazon *et al.*, 2008), los alérgenos Ani s 1, Ani s 2, Ani s 9 y Ani s 12 son prácticamente idénticos en ambas especies (Quiazon *et al.*, 2013). Consecuentemente, las hemoglobinas de *A. simplex* y *A. pegreffii*, es muy probable que también compartan la mayoría de su secuencia aminoacídica.

En el estudio realizado mediante inmunotransferencia se demuestra que el anticuerpo monoclonal 4E8g reconoce las hemoglobinas de las L3 de *A. simplex s. l.* y de los adultos de *A. suum*. Nieuwenhuizen *et al.*, (2013) observaron que el mencionado anticuerpo se unía a una proteína de 37 kDa presente en el extracto somático larvario y en el antígeno ES de *A. pegreffii* y a otra proteína de 40 kDa presente en el extracto de los adultos de *A. suum*. Asimismo reconocía un dímero de 80 kDa que también detectamos en nuestros experimentos. La unión de este anticuerpo monoclonal ha sido demostrada también por estos investigadores mediante inmunohistoquímica en ambos nematodos (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013). Por esta razón, decidimos utilizar este anticuerpo monoclonal 4E8g para capturar también la hemoglobina de *A. suum*, y medir, mediante ELISA captura, la presencia de IgE sérica anti-hemoglobina de *Ascaris* de la misma forma que se midieron las inmunoglobulinas anti-hemoglobina de *Anisakis*. Los métodos de diagnóstico inmunológico que emplean antígenos ES son más sensibles y específicos, como se ha indicado previamente en el caso del diagnóstico de la larva migratoria visceral (Magnaval *et al.*, 1992).

Aunque los niveles de anticuerpos específicos medidos por ELISA indirecto fueron significativamente superiores frente al extracto de *Anisakis*, el extracto de *Ascaris* también fue reconocido por la IgE y la IgG4 de los pacientes sensibilizados a *Anisakis*, mostrando reactividad cruzada entre ambos extractos totales. En estudios previos realizados mediante inmunotransferencia (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013), se observó que los sueros de ratones infectados experimentalmente con larvas vivas de *A. pegreffii* contenían IgE e IgG específicas frente su hemoglobina homóloga. Sin embargo, la reactividad cruzada con *A. suum* solo fue observada en el caso de los anticuerpos de tipo IgG, sugiriéndose que solo la hemoglobina de *Anisakis* podía fijar IgE.

En nuestras condiciones experimentales, a pesar de haber confirmado la existencia de reactividad cruzada entre los extractos totales de *Anisakis* y *Ascaris* mediante ELISA indirecto, ninguno de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* presentó IgE frente a la hemoglobina de *Ascaris* medida mediante ELISA captura. Sería muy interesante probar esta proteína frente a sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de parasitación por *Ascaris* para confirmar la ausencia de reconocimiento por parte de la IgE, sin embargo, nuestros resultados sugieren la ausencia de reacción cruzada en el caso de la IgE empleando sueros positivos a *Anisakis*.

La IgE anti-hemoglobina de *A. simplex s. l.* se correlacionó con la IgE específica frente a los antígenos totales de *Anisakis* y *Ascaris*. Los pacientes no parecen tener IgE frente a la hemoglobina de *Ascaris* pero quizás alguno de los otros anticuerpos frente a *Anisakis* presente reactividad cruzada.

Lo sorprendente de este estudio experimental fue la ausencia de reactividad cruzada por parte de los pacientes de *Anisakis* con la hemoglobina de *Ascaris* a pesar de que ambas hemoglobinas contienen un 79,3% de similitud y un 65% de sus aminoácidos son idénticos. La ausencia de reconocimiento por parte de la IgE humana frente a la hemoglobina de un parásito muy adaptado a su hospedador, apoya la hipótesis del mimetismo molecular de la hemoglobina de *Ascaris* con la hemoglobina humana como consecuencia de la larga historia co-evolutiva de parasitación de *Ascaris* al ser humano. Por el contrario, sabemos que *Anisakis* no está adaptado al hombre y que éste actúa como un hospedador accidental ya que el hospedador definitivo de *Anisakis* son los mamíferos marinos y, en particular de *A. pegreffii* (del que se dispone de la secuencia en las bases de datos), es principalmente el delfín *Tursiops truncatus*. ¿Habría entonces también mimetismo molecular entre la hemoglobina de *Anisakis* y la del delfín? Para profundizar en la demostración de la hipótesis nos planteamos proseguir *in silico* con el estudio de estas y otras hemoglobinas de nematodos y sus hospedadores.

Con respecto a la predicción de epitopos, los valores de *Discotope Score* para los Epitopos 1 y 4 (situados cada uno en un dominio globina) fueron similares en las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* y podrían estar involucrados en la unión de IgG porque la región equivalente al Epitopo 1 en el alérgeno Chi t 1 (péptido 41-60) fue reconocida por inmunoglobulinas específicas de conejo y anticuerpos monoclonales de ratón todos ellos pertenecientes al isotipo IgG (van Kampen *et al.*, 2001). La cola polar del extremo C-terminal y la región central que conforman el Epitopo 3 de la hemoglobina de *Ascaris* hacen que sea muy diferente al Epitopo 3 de la hemoglobina de *Anisakis* (Ani s 13). Los epitopos más importantes de Ani s 13 en la unión de la IgE y en la especificidad del reconocimiento, podrían ser los epitopos 2 y 5. El Epitopo 2 en la hemoglobina de *Anisakis* tiene más extensión y más propensión para ser un epitopo que en la hemoglobina de *Ascaris*. Nuestros resultados experimentales sugieren que la hemoglobina de *Anisakis* podría ser alérgica debido a que la superficie del Epitopo 2 podría establecer uniones a IgE de igual modo que lo hace la región equivalente (péptido 80-100) en Chi t 1 (van Kampen *et al.*, 2001). En el estudio de van Kampen *et al.*, (2001), de 15 pacientes alérgicos a Chi t 1, 13 de ellos presentaron IgE frente al péptido de las posiciones 80-100.

Basándonos en los hechos expuestos podemos afirmar que las hemoglobinas de *Chironomus* y *Anisakis* parecen tener epitopos específicos de isotipo. En otros alérgenos como Der f 11, identificado en *Dermatophagoides farinae*, se ha observado la presencia de epitopos dominantes para la unión de IgE o IgG (Tsai *et al.*, 2000).

El Epitopo 5 presente en la hemoglobina de *Anisakis* es un epitopo conformacional ausente en la hemoglobina de *Ascaris*. Van Kampen *et al.*, (2001) afirmaron que no solo los péptidos lineales (péptido 80-100) eran los responsables de la unión de la IgE, sino que Chi t 1 tenía también epitopos conformacionales. Dos de los anteriormente mencionados 15 pacientes investigados por los citados autores en su estudio, solo reconocían la molécula entera de Chi t 1 y no los péptidos. Estos datos previos apoyan la existencia de este epitopo conformacional en la hemoglobina de *Anisakis*. Además, este Epitopo 5, al no ser compartido con *Ascaris*, podría ser responsable de la especificidad de la unión de la IgE de los pacientes positivos a *Anisakis*.

En relación a los epitopos observados en las hemoglobina de otros nematodos, los epitopos predichos en la de *P. decipiens* fueron similares a los observados en *Anisakis* 13. Las pequeñas diferencias observadas en el *Discotope Score* se presentan en un Epitopo 5 más corto y sin la región en torno a la posición 150 y con una puntuación más alta en los Epitopos 1 y 4. Aunque la secuencia de la hemoglobina de *P. decipiens* es muy similar a la de la hemoglobina de *Anisakis* (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013), la hemoglobina de *P. decipiens* parece ser prácticamente similar a la hemoglobina de *A. suum* en lo relativo a las glicosilaciones y peso molecular (Dixon *et al.*, 1991). Otra diferencia entre las hemoglobinas de *P. decipiens* y *A. suum* es que la secuencia de la cola polar en la región C-terminal, solo tiene una repetición His-Lys-Glu-Glu (HKEE) y en *A. suum* hay cuatro repeticiones HKEE, lo que ha sido ampliamente estudiado por su importancia en la oligomerización ya que ambas hemoglobinas se agregan formando octámeros (Minning y Goldberg, 1998).

Los epitopos observados exclusivamente en la hemoglobina de *T. canis* (Epitopos 1 y 2) son de menor extensión y presentan menos propensión a ser epitopos, lo que se refleja en valores más bajos de *Discotope Score*.

Cabe destacar que Discotope 2.0 es un programa diseñado para la predicción de epitopos B conformacionales, por lo que no tiene en cuenta el isotipo de inmunoglobulina que se vaya a unir a esos epitopos predichos. Resulta curioso que al realizar la predicción de epitopos en la hemoglobina alérgica Chi t 1 solo obtengamos la Pro89 como posición candidata a ser epitopo. Representando los valores de *Discotope Score* por cada posición, se observa que los péptidos que resultaron ser más inmunogénicos en los estudios experimentales de van Kampen *et al.*, (2001) (Epitopos 1 y 2) encajan perfectamente con las puntuaciones más altas. De hecho con un umbral de detección más bajo ($< -3,7$), se hubieran detectado los Epitopos 1 y 2 por completo. Otro aspecto que cabe mencionar es que Discotope no predijo ningún epitopo en ninguna de las hemoglobinas de los mamíferos que actúan como hospedadores definitivos. Esto indica que estas proteínas presentan menor probabilidad de contener epitopos y son por lo tanto menos antigénicas que las hemoglobinas de nematodos/insectos según los criterios de cálculo y las 52 estructuras de complejos antígeno-anticuerpo con las que fue diseñado el programa (Kringelum *et al.*, 2012).

Algunos estudios previos que emplearon distintas aproximaciones inmunoinformáticas y de modelado por homología (con el programa Discotope) realizaron comparaciones de las predicciones obtenidas con resultados experimentales. Por ejemplo, Discotope predijo correctamente los epitopos B de un nuevo antígeno de *Plasmodium* en alrededor del 55% de las posiciones analizadas (Bergmann-Leitner *et al.*, 2013). Los nuevos métodos de predicción de epitopos conformacionales no mostraron mejoras

significativas sobre Discotope y otros métodos existentes previamente. En otro estudio, se evaluaron varios programas de predicción de epitopos con el virus de la fiebre aftosa del ganado (*Foot-and-mouth disease virus* – FMDV) (Borley *et al.*, 2013). Discotope realizó la mejor predicción de entre todos los programas analizados, identificando el 61% de los epitopos descritos previamente para todos los serotipos del FMDV, aunque lo hizo con bastante imprecisión. En el mismo trabajo, los autores probaron una nueva aproximación para la identificación *in silico* de nuevos epitopos mediante un consenso de los tres programas (Epitopia, Ellipro y Discotope). Sin embargo, esta estrategia no mejoró la precisión ni la exactitud de cualquiera de los programas por separado. En las revisiones más actuales sobre inmunoinformática (Backert y Kohlbacher, 2015) y en estudios recientes *in silico* (Karkhah y Amani, 2016), la versión 2.0 Discotope consiguió la mejor posición dentro de los programas de predicción de epitopos B conformacionales.

Existen otras posibilidades que podrían explicar la alergenicidad de Anis 13: los fenómenos de dimerización, las rupturas enzimáticas y/o las glicosilaciones.

Los procesos de dimerización influyen de forma importante en el entrecruzamiento de los receptores de los linfocitos B por los alérgenos (Ghosh y Gupta-Bhattacharya, 2008; Rouvinen *et al.*, 2010) pero se debe tener en cuenta que en el proceso de dimerización se podrían esconder o mostrar nuevos epitopos. La hemoglobina alérgica Chi t 1 puede aparecer como monómero o como dímero (Weber y Vinogradov, 2001) pero las hemoglobinas de *Ascaris* y otros nematodos se sabe que son estables como octámeros, aunque no se ha conseguido nunca cristalizar la estructura intacta del octámero (Goldberg, 1999). Por el momento, no conocemos si Anis 13 es estable como dímero u octámero. El peso molecular teórico de la hemoglobina de *Anisakis* es 36,7 kDa. Si “n” es el número de monómeros: n=2, 73,4 kDa; n=3, 110,1 kDa; n=4, 146,8 kDa; n=5, 183,5 kDa; n=6, 220,2 kDa; n=7, 256,9 kDa; n=8, 293,6 kDa; los resultados obtenidos mediante inmunotransferencia en nuestras condiciones experimentales sugieren que Anis 13 está presente en solución en todas las formas, desde monómero a octámero debido a las numerosas bandas observadas desde 37 kDa hasta más de 250 kDa, observándose mejor en condiciones no reductoras.

Todos los alérgenos pueden sufrir ataques por proteasas. Por ejemplo, la ausencia de alergenicidad de la mayoría de las tropomiosinas de vertebrados podría ser debida a la ruptura enzimática en péptidos más pequeños que los producidos en la digestión de las tropomiosinas de invertebrados. Esos péptidos de menor tamaño podrían no plegarse correctamente y no serían reconocidos por la IgE (Mikita y Padlan, 2007).

Finalmente, las glicosilaciones son esenciales para la localización de los epitopos de una molécula porque modifican la superficie y por consiguiente los epitopos. Además una limitación de Discotope 2.0 es que no considera los sitios de glicosilación para predecir epitopos. En el caso de la hemoglobina de *Ascaris*, se determinaron experimentalmente dos N-glicosilaciones en las posiciones 19 (residuo N-terminal de la proteína madura) y 216; una en cada dominio globina (De Baere *et al.*, 1992).

La única secuencia de hemoglobina de *Anisakis* disponible en las bases de datos ([*Anisakis pegreffii*] GenBank: [AFY98826.1](#)) es, como se ha mencionado anteriormente, considerablemente similar a la de *Ascaris* ([*A. suum*] GenBank: [AAA29374.1](#)). Hay 201 aminoácidos idénticos (65%) entre los 309 y los

320 aminoácidos totales (sin péptido señal) de las secuencias de *Anisakis* y *Ascaris* respectivamente. No obstante, basándonos en los modelos tridimensionales generados con HHPred-MODELLER, pudimos observar que no comparten tantas similitudes en superficie ni en potencial electrostático, lo que es muy importante para la unión de los anticuerpos (van Oss, 1995).

Nuestros resultados muestran como las hemoglobinas de los nematodos estudiadas presentaron pI (puntos isoeléctricos) ácidos y más bajos que las hemoglobinas de sus hospedadores vertebrados. Este hecho ya había sido observado en un estudio con la hemoglobina de *Anisakis*, la hemoglobina de *Ascaris* y la del delfín en las que los pI experimentales fueron 6,2; 5,1 y 7,2, respectivamente (Suzuki y Ishida, 1979). De Baere *et al.*, (1990) en otro estudio experimental determinaron el pI de la hemoglobina de *Ascaris* en 5,0 para la molécula nativa y 6,6 para los dominios globina (De Baere *et al.*, 1991). El pI teórico que obtuvimos para la hemoglobina de *Ascaris* fue de 7 y para la de *Anisakis* fue de 6,03.

Estas discrepancias en el caso de la hemoglobina de *Ascaris* pueden deberse a muchos factores entre los que podrían encontrarse la formación de oligómeros. El pI varía en función del estado de agregación que se analice (Salaman y Warwicker, 2005). Si se analiza el pI del octámero, por ejemplo, las colas C-terminales con potencial electrostático positivo (isosuperficie roja) se agruparían formando un barril (De Baere *et al.*, 1992) y de esta manera quedarían ocultos los residuos básicos mientras que resultarían expuestos la mayoría de los ácidos aportando así ese pI experimental tan bajo. Sin embargo, la idea de que la hemoglobina de *Ascaris* presente un pI similar al de la hemoglobina humana añadiría una razón más hacia la hipótesis del mimetismo molecular.

Las hemoglobinas del delfín y la foca al igual que la humana presentan un pI > 7, sin embargo las etapas del ciclo de vida de *Ascaris* son muy diferentes a las de *Anisakis* y *Pseudoterranova*, que nunca presentan estadios hemáticos.

Observamos el número de aminoácidos cargados positivamente frente a los cargados negativamente en todas las hemoglobinas siendo éstos últimos mucho más numerosos en las hemoglobinas de nematodos parásitos que en las de sus hospedadores. La riqueza de glutámico y aspártico era una característica de la hemoglobina de *Ascaris* ampliamente estudiada (Darawshe *et al.*, 1987; Wittenberg *et al.*, 1965). Nuestros resultados de potencial electrostático encajaban con los datos de pI y porcentajes de aminoácidos cargados negativamente, observándose potenciales muy potentes con carga negativa para las hemoglobinas de nematodos. En el caso de la proteína T1, que no ocasionaba reacciones alérgicas aunque pertenecía a la familia del alérgeno principal del abedul, Bet v 1, se encontró una superficie con un potencial electrostático completamente diferente al mencionado Bet v 1 (Ghosh y Gupta-Bhattacharya, 2008). El potencial electrostático en la mayoría de los epitopos predichos en las hemoglobinas de nematodos, se distribuía en una región cargada positivamente y otra negativamente. Este resultado concuerda con la teorías recientes en las que se ha observado que la unión del anticuerpo al antígeno está caracterizada por aminoácidos hidrófobos en el centro de la unión, flanqueados por aminoácidos cargados (Kringelum *et al.*, 2013).

En general, se producen reacciones cruzadas entre organismos relacionados filogenéticamente ya que sus proteínas se parecen en sus secuencias y, por lo general, en su estructura tridimensional. Nuestro dendrograma, construido con información estructural de la hemoglobina, no resolvió las relaciones

evolutivas de las especies representadas de manera correcta. Este hecho confirma que la evolución de las moléculas no siempre sigue reglas filogenéticas (Aalberse *et al.*, 2001). Generalmente la estructura global de las proteínas está mejor conservada que su secuencia a lo largo de la evolución (Li *et al.*, 2008), por ello existen proteínas homólogas evolutivamente distantes que tienen estructura tridimensional similar (Söding *et al.*, 2005). Las moléculas de los parásitos sufren una fuerte presión selectiva por el sistema inmune del hospedador que busca la expulsión o muerte del parásito. Por este motivo, uno de los recursos para evadir esta respuesta es camuflarse, mimetizando las proteínas del entorno del hospedador para evitar su expulsión, con el coste de la posible generación de una enfermedad autoinmune (Hurford y Day, 2013). Esta expulsión será mediada principalmente por las consecuencias de la unión de IgE en el caso de los helmintos (Fitzsimmons *et al.*, 2014; Fitzsimmons y Dunne, 2009).

La similitud observada entre el dominio I de la hemoglobina de *Ascaris* y la subunidad α de la hemoglobina humana puede ser un buen ejemplo de mimetismo molecular. La hemoglobina de *Ascaris* es uno de los 20 antígenos mayoritarios del fluido pseudocelómico y de los productos de excreción/secreción de este parásito (Chehayeb *et al.*, 2014; Nieuwenhuizen *et al.*, 2013), por lo que probablemente haya sufrido presión evolutiva para suavizar la respuesta inmunológica de su hospedador. Una de las consecuencias del mimetismo molecular de las proteínas de *Ascaris* puede ser la aparición de autoanticuerpos como los factores reumatoides (Sánchez-Andrade *et al.*, 2009). Los factores reumatoides son anticuerpos, habitualmente IgM, que reconocen la región Fc de las IgG del propio individuo y aunque, no se conoce el mecanismo, es posible que *Ascaris* posea proteínas similares a la Fc de la IgG humana, o bien que la persistencia de inmunocomplejos causados por estos helmintos pueda resultar en la activación de linfocitos Th (CD4+) que activen a linfocitos B para generar factores reumatoides (Sánchez-Andrade *et al.*, 2009).

Del mismo modo se observó cierta similitud entre el dominio I de la hemoglobina de *Anisakis* y *Pseudoterranova* con las hemoglobinas de sus hospedadores definitivos principales: delfín y foca, respectivamente. La hemoglobina de *Pseudoterranova* es la proteína mayoritaria del fluido pseudocelómico, determinando incluso la coloración de las larvas (Dixon *et al.*, 1993). Por ello, parece adecuado pensar que en los comienzos de la relación parásito-hospedador esta proteína debió de ser clave en la detección de estos nematodos por parte del sistema inmunológico de sus hospedadores definitivos, representando un papel importante en los fenómenos de co-adaptación y co-evolución (Mattiucci y Nascetti, 2008).

5.4. Alergenicidad de las tropomiosinas de pescado: desafiando un dogma inmunológico

Las tropomiosinas de vertebrados han sido consideradas en la literatura como proteínas no alergénicas. Sin embargo, en los últimos años, se han publicado estudios que nos permiten desafiar este dogma.

Algunas preguntas básicas son importantes cuando interpretamos las recientes evidencias científicas:

1. ¿Por qué algunas tropomiosinas son alergénicas y otras no?
2. ¿Cuáles son las diferencias entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados?
3. ¿Existen nuevas aproximaciones científicas que puedan ayudarnos a elucidar nuestras cuestiones?
4. ¿Cuándo los anticuerpos de la clase IgE son clínicamente relevantes?

La hipótesis formulada se basa en la evolución molecular de las proteínas. No todas las regiones de los cromosomas de vertebrados presentan las mismas tasas de sustitución (*International Chicken Genome Sequencing Consortium*, 2004) ni todas las especies de vertebrados tienen el mismo tiempo de evolución (Kumar y Hedges, 1998). La tropomiosina es una proteína muy conservada en la evolución pero hay algunos cambios aminoacídicos entre las tropomiosinas de diferentes especies de vertebrados como se ha analizado en el capítulo 4.1. Las especies de invertebrados están filogenéticamente más alejadas de la especie humana y es por ello que su alergenicidad parece ser mayor, pero dentro de los vertebrados, los peces (que son vertebrados primitivos), podrían tener tropomiosinas con características más parecidas a las tropomiosinas de invertebrados y, por consiguiente, ser alergénicas.

Los invertebrados y los peces (junto con reptiles y anfibios) comparten su capacidad para vivir con variaciones considerables en su temperatura interna (poiquiloterms). Ellos también son ectoterms porque dependen de fuentes externas de calor para regular su temperatura corporal. La alergenicidad de las tropomiosinas de pescado podría deberse al hecho evolutivo de que los peces pueden vivir en aguas frías y sus tropomiosinas presentan sustituciones estratégicas de aminoácidos que solucionan la rigidez muscular inducida por el frío (Fudge y Heeley, 2015). Como fue previamente hipotetizado en el apartado 5.1, la mayor flexibilidad de las tropomiosinas de invertebrados podría originar epitopos distintos a los de las tropomiosinas de organismos homeoterms (Figura 117).

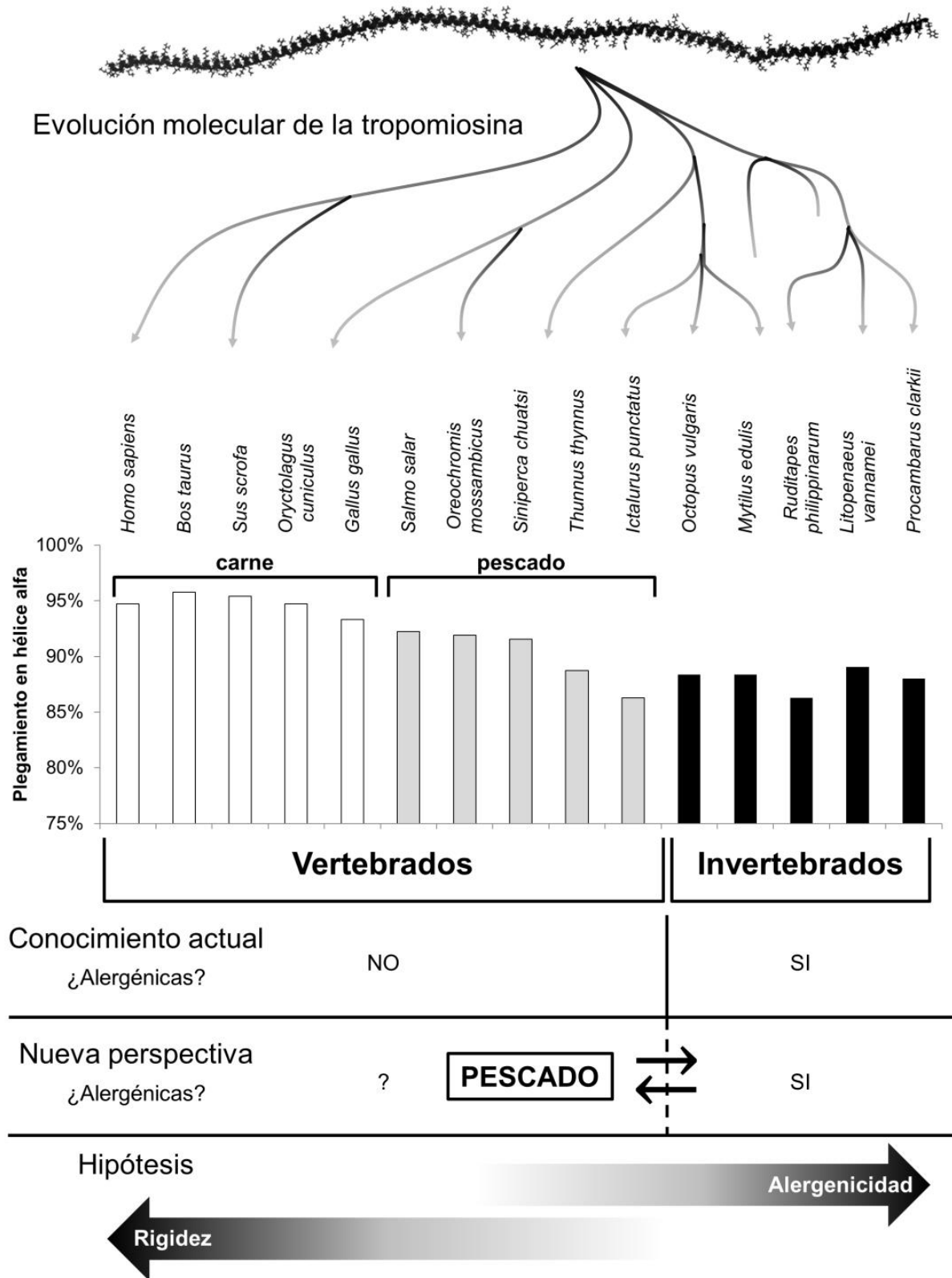


Figura 117. Representación esquemática del dogma actual de la alergenicidad de las tropomiosinas, nuevas perspectivas y nuestra hipótesis. La predicción del plegamiento en hélice alfa de las tropomiosinas se realizó del mismo modo que en el apartado 4.1.3, escogiendo especies comestibles e incluyendo las tropomiosinas siguientes (GenBank y especie): [NP_001117128.1](#) *Salmo salar*; [AFV53352.1](#) *Oreochromis mossambicus*; [AEK21799.1](#) *Siniperca chuatsi* y [NP_001187627.1](#) *Ictalurus punctatus*. La escala temporal desde invertebrados al hombre no es lineal.

Evaluaremos la hipótesis, por un lado, a la luz de estudios experimentales y clínicos recientes que sugieren que las tropomiosinas de pescado pueden ser alergénicas y, por otro lado, describiendo interesantes enfoques *in silico* que muestran a la tropomiosina como una proteína cuya secuencia ha cambiado más lentamente a lo largo del tiempo evolutivo debido a sus importantes funciones celulares, y por lo tanto es muy similar a la humana (pero no idéntica). Por lo tanto, con esta evaluación pretendemos combinar evidencias experimentales/clínicas y bioinformáticas para dar importancia a las características tridimensionales que afectan a los epitopos de unión a IgE y, en consecuencia, a la respuesta alérgica de las tropomiosinas de vertebrados, especialmente de las tropomiosinas de pescados.

En cuanto a las evidencias experimentales/clínicas, existen tres estudios que apoyan nuestra hipótesis.

El primero puede ser considerado como la ruptura del dogma establecido al describir la primera tropomiosina alergénica procedente de un organismo vertebrado, como es la tilapia mozambiqueña (*Oreochromis mossambicus*) (Ore m 4) (Liu *et al.*, 2013). Estos autores afirmaron que la cantidad de IgE anti-tropomiosina no se correlacionaba significativamente con la gravedad de los síntomas en los 10 pacientes estudiados por ellos (Liu *et al.*, 2013). Se observaron síntomas alérgicos y digestivos en los pacientes tras la realización de una prueba de provocación oral controlada doble ciego con tilapia. En general, si las tropomiosinas alcanzan los requisitos necesarios para inducir una respuesta de IgE, la relevancia clínica dependerá en gran medida de otros factores, como la vía de administración o factores protectores concomitantes, como la existencia de anticuerpos IgG4 o IgA (Daschner *et al.*, 2012). De hecho, en el estudio de la tilapia se confirmó que ningún paciente presentaba IgG frente a esta tropomiosina. En esos pacientes, un diagnóstico previo de alergia a pescado estuvo directamente relacionado con el inicio de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que sufrieron tras la ingesta de tilapia. Sin embargo, cuatro de los 10 pacientes alérgicos a tilapia tenían alergia concomitante a gambas y no presentaron EII tras la ingesta de tilapia. Curiosamente, la tropomiosina de gamba inhibe aproximadamente el 55% de la unión de la IgE sérica a los epitopos de Ore m 4, lo que demuestra que hay epitopos similares que provocan la reacción cruzada con la tropomiosina de gamba, pero también que gran parte del reconocimiento se debe a epitopos específicos de la tropomiosina del pescado (Liu *et al.*, 2013).

El segundo estudio que apoya la presente hipótesis es la descripción por nuestro grupo de investigación del caso clínico del paciente sensibilizado a tropomiosina y alérgico al marisco y a los pescados que se ha expuesto en el apartado [4.4.1](#) de esta memoria. Este paciente, fue utilizado por nosotros como modelo de estudio para demostrar que el reconocimiento por parte de la IgE de la tropomiosina de diferentes especies de pescados puede ser clínicamente relevante. Las moléculas de IgE de este paciente también reconocieron tropomiosinas de moluscos, artrópodos (crustáceos, ácaros y cucarachas) y nematodos (*Anisakis*, *Ascaris* y *Trichinella*), en ausencia de parasitosis, siendo clínicamente relevantes. A la edad de 13 años comenzó a tener síntomas tras ingerir varias especies de peces. En el capítulo correspondiente se ha expuesto que realizamos un análisis mediante inmunotransferencia de la IgE, IgG4 e IgA frente a 13 especies de peces. La IgE se detectó en cuatro de las seis especies frente a las que el paciente tenía síntomas, por lo que las tropomiosinas de estos peces (lubina, bonito, emperador y merluza) pudieron provocar reacción cruzada. Curiosamente, el paciente toleró sardinas enlatadas, boquerones o atún, así como salmón ahumado o cocido, que son, salvo el salmón cocido, pescados

procesados. Las altas temperaturas y presiones a las que son sometidos los pescados en el proceso de enlatado parecen ser responsables de la ausencia total de bandas proteicas y una disminución de la alergenicidad. Este hecho se observó también en otro estudio sobre la alergenicidad de los pescados tras el procesamiento industrial en el que se muestra como el perfil electroforético del atún enlatado, en el que no se observaron bandas definidas, no fue reconocido por los pacientes (Sletten *et al.*, 2010). En cuanto a los anticuerpos protectores, el isotipo IgG4 no se detectó en nuestro estudio, frente a ningún pescado, al igual que sucedió en el estudio de la tilapia anteriormente mencionado (Liu *et al.*, 2013). Al igual que en el trabajo anterior de Liu *et al.*, (2013), la presencia de IgE frente a las tropomiosinas de los pescados se asoció con diferentes síntomas clínicos tras la ingesta de pescado, con una preponderancia de síntomas digestivos y no cutáneos. Sin embargo, la alergia al marisco del paciente no se asoció con síntomas digestivos. Aunque nuestro paciente presentó IgA sérica frente al atún (tolerado) y frente a otros organismos que no podía tolerar, se podría hipotetizar que la ausencia de IgA protectora en el epitelio intestinal podría contribuir a la aparición de los síntomas digestivos. Por último, el paciente analizado por nosotros reconoció únicamente la forma dimérica de la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3). Estas formas diméricas existen en la naturaleza en el caso de varios alérgenos y podrían influir positivamente en la alergenicidad, al contrario de lo que sucede con los monómeros que parecen ser hipoalergénicos (Rouvinen *et al.*, 2010).

Finalmente, el tercer estudio experimental, también incluido en esta memoria, parece confirmar el papel de la tropomiosina como un alérgeno relevante en pacientes que afirmaron presentar reacciones adversas tras la ingesta de diferentes especies de pescado (ver apartado [4.4.2.](#)). En este estudio el 84% de los pacientes eran mujeres. Este fuerte sesgo de género se observa en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, siendo mujeres tres de cada cuatro pacientes que las padecen (Rubtsova *et al.*, 2014). Por otro lado, con respecto a las alergias alimentarias, también la alergia a la parvalbúmina del pescado presenta un sesgo femenino significativo (van Do *et al.*, 2005). Este hecho podría ser atribuido a las diferencias genéticas y hormonales observadas en la respuesta inmunológica de las mujeres (Oertelt-Prigione, 2012). El reconocimiento de tropomiosinas de pescados puede deberse a una reacción autoinmune debido a la elevada identidad de secuencia (al menos del 90%) con tropomiosinas humanas (Jenkins *et al.*, 2007) habiéndose discutido que la tropomiosina alérgica de la tilapia podría estar produciendo una reacción cruzada con la isoforma 5 de la tropomiosina humana, que es un conocido auto-antígeno en pacientes con colitis ulcerosa (Liu *et al.*, 2013; Mirza *et al.*, 2006; Onuma *et al.*, 2000). La tropomiosina también ha sido documentada como auto-antígeno en enfermedades como la hepatitis autoinmune, la enfermedad de Behçet o la enfermedad de Alzheimer (Mahesh *et al.*, 2005). La bacteria *Streptococcus pyogenes*, que es un patógeno humano que es portado de manera asintomática en la mucosa oral y nasofaríngea (Walker *et al.*, 2014), expresa proteínas similares a la tropomiosina denominadas proteínas M (Smeesters *et al.*, 2010; Tandon, 2014). En particular, las proteínas M5 y M6 son reconocidas de forma cruzada con las tropomiosinas del conejo y del hombre debido a que comparten epitopos conformacionales (Fischetti, 1989). Los fenómenos patológicos autoinmunes podrían ser el resultado de un mecanismo conservado evolutivamente para defendernos de patógenos comunes. Las células de la inmunidad innata, como por ejemplo linfocitos NKT invariantes (iNKT), linfocitos $\gamma\delta$ o células linfoides de la inmunidad innata de tipo 3 (ICL3) que constituyen la primera línea celular de

defensa, podrían inducir respuestas inmunológicas frente a patógenos y ser capaces de reconocer erróneamente moléculas homólogas como las tropomiosinas de las células propias del individuo. En primer lugar, los linfocitos iNKT tienen un papel central en la modulación de las respuestas inmunológicas (innata y adaptativa) que se desarrollan en infecciones, enfermedades autoinmunes, alergias y cáncer (Brennan *et al.*, 2013). Estudios previos realizados en ratones demostraron, de acuerdo con la hipótesis de la higiene, que una exposición a microorganismos en etapas tempranas del desarrollo modula la cantidad y la funcionalidad de los linfocitos iNKT y, en su ausencia, una exposición tardía a factores que los estimulan puede inducir una respuesta autoinflamatoria, incrementándose la susceptibilidad a enfermedades como EII y asma (Torsten *et al.*, 2012). Asimismo, los linfocitos V γ 9V δ 2, que constituyen el principal subgrupo de linfocitos T $\gamma\delta$ de la sangre humana (1-10% del total de linfocitos T sanguíneos en individuos sanos), también se localizan con frecuencia en el intestino, hígado y mucosas. Los linfocitos V γ 9V δ 2 responden frente a ciertos tipos de tumores y frente a patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Adams *et al.*, 2015). Por último, las ILC3 modulan las funciones de las células epiteliales y mantienen controlada la población de bacterias comensales y patógenas de las mucosas. Estas células están involucradas en la EII liberando IL-22 protectora y expresando IL-17 e IFN- γ que inducen inflamación en modelos murinos de EII innata como la colitis inducida por *Helicobacter hepaticus* o por la administración de un anticuerpo agonista anti-CD40 (Annunziato *et al.*, 2015).

A pesar de la idea de autoinmunidad mencionada, es evidente que cada tropomiosina de cada especie de pescado tiene particularidades que la hacen inmunológicamente única (Santiago *et al.*, 2012). Clínicamente, hay pacientes que están sensibilizados solo a la tropomiosina de moluscos y no a la tropomiosina de crustáceos (Taylor, 2008). Asimismo, la especificidad dentro del grupo de las tropomiosinas también se puede observar mediante pruebas *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal TM311 (IgG1) obtenido frente a la tropomiosina de pollo (Sigma-Aldrich) reconoce epítopos comunes en las tropomiosinas de vertebrados y en las de algunos invertebrados, tales como caracoles y moluscos bivalvos, pero no en crustáceos ni cefalópodos (Sereda *et al.*, 2010) (confirmado también en el apartado [4.4.1.4](#)).

En este tercer estudio experimental, nuestra primera hipótesis estaba basada en el caso clínico mencionado anteriormente del paciente con alergia al marisco que amplió sus síntomas y presentó positividad a la tropomiosina reconociendo algunas tropomiosinas de pescado. Sorprendentemente, nuestros resultados demostraron que los cinco pacientes con IgE específica frente a gamba, cuyo alérgeno principal es la tropomiosina, no reaccionaron de forma cruzada con la tropomiosina de pescado. Aun así, cinco de los nueve pacientes restantes con síntomas asociados al pescado y con síntomas concomitantes con marisco presentaron la banda de IgE coincidente con el peso molecular de la tropomiosina (Tablas 14 y 22). Un reciente estudio demostró que la tropomiosina probablemente no sea un alérgeno principal del marisco en España ya que solo 21 de los 60 pacientes con alergia al marisco estudiados por los autores resultaron positivos empleando pruebas cutáneas realizadas con tropomiosina purificada de camarón marrón (*Farfantepenaeus aztecus*) (Pen a 1) (López-Matas *et al.*, 2016). Aunque no observaron reactividad cruzada entre la tropomiosina alérgica Pen a 1 y el extracto de *Anisakis in vivo*, se demostró la existencia de correlación positiva entre la sensibilización a *Anisakis* y

gambas (López-Matas *et al.*, 2016). Esta asociación coincide con lo observado en nuestros 14 pacientes alérgicos a mariscos, de los cuales 11 estaban sensibilizados frente a *Anisakis*. Estos autores consideraron que la tropomiosina no estaba implicada en esa asociación debido al bajo reconocimiento de la tropomiosina por los pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Asturias *et al.*, 2000a). Ninguno de los sueros de pacientes con anisakiosis gastroalérgica reconocieron la tropomiosina de *Anisakis* y solo un 13% de los pacientes con una posible anisakiosis la reconocieron. Es por ello que la tropomiosina no es considerada un alérgeno importante para el diagnóstico de la sensibilización a *Anisakis* (Gamboa *et al.*, 2012; Martínez-Aranguren *et al.*, 2014).

La segunda hipótesis que se propuso en este tercer estudio realizado por nosotros fue que algunos pacientes con síntomas gastrointestinales recurrentes tras la ingesta de pescado podrían estar sensibilizados a la tropomiosina. Todos los pacientes que presentaban estos síntomas (Pacientes 14 al 19, Tabla 22) mostraron bandas intensas de IgE frente a proteínas de peso molecular idéntico al de la tropomiosina (entre 25-37 kDa) identificadas con el anticuerpo monoclonal TM311 (Sigma-Aldrich). Una hipótesis propuesta para la ausencia de alergenicidad de las tropomiosinas de vertebrados es su fragmentación durante la digestión en péptidos más cortos que las tropomiosinas de los invertebrados (Mikita y Padlan, 2007). Pero en nuestro caso, los problemas de permeabilidad gastrointestinal podrían ser la razón de la presencia de IgE anti-tropomiosina de pescado, ya que la alergia alimentaria puede estar relacionada con un exceso de permeabilidad en las uniones epiteliales gastrointestinales (Vickery *et al.*, 2011). De hecho, como se ha comentado anteriormente la EII era común tras la ingesta de tilapia en pacientes alérgicos a este pescado (Liu *et al.*, 2013).

En cuanto a nuestros pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* y su relación con la positividad de la tropomiosina de pescado, es improbable que su sensibilización primaria frente a *Anisakis* se deba a la tropomiosina de *Anisakis* (Asturias *et al.*, 2000a) ya que las proteínas que reconocen en la inmunotransferencia, alrededor de 37 kDa, coinciden exactamente con el peso molecular del alérgeno principal Ani s 13 (hemoglobina). Además, como ya se ha indicado, la tropomiosina de *Anisakis* es reconocida alrededor de 75 kDa en forma de dímero (ver apartado [4.4.1.4.](#)).

Los isotipos IgG4 e IgA se consideran anticuerpos protectores porque son capaces de competir inhibiendo la unión de la IgE al alérgeno (Flicker y Valenta, 2003). La IgA se secreta en el lumen intestinal y tiene funciones de protección contra patógenos virales y bacterianos manteniendo la homeostasis de la flora intestinal (Fagarasan y Honjo, 2003). La IgG4, además de su capacidad para reducir la inflamación alérgica, inhibe la presentación de los alérgenos a los linfocitos T (Ozdemir *et al.*, 2011). La interpretación de nuestros resultados es limitada debido a la falta de datos. Sin embargo, cabe destacar que la IgG4 no fue detectable frente a bacalao, siendo este uno de los extractos con más resultados positivos en el caso de la IgE, pero sí se observó en los seis sueros estudiados contra el emperador. La IgG4 frente a la tropomiosina no estuvo tampoco presente frente a las especies de peces que resultaron positivas para la IgE en el caso mencionado anteriormente de un paciente alérgico a la tropomiosina (ver apartado [4.4.1.4.](#)). La banda correspondiente de IgA anti-tropomiosina estaba presente en más especies pero no pudimos reconocer ningún patrón de protección teniendo en cuenta los limitados datos clínicos disponibles. Hay dos posibles explicaciones: la primera es la ausencia de IgA

con presencia de síntomas, en donde no hay protección, como por ejemplo, el paciente 16 a la lubina. La segunda se subdivide en dos: la presencia IgA con presencia de síntomas (la IgA es insuficiente para bloquear todos los epitopos de unión a IgE, por ejemplo, el paciente 7 con bacalao o el paciente 16 con bonito) o sin presencia de síntomas (la IgA es suficiente para evitar la unión a IgE). En el estudio anterior (ver apartado [4.4.1.4.](#)), el paciente que estudiamos también presentó IgA frente a emperador, bonito y atún, y se sospechó que la ausencia de este isotipo era responsable de los síntomas digestivos.

Los puntos fuertes de este tercer estudio fueron, por un lado, el mayor número de pacientes en esta serie específica, y el diseño, ya que incluyó una batería predeterminada de extractos de diferentes especies de peces que se extienden más allá de las mencionadas como sospechosas de ser alergénicas por los propios pacientes. Por otra parte, la inmunotransferencia con los extractos totales fue la única técnica utilizada debido a que no se disponía de tropomiosinas recombinantes o purificadas de cada uno de los peces. Este estudio inicial debe ser completado con estudios de proteómica y otras técnicas inmunológicas para definitivamente asignar a la tropomiosina un nuevo papel como un panalergeno del pescado. Otra limitación del estudio fue la falta de recursos para completar los resultados del boquerón y todas las determinaciones de IgG4 e IgA.

La tropomiosina es una proteína estable y no sabemos por qué los extractos comerciales empleados en las pruebas cutáneas no fueron capaces de demostrar la sensibilización observada mediante inmunotransferencia. Escasa cantidad en los extractos, interacciones inactivantes dentro del extracto (proteína-proteína, proteína-lípido, proteína-glúcido) o inhibición por otras clases de inmunoglobulinas, son algunas posibilidades. Como se mencionó en la introducción de la presente memoria, unos resultados negativos obtenidos mediante pruebas cutáneas con extractos comerciales de pescados no sirven para descartar posibles mecanismos alérgicos (Barbarroja-Escudero *et al.*, 2016; Chikazawa *et al.*, 2015). Algunos alérgenos del pescado como el colágeno se han subestimado debido a los problemas de solubilidad que afectaban significativamente a los resultados de las pruebas cutáneas (Kobayashi *et al.*, 2016).

En los tres estudios mencionados se presenta una reactividad cruzada entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados y síntomas tras la ingesta de pescado en ausencia de inmunoglobulinas protectoras.

Por otro lado, el dogma clásico de la ausencia de alergenicidad de las tropomiosinas de vertebrados se ha demostrado principalmente en alimentos cárnicos (Ayuso *et al.*, 1999). Mediante dot-blot empleando tropomiosinas de vaca, cerdo, pollo y conejo, estos autores indican que solo dos de los 57 pacientes estudiados resultaron ser positivos a la tropomiosina (pollo y cerdo). Sin embargo, al analizar las figuras incluidas en el artículo, también se observan sombras suaves para la tropomiosina del pollo en otros tres pacientes que además presentan el mismo patrón de inmunorreconocimiento de la IgE frente al pollo que el paciente que resultó ser positivo a la tropomiosina de pollo. Entre los 57 pacientes alérgicos a la carne estudiados por Ayuso *et al.*, (1999), tres afirmaron presentar síntomas tras la ingesta de carne de cerdo (uno positivo a tropomiosina) y 23 tras la ingesta de pollo (cuatro positivos a tropomiosina), por lo que la importancia de la tropomiosina podría ser clínicamente mayor en el extracto de cerdo (un paciente positivo a tropomiosina de tres con síntomas) que en el de pollo (cuatro pacientes positivos a tropomiosina de 23 con síntomas).

En cuanto a los pescados, las parvalbúminas siguen siendo consideradas los alérgenos principales. Sin embargo, han sido descubiertos muchos otros alérgenos como enolasas, aldolasas y gelatina de pescado, así como otras proteínas no identificadas (Kuehn *et al.*, 2014). El componente β' de la vitelogenina del caviar de salmón chum (*Oncorhynchus keta*) se ha añadido también a la base de datos de alérgenos [WHO/IUIS](#) así como la tropomiosina de tilapia, mencionada anteriormente. En los pacientes alérgicos al pescado todavía no podemos afirmar que la tropomiosina sea un potencial panalérgeno porque los únicos estudios existentes, en los que se basa la hipótesis formulada en este capítulo, no son suficientes. Se deben realizar estudios con más pacientes alérgicos empleando técnicas moleculares avanzadas, como espectrometría de masas, para verificar que la tropomiosina está involucrada.

Sin embargo, los nuevos datos experimentales y clínicos nos dejan sin respuesta a la pregunta de por qué una molécula de tropomiosina con semejante similitud con las tropomiosinas humanas es inmunogénica, independientemente del isotipo de inmunoglobulina producido. Por un lado se podría pensar en un proceso de tolerancia inducido para evitar una posible reacción de autoinmunidad, como ya se ha discutido previamente, y el otro enfoque consistiría en poner de manifiesto otra evaluación de la antigenicidad independiente de la similitud de secuencia entre las tropomiosinas.

Como se mencionó en nuestra hipótesis, dentro de los vertebrados, los peces están más cerca de los invertebrados en el árbol filogenético. Esto generalmente debería estar relacionado con una mayor probabilidad de alérgenicidad de sus tropomiosinas en comparación con las tropomiosinas de la carne. La estructura tridimensional y los aspectos conformacionales de las proteínas son de extrema importancia en su reconocimiento por los anticuerpos y podrían explicar cómo pequeñas diferencias en las secuencias de aminoácidos pueden dar lugar a una pérdida de alérgenicidad. Nuestro estudio *in silico* de las tropomiosinas sugirió que un mayor porcentaje de plegamiento en hélice alfa de las tropomiosinas de vertebrados podría ser la responsable de la falta de alérgenicidad (ver apartado [4.1.3](#)). Además, se comprobó que la tropomiosina del atún compartía con las tropomiosinas de invertebrados una baja probabilidad de plegamiento en hélice alfa. Otro reciente estudio *in silico* descubrió la presencia de un epitopo lineal de la tropomiosina alérgica del camarón marrón (*Farfantepenaeus aztecus*) (invertebrado) en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (vertebrado) (Minkiewicz *et al.*, 2015). Estos autores afirmaron que una proteína que contiene epitopos lineales de otros alérgenos en sus secuencias es candidata a ser alérgica pero la ausencia de epitopos conocidos no asegura que esta proteína no sea un alérgeno. Lo que es extremadamente interesante es que, tanto en este estudio como en el realizado por nosotros, ambos *in silico*, se considera a las tropomiosinas de los peces como candidatas a ser alérgicas.

Además, es preciso recordar, que la mayoría de los epitopos de unión a IgE son conformacionales (Arnon y van Regenmortel, 1992) y, aunque los epitopos B conformacionales de la tropomiosina no han sido tenidos en cuenta debido a su sencillo plegamiento en hélice alfa, éstos existen y, experimentalmente, se ha demostrado que las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados comparten algunos de ellos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal N11 anti-tropomiosina de la filaria *Achantocheilonema viteae* reconoció con elevada intensidad también las tropomiosinas de: pulpo, perca y pollo y las del abadejo de Alaska, salmón, gorrión, cerdo y ratón aunque con menor intensidad (Sereda *et al.*, 2010).

A continuación nos surge la pregunta de por qué no se ha pensado en esta hipótesis previamente o cuáles son las dificultades de la detección de la alergenicidad de las tropomiosinas del pescado. La alergia a la carne es rara y suele presentarse en niños. Este podría ser el motivo por el cual existen tan pocos estudios y tan pocas proteínas identificadas como alergénicas en la carne. Sin embargo, la alergia al pescado es padecida por el 0,2% de la población y su prevalencia se incrementa en aquellas regiones en las que existen más industrias de procesamiento de pescado o en las que su consumo es más elevado (Kuehn *et al.*, 2014). Como ya se ha mencionado, se están descubriendo nuevos alérgenos y panalérgenos del pescado como el colágeno (Kobayashi *et al.*, 2016), pero con demasiado retraso o dificultades debido a problemas fisicoquímicos, como fue en este caso, o a otros problemas de agregación o interacciones que enmascaran y complican la identificación de las tropomiosinas de pescado como alérgenos.

La tropomiosina, curiosamente, también se encuentra en las secreciones mucosas epiteliales de la dorada, del bacalao del Atlántico y del pez gato (Jurado *et al.*, 2015). En las secreciones mucosas epiteliales de la dorada hay una amplia variedad de bacterias, incluyendo las del género *Streptococcus* (Jurado *et al.*, 2015). Esto trae de nuevo el interesante hecho de que *S. pyogenes* (estreptococos del grupo A) expresan proteínas similares a la tropomiosina llamadas proteínas M. Aunque comparten residuos idénticos, éstos no están localizados en una región lineal debido a que ambas son estructuras en espiral y solo comparten los aminoácidos de las posiciones externas (Fischetti, 1989). Estas proteínas similares a tropomiosina podrían ser responsables de una sensibilización primaria, siendo también un punto de partida para nuevas investigaciones en el campo de la alergia alimentaria.

Por último, es preciso recalcar la idea de las modificaciones postraduccionales y cómo éstas afectan teóricamente a la superficie de la tropomiosina. Por ejemplo, la tropomiosina del cangrejo del barro *Scylla paramamosain*, que está O-glicosilada, no ve afectada su unión a la IgE de los pacientes alérgicos a este crustáceo por la presencia o ausencia de las glicosilaciones (Ruan *et al.*, 2013). Sin embargo, esas modificaciones son diferentes, no solo entre los grupos de vertebrados *vs* invertebrados, sino también entre especies diferentes dentro del mismo grupo. Como, por ejemplo, en el caso de las fosforilaciones, ya que se ha descrito que el bacalao del Atlántico y el músculo esquelético del tiburón presentan tropomiosinas que están fosforiladas, sin embargo, las de los salmónidos están desfosforiladas (Hayley *et al.*, 2008). Este hecho confiere una superficie y cargas específicas a cada especie y un reconocimiento diferente por parte de los pacientes alérgicos.

En conclusión, no sabemos exactamente si la detección de IgE frente a las tropomiosinas de vertebrados es algo verdaderamente inusual. Tampoco conocemos si los síntomas clínicos podrían ser debidos a este alérgeno o a otros debido a esa visión dogmática que ha dificultado la consideración de la tropomiosina de vertebrados como un posible alérgeno. Las tropomiosinas se presentan en múltiples isoformas con diferentes pesos moleculares debido a su capacidad de formar homo-oligómeros y existen varios estudios en los que las bandas de los alérgenos reconocidos por los pacientes no han sido identificadas (Kuehn *et al.*, 2014; Restani *et al.*, 2009). Por consiguiente, no deberíamos descartar la idea de la alergenicidad de la tropomiosina por el mero hecho de proceder de un vertebrado.

5.5. Hemoglobina de *Anisakis* (Ani s 13) recombinante vs nativa: su valoración como nuevo alérgeno de referencia para el diagnóstico

En este capítulo, la forma nativa de la hemoglobina de *Anisakis* (nAni s 13) mostró una mayor sensibilidad en su reconocimiento por parte de la IgE de los pacientes mediante ELISA indirecto que mediante el anterior método de ELISA captura, no siendo además reconocida por los pacientes que no estaban sensibilizados a *Anisakis*.

En primer lugar, estudiamos la secuencia de Ani s 13 *in silico* en búsqueda de posibles sitios de glicosilación ya que estudios previos demostraron la existencia de un reconocimiento diferencial entre el alérgeno Ani s 7 nativo [capturado por el anticuerpo monoclonal UA3] y el recombinante t-Ani s 7 por la IgE de ratas inmunizadas con L3 muertas de *Anisakis* (Anadón *et al.*, 2009). Los autores discutieron que el Ani s 7 nativo capturado podría estar siendo reconocido por anticuerpos con reactividad cruzada frente a epítomos comunes como O-glicanos, presentes en los antígenos resistentes a proteasas de larvas muertas de *Anisakis*. Estos O-glicanos parecen ser responsables de reacciones cruzadas en el diagnóstico serológico de la anisakiosis humana ya que tras su eliminación del alérgeno Ani s 7, los sujetos control no presentaron niveles positivos de IgE e IgG1 pero los pacientes alérgicos continuaron reconociendo el Ani s 7 deglicosilado (Lorenzo *et al.*, 2000b). Hay tres tipos principales de glicosilación de proteínas en organismos eucariotas, N-glicosilaciones, O-NAcGal (tipo mucina) y O- β -NAcGlc (intracelular/nuclear). Los resultados de nuestros análisis *in silico* demostraron que no había probabilidad virtual de O-NAcGal glicosilación, pero sí que parece existir un sitio de O- β -NAcGlc glicosilación en el primer dominio de la hemoglobina (Thr 70) con baja probabilidad y una N-glicosilación (Asn 217) compartida por otras hemoglobinas de nematodos cercanos como *Ascaris suum* (De Baere *et al.*, 1992). Por el contrario, la sustitución de la asparagina N-terminal en la hemoglobina de *Ascaris* por serina en Ani s 13, evita que exista la glicosilación presente en la hemoglobina de *Ascaris*. Sobre la mutación C175Y presente en la hemoglobina recombinante (rAni s 13), se conoce la formación de enlaces disulfuro intra- e intermoleculares en otras hemoglobinas interviniendo en el mantenimiento de la estructura cuaternaria correcta y del mantenimiento del hierro del grupo hemo en su estado ferroso (Bykova *et al.*, 2006). Aunque el sistema de expresión en *E. coli* ha sido satisfactorio para la obtención de otras hemoglobinas como los dominios α y β de la hemoglobina humana o los dominios α de la hemoglobina del cocodrilo *Crocodylus siamensis* por su elevada pureza y rendimiento en comparación con otros sistemas de expresión (Kabbua *et al.*, 2014), esta mutación podría afectar al plegamiento correcto de la molécula afectando a los epítomos conformacionales de unión a IgE.

Cabe destacar que se estudió rAni s 13 con los mismos sueros de pacientes que en el estudio previo (ver apartado 4.3.) excepto para el paciente 319 (grupo AGA) y el paciente 10 (grupo UC-) debido a la limitada cantidad de suero para realizar el ELISA indirecto frente a rAni s 13. Observamos que rAni s 13 fue reconocido por cuatro pacientes del grupo AGA con valores elevados de IgE e IgG4 frente al Ani s 13 empleado en ELISA captura en el estudio mencionado anteriormente. Aunque las D.O. obtenidas de esos cuatro pacientes fueron consideradas positivas, el reconocimiento fue más limitado frente a rAni s 13. En un reciente estudio de alergenidad de alérgenos principales nativos vs recombinantes de ácaros del género *Dermatophagoides* empleando 30 pacientes con alergia a estos ácaros

(Sookrung *et al.*, 2016), los alérgenos recombinantes presentaron porcentajes de unión a IgE más bajos que los alérgenos nativos. Estos autores afirmaron que la menor capacidad de los alérgenos recombinantes rDer p 1 y rDer f 1 para unir IgE estaba relacionada con el hecho de que estos alérgenos tenían epítomos de unión a IgE estrictamente conformacionales. En nuestro caso, la hemoglobina de *Anisakis* es una proteína globular en la que los epítomos conformacionales han sido predichos previamente (ver apartado 4.3.6). Esto podría explicar por qué la IgE de los pacientes apenas reconoce rAni s 13. Por otro lado, la IgG1 de los ratones inmunizados con rAni s13 o con el extracto total de *Anisakis*, al igual que el anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina de *Anisakis* 4E8g, mostraron una reactividad importante frente a rAni s 13 mediante ELISA e inmunotransferencia, lo que sugiere que la IgG de los pacientes debería ser probada en futuros experimentos para confirmar la existencia de diferentes epítomos de unión a IgG/IgE. De acuerdo con esta afirmación, nosotros confirmamos que las hemoglobinas nativa y recombinante (Ani s 13) tienen epítomos similares de unión a IgG mediante inmunotransferencia de inhibición.

En este momento, nosotros habíamos obtenido una proteína recombinante que fue purificada bajo condiciones desnaturalizantes y que no fue reconocida por la IgE de los pacientes. A pesar de usar sistemas de expresión en eucariotas, a veces es necesario purificar los alérgenos nativos (Van Oort *et al.*, 2004) por ello, para averiguar si las glicosilaciones naturales y el plegamiento eran esenciales para la unión de la IgE a la hemoglobina, purificamos la forma nativa de Ani s 13.

Varios protocolos de purificación han sido desarrollados para purificar diferentes hemoglobinas extracelulares de invertebrados. Los primeros métodos desarrollados para purificar la hemoglobina de *Anisakis* estaban basados en precipitación con sulfato amónico (Suzuki y Ishida, 1979). Para la purificación de la hemoglobina del crustáceo *Artemia salina* se combinó ultracentrifugación con precipitación (Moens y Kondo, 1976) mientras que otros métodos han empleado simplemente ultracentrifugación, como en el caso de la purificación de la hemoglobina de *Ascaris* (Darawshe *et al.*, 1987). Esta última metodología fue la que escogimos para purificar la hemoglobina de *Anisakis* con el fin de preservar la estructura cuaternaria de Ani s 13.

Las fracciones obtenidas del pico 3 de la cromatografía contenían todos los tipos de oligómeros de Ani s 13, sin embargo la pureza de la hemoglobina se demostró mediante la observación de una banda monomérica a 37 kDa tras realizar SDS-PAGE. La presencia de oligómeros de mayor peso molecular también ha sido previamente descrita en *Anisakis* (Asaishi *et al.*, 1980b) y en *Ascaris* (Darawshe *et al.*, 1987). Los picos de elución y los ratios de absorbancia a 280 nm y 415 nm recuerdan a aquellos obtenidos en la purificación de la hemoglobina de *Artemia* (Moens y Kondo, 1978).

Tras confirmar que el eluido en el pico 3 era Ani s 13, mediante el anticuerpo monoclonal 4E8g y un suero humano positivo, realizamos un análisis estructural mediante ultracentrifugación analítica y microscopía electrónica.

La ultracentrifugación analítica confirmó que el octámero de 300 kDa de Ani s 13 nativo tenía un coeficiente de sedimentación $S_{20,w} = 12,1$ S. Este valor había sido calculado previamente como 12,4 S para la hemoglobina de las larvas de *A. simplex* y como 12,0 S para las de *A. physeteris* (Suzuki y Ishida, 1979). Aunque el coeficiente de sedimentación calculado en nuestras condiciones experimentales se

aproxima más al de *A. physeteris*, los valores son bastante similares. Aunque ambas especies pueden ser distinguidas morfológicamente (las larvas de tercer estadio de *A. simplex* tienen el ventrículo más largo que ancho y habitualmente sigmoideo) y presentan una suficiente diferenciación genética (Mattiucci y Nascetti, 2008), las hemoglobinas son unas proteínas muy conservadas que incluso presentan coeficientes de sedimentación similares entre los géneros *Anisakis* y *Ascaris*. El ratio de absorbancias (A_{415}/A_{280}) tan variable también se observó en la purificación de la hemoglobina de *Ascaris* (Darawshe *et al.*, 1987). Estos autores confirmaron que la fracción purificada no contenía contaminantes proteicos por lo que esta relación de absorbancia variable se debía al contenido de grupo hemo. Asimismo la hemoglobina de *Pseudoterranova*, que también es un nematodo anisákido, presentó diferentes relaciones hemo:proteína según variaba el número de bolsillos vacíos de hemo. De hecho, cuanto mayor era el número de bolsillos ocupados por el grupo hemo, mayor era la coloración marrón-rojiza de las larvas (Dixon *et al.*, 1993). Anis 13 no estuvo presente solo como octámeros, como en el caso de las hemoglobinas de *Ascaris* y *Pseudoterranova* (Minning y Goldberg, 1998), sino también en hexámeros, tetrámeros y dímeros con un bajo contenido en grupo hemo unido. Este hecho podría deberse a la ausencia de la cola C-terminal cargada en la secuencia de Anis 13, que sin embargo está presente en las hemoglobinas de los nematodos anteriormente mencionados. Esta cola parece servir como chaperona intramolecular facilitando el ensamblaje multimérico ya que si es eliminada, los agregados de hemoglobina y los monómeros se convierten en las formas mayoritarias (Goldberg, 1999).

La tinción negativa de Anis 13, indicó en las micrografías electrónicas la presencia de unas estructuras similares a las descritas para la hemoglobina nativa de *Ascaris* (De Baere *et al.*, 1992; Darawshe y Daniel, 1991). Ya que la mayoría de los oligómeros son tetrámeros y octámeros, las partículas de 300 kDa (hemoglobinas octaméricas) deben de tener un tamaño de aproximadamente 10 nm (Erickson, 2009) como sucede con el complejo Dam1 de 200 kDa (Wang *et al.*, 2007) y las partículas más pequeñas y abundantes observadas mediante microscopía electrónica deben de ser los tetrámeros. Las partículas más grandes son compatibles con proyecciones de hexámeros, octámeros y otros agregados. La mejora en la homogeneidad de los diferentes complejos en la muestra permitirá en futuros experimentos una mejor descripción estructural mediante criomicroscopía electrónica.

Las condiciones del tratamiento con peryodato (pH 4,5; 1 h) fueron elegidas cuidadosamente para evitar un daño adicional al polipéptido aparte de la eliminación de las glicosilaciones (Barletta *et al.*, 1998). Algunos autores reportaron rangos desde 12,5 mM a 100 mM de peryodato y tiempos de incubación desde 1h hasta toda la noche para las tiras de nitrocelulosa (Bugajska-Schretter *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 2015; Moneo *et al.*, 1997; Nayak *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2003). El tratamiento con peryodato afectó de manera importante a la unión del anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina 4E8g, apoyando la idea del reconocimiento de un epítipo O-glicosilado ya que las N-glicosilaciones son resistentes a la oxidación por peryodato (Gong *et al.*, 2015). Por el contrario, el peryodato no afectó al reconocimiento de la IgG1 de los ratones inmunizados con rAnis 13, debido a que estos anticuerpos se generaron en los ratones tras la inoculación de la hemoglobina recombinante expresada en *E. coli* y no glicosilada. Tampoco se vieron afectadas la IgE o la IgG1 tras una estimulación policlonal en humano y ratón.

Generalmente, los pacientes sensibilizados a *Anisakis* presentan anticuerpos con reactividad cruzada frente a antígenos de *Ascaris* (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014). Sin embargo, no es el caso para las

hemoglobinas de *Ascaris* y *Anisakis* cuando se determina la IgE de los pacientes sensibilizados frente a *Anisakis* (ver apartado 4.3.5). Estos resultados previos, son consistentes con los observados en las inmunotransferencias realizadas en este trabajo. Aunque las diferentes secuencias de hemoglobina tienen billones de años de evolución, las estructuras terciarias y cuaternarias funcionales son similares y adoptan una conformación clásica de plegamiento en forma de dominio globina (Hardison, 1996). Sin embargo, los epítomos de unión a IgE parecen haberse modificado en la hemoglobina de *Ascaris* (ver apartado 4.3.6), quizás para evadir la respuesta inmunológica del hospedador y la unión de IgE.

Por tanto, aunque Ani s 13 pertenezca a una familia de proteínas conservada, parece no ser un panalergeno. La monosensibilización frente a un panalergeno es poco frecuente siendo necesaria una exposición prolongada a la fuente del panalergeno que se suele correlacionar con un empeoramiento de los síntomas alérgicos (McKenna *et al.*, 2016). En el caso de *Anisakis*, el contacto con el parásito vivo es muy corto en el tiempo, como máximo 14 días (Pravettoni *et al.*, 2012), y los síntomas alérgicos suelen remitir a las pocas horas en la anisakiosis gastroalérgica (Daschner *et al.*, 2000). Además, los ratones inmunizados con rAni s 13 no generaron anticuerpos IgG1 que reconocieran la hemoglobina de *Ascaris*, lo que confirma que los epítomos inmunogénicos de Ani s 13 son específicos. Además, los ratones inmunizados con el extracto total de *Anisakis* reconocieron de forma cruzada proteínas de *Ascaris* pero con un patrón de pesos moleculares diferente del que se observó frente al extracto total de *Anisakis*.

Ani s 13, como ha sido demostrado anteriormente, presentó tasas de positividad elevadas en los pacientes sensibilizados a *Anisakis* mediante ELISA captura. Sin embargo, el nuevo ELISA indirecto mejoró los resultados en cuanto a sensibilidad ya que se utilizó directamente la proteína purificada en su forma nativa. La nueva técnica mostró una elevada correlación con los valores obtenidos con el ELISA captura previo. El reconocimiento de nAni s 13 también fue más elevado en los pacientes del grupo AGA y permitió diferenciar entre el grupo AGA y UC+ al igual que sucede con otros alérgenos como Ani s 1 (Cuéllar *et al.*, 2012b). Las ventajas de este método son: ahorro de tiempo/coste debido a la ausencia del paso de captura con el anticuerpo monoclonal, ausencia total de ruido basal (el punto de corte umbral de positividad del ELISA captura=0,293 *vs* ELISA indirecto=0,037) y el hecho de que ningún paciente no sensibilizado a *Anisakis*, C (N=22) o UC- (N=22), fue positivo. Estas ventajas se suman al incremento de sensibilidad del 9,1% en el grupo AGA y del 8,7% en el grupo UC+ (incremento combinado del 7,8% cuando analizamos las enfermedades alérgicas asociadas a *Anisakis*).

Las inmunotransferencias mostraron como dos pacientes del grupo AGA (3 y 319) no fueron detectados como positivos debido a la menor sensibilidad de esta técnica. El paciente 36 mostró un intenso y, a la vez, diferente perfil de bandas. Este paciente tenía una D.O. de 0,109 por ELISA y fue aparentemente negativo a Ani s 13 en el ELISA captura previo. La razón por este falso positivo podría ser la existencia de trazas de otras proteínas de *Anisakis* en el proceso de purificación o trazas de fragmentos de Ani s 13 con epítomos expuestos altamente reactivos para este paciente.

Para concluir, el uso combinado de nAni s 13 con los actuales alérgenos de referencia (Ani s 7 y Ani s 1) mejoraría la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la anisakiosis.

5.6. Clonación, expresión y caracterización inmunológica de la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis*

La reciente publicación del transcriptoma de *A. simplex* y *A. pegreffii* (Baird *et al.*, 2016) ha aportado a las bases de datos numerosas secuencias de proteínas de *Anisakis*. Por un lado, una proteína predicha bioinformáticamente como calponina de *Anisakis*, de 183 aminoácidos, ([A0A0M3JCG1](#)) presentó una identidad del 92% con la secuencia que obtuvimos de la miofilina de *Anisakis*, de 169 aminoácidos ([KX965682.1](#)). En relación con la arginina quinasa de *Anisakis*, existe una secuencia de 410 aminoácidos predicha bioinformáticamente ([A0A0M3JSD5](#)) que presentó una identidad del 100% con la secuencia que obtuvimos de la arginina quinasa de *Anisakis*, de 399 aminoácidos [KX965683.1](#), pero con la ausencia de 11 aminoácidos insertados entre las posiciones 194 y 195. Este hecho, probablemente, se deba a un error bioinformático porque la secuencia predicha no está revisada y ha sido anotada a partir de genes ortólogos en otras especies de nematodos próximos filogenéticamente a *Anisakis*, como *Caenorhabditis elegans*, en el que existen varias isoformas de esta proteína (Fraga *et al.*, 2015). Con respecto a otras secuencias de miofilina, existe una elevada identidad (79%) con las miofilinas de *A. suum* y *T. canis*, ambas de 187 aminoácidos; y en el caso de la arginina quinasa, las secuencias más parecidas son las de los nematodos *A. suum* y *T. canis*, ambas de 400 aminoácidos, con una identidad del 84% y del 83%, respectivamente.

En relación con el perfil electroforético de ambas proteínas recombinantes, algunas de las bandas que no se correspondían con los pesos moleculares de los oligómeros de la arginina quinasa de *Anisakis* (45 kDa monómero y 90 kDa dímero) como las de 25, 30 y 35 kDa, también han sido observadas en la purificación de la arginina quinasa recombinante del nematodo *Teladorsagia circumcincta* (Umair *et al.*, 2013). Solo la banda de 35 kDa no se observó de forma clara en el perfil electroforético de la arginina quinasa recombinante de este nematodo. Dado que estas bandas son reconocidas por el anticuerpo anti-arginina quinasa podrían ser fragmentos procedentes de su degradación proteolítica.

Por otro lado, sobre la miofilina, las inmunotransferencias consultadas en la bibliografía presentaron bandas de reconocimiento a 60 kDa y no solo a 20 kDa como cabría esperar debido al peso molecular del monómero de miofilina. Por ejemplo, en una inmunotransferencia de IgG con la miofilina recombinante de *E. granulosus* nueve de los 13 sueros de pacientes con hidatidosis mostraron la banda de 60 kDa y siete de estos también presentaron la de 20 kDa, habiendo dos pacientes, no considerados como positivos por los autores, que únicamente reconocieron la banda de 60 kDa y que además coincidían con aquellos sueros con un título de anticuerpos más bajo (Martin *et al.*, 1996). Asimismo, la IgG del suero de ratas infectadas con *C. sinensis* reconoció la banda de 60 kDa en una inmunotransferencia de la miofilina recombinante de *C. sinensis* (Huang *et al.*, 2012). Por último, en *Anisakis*, la miofilina ha sido detectada mediante espectrometría de masas en la banda de 56 kDa del extracto total de *Anisakis* y no en la de 22 o 15 kDa (Fæste *et al.*, 2014). Por tanto, la banda de 60 kDa de miofilina podría corresponderse con la forma oligomérica de trímero, o con un complejo entre miofilina y otra proteína de unos 40 kDa que podría ser la actina de *Anisakis*. Esta última posibilidad explicaría, en primer lugar, el peso molecular observado (~20 kDa la miofilina y ~42 kDa la actina globular de *Anisakis*) y en segundo lugar, que no exista reconocimiento por parte de la IgE de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* hacia la miofilina recombinante (ya que no hay actina de *Anisakis* en

el lisado bacteriano), asumiendo que estos pacientes estuvieran sensibilizados frente al complejo entre la miofilina y la actina de *Anisakis*. La formación del complejo miofilina-actina es factible ya que la miofilina, al igual que la calponina, presentan un dominio CH (homólogo a calponina) por el que adquieren su afinidad por la actina y se encuentran unidas a ella (Bañuelos *et al.*, 1998; Hodgkinson *et al.*, 1997). Además, observando en detalle las inmunotransferencias de la miofilina recombinante de *Anisakis* se distinguieron varias bandas en el suero C (IgG1 de ratón inmunizado con miofilina de *Anisakis*) de la Figura 86A que muestran la presencia de miofilina a 18, 36, 54 kDa (correspondientes con los distintos oligómeros); pero también otras bandas alrededor de estos pesos moleculares, que podrían ser complejos con trazas de proteínas bacterianas similares a actina. De hecho, la actina citoplasmática 2 (ACTG o gamma-actina) presente en el citoplasma de bacterias como *Pseudoalteromonas* sp., [bacterias gram negativas de la misma clase (*Gammaproteobacteria*) que *E. coli*], [WP_069019001.1](#) presenta una identidad del 95% con la actina de *Anisakis*.

La miofilina de *Anisakis* resultó ser una proteína inmunogénica al igual que las miofilinas de otros parásitos como *E. granulosus* del que siete (54%) de 13 pacientes con hidatidosis presentaron IgG específica frente su miofilina mediante inmunotransferencia (Martin *et al.*, 1996). Asimismo, 35 de 61 pacientes con esquistosomosis mostraron niveles positivos de IgG frente a la proteína similar a miofilina (*myophilin-like*) de *S. japonicum* mediante ELISA indirecto (Peng *et al.*, 2008). También la proteína similar a miofilina de *C. sinensis* fue reconocida por la IgG de pacientes infectados por el parásito mediante inmunotransferencia (Huang *et al.*, 2012). En este último trabajo, la proteína similar a miofilina recombinante fue reconocida también por la IgG de pacientes infectados por otros platelmintos como *S. japonicum*, *E. granulosus* y *T. solium*. Nuestros resultados demostraron una tenue reactividad cruzada de los anticuerpos murinos generados frente a la miofilina de *Anisakis* con los extractos de *Ascaris* y cerdo en una banda de 60 kDa que podría corresponderse con el trímero de miofilina o con el, anteriormente mencionado, posible complejo miofilina-actina.

Además, al comprobar que la IgG1 de los ratones inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* no reconocía una proteína del extracto total de *Anisakis* a 20 kDa (monómero de miofilina) sino una en torno a 60 kDa (Figura 84), intentamos inhibir estos anticuerpos incubándolos previamente con la propia miofilina recombinante. El experimento no resultó en la inhibición de la banda de 60 kDa lo que demuestra que la miofilina de *Anisakis* no se encuentra como monómero en el extracto o está presente pero en muy baja proporción. Hemos discutido anteriormente varias hipótesis que intentan explicar el reconocimiento de esta banda de 60 kDa en el extracto total de larvas de tercer estadio de *Anisakis*. Una primera hipótesis sería que el reconocimiento por parte de la IgG1 de los ratones inmunizados con miofilina de *Anisakis* se estuviera produciendo hacia la forma oligomérica de trímero en su forma nativa en el extracto. El trímero de miofilina se observó de forma tenue en la electroforesis de la proteína recombinante empleada en la inmunización de los ratones (Figura 82) por lo que el monómero y el dímero de miofilina podrían ser menos inmunogénicos que el trímero, siendo únicamente este último oligómero reconocido en el extracto total de *Anisakis*. Una segunda hipótesis, como se ha citado anteriormente, consistiría en el reconocimiento de un complejo de miofilina-proteína que podría ser la actina por su peso molecular y por su afinidad por la miofilina. En tercer lugar sería posible la hipótesis en la que la miofilina no estuviese representada en el extracto proteico de *Anisakis*,

bien por degradación proteolítica, por insolubilidad en la extracción o por baja expresión y, en su lugar, los anticuerpos murinos estuvieran reconociendo proteínas como la calponina. La calponina, de unos 30 kDa (Strauss y Murphy, 1996), suele formar dímeros (60 kDa) para unirse a los filamentos de actina y comparte con la miofilina dominios CH y repeticiones de tipo calponina (Bañuelos *et al.*, 1998), por lo que existe la posibilidad de reacciones cruzadas miofilina-calponina por los anticuerpos murinos anti-miofilina, pudiendo ser responsable de la banda a 60 kDa.

En las tres hipótesis formuladas, la ausencia de inhibición de los anticuerpos murinos por la incubación previa con la miofilina recombinante podría deberse a un incorrecto plegamiento de la miofilina recombinante que, aun siendo capaz de inmunizar induciendo una respuesta humoral, estos anticuerpos tendrían una menor afinidad por los epitopos de la proteína recombinante en comparación con los epitopos de las proteínas nativas. En los ensayos realizados con el alérgeno de la artemisa (*Artemisia vulgaris*) Art v 1 se demostró que, aunque Art v 1 recombinante era capaz de inducir una respuesta celular y humoral *in vitro*, la forma nativa tenía una mayor capacidad de unión de IgE que la recombinante y una mayor alergenidad *in vivo* (Schmid-Grendelmeier *et al.*, 2003). Nuestros resultados también mostraron una ausencia de reconocimiento de la miofilina recombinante por parte del suero de ratón inmunizado con el extracto total de *Anisakis* (AniM), ya que en ese suero debería haber anticuerpos frente a la miofilina nativa que, sin embargo, no son capaces de reconocer la miofilina recombinante. Esta pérdida de capacidad antigénica también se observó en los alérgenos recombinantes Der p 1, Der p 2, Der f 1 y Der f 2 en comparación con los alérgenos nativos (Sookrung *et al.*, 2016).

En las inmunotransferencias de la miofilina y de la arginina quinasa de *Anisakis*, se observaron bandas tenues similares para los mismos pacientes en ambas inmunotransferencias. Este hecho nos llevó a pensar en la existencia de trazas de proteínas bacterianas que permanecen tras la purificación de ambas proteínas recombinantes y que son reconocidas por la IgE de los mismos pacientes. Una de estas proteínas se corresponde con la banda de 12 kDa observada de forma tenue en la Figura 82 de la miofilina recombinante. Esta proteína fue reconocida por 12 pacientes de los 43 sensibilizados a *Anisakis*. Revisando en la bibliografía las inmunotransferencias de los alérgenos recombinantes de *Anisakis* producidos en *E. coli*, pudimos comprobar que había pacientes sensibilizados a *Anisakis* que también reconocían esta proteína de alrededor de 12 kDa. En la inmunotransferencia de IgE con rAni s 9 la banda de 12 kDa estaba presente en las tiras incubadas con el suero de dos pacientes (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008). Asimismo, en la inmunotransferencia de rAni s 10 se detectó una sombra de entre 14-16 kDa (Caballero *et al.*, 2011) y con rAni s 1 se observó también de forma difusa a 12 kDa en tres pacientes (Arrieta *et al.*, 2000). También merece la pena mencionar la banda de 40 kDa de la que no pudimos confirmar si se trataba de un dímero de miofilina ya que había seis (subrayados) de los 15 pacientes que también la reconocían cuando incubábamos sus sueros con la arginina quinasa recombinante.

En el caso de la arginina quinasa, se confirmó la positividad de un paciente del grupo UC+ y el reconocimiento de esta proteína por parte de la IgE de individuos no sensibilizados a *Anisakis* mediante ELISA indirecto e inmunotransferencia. Esta proteína es un panalérgeno con el que estamos en contacto habitual (crustáceos, gusanos de seda, cucarachas...), hecho que es necesario para que se produzca sensibilización (McKenna *et al.*, 2016). Además, en un estudio previo realizado con la arginina

quinasa Lit v 2 del langostino blanco (*L. vannamei*) (Pascal *et al.*, 2015), se demostró que el grupo control (pacientes que no presentaban sensibilización ni síntomas frente a los alérgenos del langostino) reconoció en mayor proporción (58,3%) la arginina quinasa que los pacientes alérgicos y tolerantes (sensibilizados asintomáticos) tras la ingesta de langostino (48,3% y 43,8%, respectivamente), hecho que concuerda con los resultados de IgE específica anti-arginina quinasa de *Anisakis* obtenidos en nuestros pacientes de los grupos UC- y C (no sensibilizados frente a *Anisakis*). El hecho de que los pacientes no sensibilizados a *Anisakis* presentaran mayores niveles de IgE anti-arginina quinasa de *Anisakis* no fue sorprendente ya que esta proteína se escogió para su estudio como posible marcador de exclusión de anisakiosis al igual que ocurre con el panalergeno Ani s 3 (tropomiosina) no siendo reconocido por ningún paciente con anisakiosis gastroalérgica (Asturias *et al.*, 2000b).

Finalmente, realizamos un análisis del patrón de inmunorreconocimiento de la IgE de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* frente al extracto total de *Anisakis* en paralelo a la miofilina recombinante de *Anisakis*. A pesar de las posibles variaciones de peso molecular entre la miofilina nativa y recombinante debido a glicosilaciones u otras modificaciones postraduccionales, 14 de los 20 pacientes del grupo AGA y nueve de los 23 pacientes del grupo UC+ podrían estar reconociendo la miofilina nativa. Sería necesario un análisis proteómico para confirmar qué alérgeno de alrededor de 60 kDa de *Anisakis* es reconocido por estos pacientes. En el trabajo de Fæste *et al.*, (2014) la banda que presentó más intensidad de reconocimiento por los pacientes fue la de 55,5 kDa y curiosamente a 56 kDa en el extracto se encontró la miofilina entre otras proteínas como la glutamato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, Hsp60, fosfoglucomutasa 1, disulfuro isomerasa, fosfoproteína fosfatasa-2A, plastina-2, *etc.* De este grupo de proteínas la disulfuro isomerasa (tioredoxina) y el factor de iniciación 3 son alérgicas en la polilla india de la harina *Plodia interpunctella* (Plo i 2) y en la mosca *Forcipomyia taimana* (For t 2), respectivamente. Por ello, aunque cabe la posibilidad de que esa banda a 60 kDa pueda corresponder a cualquier proteína con ese peso molecular, el suero de los ratones inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* empleado como control reconoció la misma banda (60 kDa) que los pacientes frente al extracto de *Anisakis*.

En resumen, hemos amplificado y secuenciado los genes de la miofilina y la arginina quinasa de *Anisakis* por primera vez realizando un análisis mediante inmunotransferencia con 43 pacientes sensibilizados a *Anisakis* frente a las dos proteínas recombinantes. De ellos solo un paciente UC+ reconoció la arginina quinasa recombinante de *Anisakis* y ninguno la miofilina mediante inmunotransferencia y ELISA indirecto. Los pacientes no sensibilizados a *Anisakis* (UC- y C) fueron los que presentaron niveles de IgE más elevados frente a la arginina quinasa de *Anisakis*, presentando diferencias significativas con los pacientes sensibilizados (AGA y UC+). Es por ello que en estas condiciones experimentales, la miofilina y la arginina quinasa no han podido ser consideradas alérgenos de *Anisakis*, sin embargo son necesarios más estudios para la miofilina ya que el suero de los ratones inmunizados con la miofilina recombinante de *Anisakis* reconoció la misma banda (60 kDa) que los pacientes sensibilizados frente al extracto de *Anisakis*.

5.7. Estudio de la reactividad cruzada entre *Anisakis simplex* y otros invertebrados: el papel de la tropomiosina

Anisakis simplex es un nematodo parásito cuya patogenia está vinculada a las reacciones alérgicas que origina en los seres humanos infectados por la ingesta de pescado crudo o poco cocinado. Los métodos de diagnóstico de rutina de *Anisakis* mediante ImmunoCAP® (serológico) o mediante pruebas cutáneas (*in vivo*) son, en cierta medida, falsamente positivos en individuos sanos. En estudios previos realizados en España, se detectaron porcentajes de positividad a *Anisakis* en sujetos sanos del 27,4% (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l) (García *et al.*, 1997); 23,3% (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l) (Del Pozo *et al.*, 1996); 22,1% (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,7$ kU/l) (Del Rey Moreno *et al.*, 2006); 19% (pruebas cutáneas) (Daschner *et al.*, 2000); 3,2% de 789 pacientes alérgicos a los ácaros del polvo, 25% de 16 pacientes alérgicos al marisco y 8,3% de 36 pacientes alérgicos a los ácaros y al marisco al mismo tiempo (pruebas cutáneas) (López-Matas *et al.*, 2016), del 13,1% (pruebas cutáneas y/o IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,7$ kU/l) (Fernández de Corres *et al.*, 2001) y del 12,4% (ELISA captura con el anticuerpo monoclonal UA3) (Puente *et al.*, 2008). En estudios realizados en otros países también se detectó positividad a *Anisakis* por distintos métodos en sujetos sanos: Suecia - 20,3% de sujetos alérgicos a ácaros del polvo (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l) (Johansson *et al.*, 2001); Japón - 10% (IgE específica frente a proteínas ES de *Anisakis* medida mediante AlaSTAT®) (Kasuya y Koga, 1992); Marruecos - 5,1% (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l) (Abattouy *et al.*, 2012); Korea - 5% (ELISA indirecto) (Kim *et al.*, 2011) y Noruega - 0,4% (IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l) (Lin *et al.*, 2014). Es por ello que nos preguntamos qué organismos son los que inducen una sensibilización cruzada frente a *Anisakis* y si la tropomiosina como panalergeno está siendo reconocida.

En 1981, se consiguió purificar una proteína termoestable de 37 kDa que resultó ser el alergeno principal del camarón (Hoffman *et al.*, 1981). Además, se conocía que los pacientes alérgicos al camarón presentaban IgE específica frente a otros crustáceos como cangrejo, langosta y cangrejo de río (Daul *et al.*, 1987). Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando se identificó a la tropomiosina como alergeno principal del marisco (Shanti *et al.*, 1993). Con respecto a *Anisakis*, se conocía la existencia de proteínas de entre 30 y 40 kDa, entre las que podría encontrarse la tropomiosina, compartidas por *Chironomus*, *Blatella germanica* y *A. simplex* que ocasionaban reacciones cruzadas en pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Pascual *et al.*, 1997). Aunque no fue hasta 1999 cuando, finalmente, la tropomiosina fue considerada un panalergeno de invertebrados como crustáceos, arácnidos, insectos, moluscos, nematodos, *etc.* (Reese *et al.*, 1999). Por ello, la inclusión de los organismos del estudio se basó en que todos ellos eran invertebrados de nuestra región relacionados con la aparición de procesos alérgicos en los que podría existir sensibilización frente a la tropomiosina. Además, se incluyó el atún como vertebrado debido a que la tropomiosina de la tilapia mozambiqueña (*Oreochromis mossambicus*) es considerada alérgica (Liu *et al.*, 2013).

Escogimos en primer lugar un criterio de positividad para la evaluación inmunológica de nuestros pacientes partiendo de la detección de IgE frente a *Anisakis*. Establecimos el umbral de positividad o punto de corte basado en la clasificación clínica de los pacientes, ya que con la media de los controles sumada a tres desviaciones estándar (M+3SD) obtuvimos el máximo número de verdaderos positivos y

el mínimo de falsos positivos. Aun así no se obtuvo el 100% de positividad en los pacientes del grupo AGA y UC+ ni un 0% en los UC- y en sujetos control (C) ya que un paciente AGA y ocho UC+ resultaron negativos; y tres pacientes UC- y un sujeto control, positivos. En realidad, los pacientes del grupo UC- son los verdaderos negativos a *Anisakis* ya que los controles no han tenido síntomas previos, ni tienen urticaria, pero no sabemos si alguno de ellos ha tenido contacto con el parásito. Como hemos observado anteriormente, al emplear el extracto total de *Anisakis* y no un alérgeno particular del parásito, cabe la posibilidad de la existencia de falsos negativos (pacientes AGA y UC+) por la menor concentración del alérgeno particular sensibilizante en el extracto (Aalberse *et al.*, 2013) y de falsos positivos (pacientes UC- y C) por reacciones cruzadas con proteínas presentes en el extracto.

En nuestro estudio observamos que los niveles de IgE, IgG, IgG4 e IgA frente al extracto total de *Anisakis* eran claramente diferenciables cuando separábamos a los pacientes por grupos: AGA>UC+>UC->C. Este perfil, ya había sido observado previamente en el estudio de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 (Cuéllar *et al.*, 2012b). Asimismo se conocía que los pacientes diagnosticados de AGA presentaban niveles más elevados de IgE e IgG4 específicas frente al extracto total de *Anisakis* que los pacientes UC+ (Daschner *et al.*, 2014).

Cuando comparamos los niveles de IgE obtenidos frente a *Anisakis* con los niveles de IgE frente a los demás organismos, observamos que, en la mayoría de ellos, no se superaba una D.O. de 0,100; únicamente algunos pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), como el 33, 36 o 28, superaron esos niveles mostrando una fuerte reactividad cruzada con, al menos, tres de los organismos analizados. Por ello, aunque observemos porcentajes de hasta el 100% de reactividad cruzada entre *Anisakis* y cangrejo de río, almeja y atún; no debemos olvidar que la positividad por ELISA de un suero se ha establecido con el criterio M+3SD, pudiendo ser positivos pacientes con muy bajas D.O. si los pacientes control presentan D.O. especialmente bajas. Por ello, para el cálculo del porcentaje de reacción cruzada lo único que se tuvo en cuenta fue la positividad compartida entre los extractos, no el nivel de IgE frente a cada uno de ellos. Por último cabe destacar que la positividad por ELISA de la IgE del suero de un paciente frente a un determinado extracto no necesariamente indica la presencia de síntomas alérgicos tras el contacto con el organismo fuente del extracto. De hecho, más del 20% de los pacientes con IgE específica o pruebas cutáneas positivas frente un alérgeno no presentan síntomas alérgicos (Cramer, 2013).

En nuestro estudio se demostró la existencia de un porcentaje de reactividad cruzada superior al 60% entre los extractos de *Anisakis* y los nematodos parásitos, artrópodos domésticos y mariscos crudos estudiados. Varios estudios han documentado la reactividad cruzada de IgM y diferentes subclases de IgG entre *Anisakis* y otros nematodos empleando sueros de ratones o conejos inmunizados con el extracto bruto o con las diferentes fracciones y productos de las larvas de *Anisakis* (Iglesias *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 2004; Perteguer *et al.*, 2003a). También se han realizado estudios con sueros humanos que demostraron la reactividad cruzada de las IgE entre *Anisakis* y otros nematodos (Perteguer *et al.*, 2003b) o artrópodos (Asturias *et al.*, 2000a; Pascual *et al.*, 1997). Además, la tropomiosina parece jugar un papel importante en la reactividad cruzada ya que los ratones que inmunizamos con la tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) presentaron inmunoglobulinas del isotipo IgG1 capaces de reconocer tropomiosina de nematodos, crustáceos, moluscos, pescados y pollo. Sin embargo, sería necesario

analizar la clase IgE para confirmar la hipótesis en la que *Anisakis* podría, mediante el contacto con su tropomiosina, sensibilizar frente a otros organismos o viceversa. El conocimiento de estas reacciones cruzadas de la IgE sería de gran interés en el diagnóstico de las alergias frente a algunos de los organismos mencionados. También se demostró con la inmunización de los ratones que las tropomiosinas de invertebrados (*Anisakis*, *Ascaris*, nécora, langostino, almeja) y vertebrados (pollo, salmón o rape), no consideradas estas últimas tradicionalmente como alergénicas, no presentan epitopos tan diferentes entre ellas pudiendo ser responsables de reacciones cruzadas, al menos, en el caso del isotipo IgG1 murino. Por el momento desconocemos si los epitopos de unión a IgG, que aparentemente son similares entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados son los mismos a los que se unen las IgE, pero pensamos que futuros estudios *in silico* como el realizado previamente con la hemoglobina y estudios experimentales como este, serán de gran interés para aclarar el mecanismo de reconocimiento de los alérgenos por parte de la IgE. Los resultados obtenidos de estos experimentos podrían ser incorporados a una base de datos en la que hubiera información acerca de predicciones bioinformáticas sobre los alérgenos conocidos del *Anisakis*, con el fin de poder estudiar mejor sus reacciones cruzadas y las respuestas alérgicas frente a distintos organismos de nuestro entorno.

Los pacientes con urticaria crónica presentaron niveles superiores de IgE frente a todos los extractos de nuestro estudio comparado con los que no tenían urticaria crónica. Asimismo, se ha observado que los pacientes con urticaria crónica presentan un fenotipo diferente de atopia, estando sensibilizados con mayor frecuencia a artrópodos (Daschner *et al.*, 2010a). Aunque la elevación de los valores de IgE frente a todos los extractos en los UC+ podría deberse a una posible reactividad cruzada con *A. simplex*, el hecho de que los pacientes del grupo UC- también presenten niveles elevados de IgE frente a todos los organismos estudiados apoya la hipótesis de que los sucesivos contactos por ingesta de moluscos y crustáceos con alérgenos principales como la tropomiosina, o la inhalación de alérgenos de ácaros del polvo como Der p 1, 2, 3 y 10 (Fernández-Caldas *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2012) y de cucarachas como Bla g 1 y 2 considerados alérgenos principales y presentes en las heces, saliva, huevos y en el cuerpo de estos organismos (Sohn y Kim, 2012), podrían estar contribuyendo a la manifestación de la urticaria crónica en estos pacientes.

En relación a la reducción de la alergenidad de los extractos de pulpo y mejillón sometidos a cocción, un estudio demostró que este procedimiento reducía el número de bandas de IgE detectadas en el extracto de calamar mediante inmunotransferencia, aunque la banda de la tropomiosina (alérgeno principal) continuaba siendo reconocida con gran intensidad por la IgE de los pacientes alérgicos a este molusco (Yadzir *et al.*, 2010). Aunque la tropomiosina es el alérgeno principal de los moluscos (Taylor, 2008), su alergenidad y el perfil de inmunoglobulinas inducidas por la ingesta del alimento se ven afectados por su procesado (Vojdani, 2009). Las proteínas de los alimentos pueden reaccionar con glúcidos por el efecto del calor durante el cocinado (Reacción de Maillard) y formarse carbinolaminas que se deshidratan y se ciclan dando lugar a la aparición de nuevas glicosilaciones. Además en los alimentos que son procesados por calentamiento pueden seguir reaccionando y originándose AGEs exógenos (*Advanced Glycation End products* – productos finales de glicosilación avanzada) que son inmunogénicos, pro-inflamatorios, presentan efectos diabetogénicos y nefrotóxicos; y que también potencian el estrés oxidativo y la aterosclerosis (Vistoli *et al.*, 2013). En el caso de moluscos como la

vieira, las reacciones de la tropomiosina con glucosa, ribosa y maltosa incrementaron su reconocimiento por la IgE de 11 pacientes sensibilizados, empleando dot-blot y ELISA de competición con la tropomiosina purificada del molusco y sus diferentes glicosilaciones inducidas a 60°C en condiciones de laboratorio (Nakamura *et al.*, 2005). Por el contrario, en el calamar las reacciones de la tropomiosina con ribosa redujeron su alergenicidad en un estudio similar realizado con 14 pacientes sensibilizados (Nakamura *et al.*, 2006). Estos resultados contradictorios ponen de manifiesto la dificultad para el control de todas las variables al realizar los experimentos y la difícil comparación entre estudios debido a la existencia de multitud de tratamientos culinarios y métodos de procesado de estos alimentos.

El reconocimiento de la IgA e IgG, por el contrario, no se vio reducido frente a los extractos cocidos del pulpo y mejillón. Un estudio de IgA sérica mediante inmunotransferencia realizado en nuestro Departamento con 12 sueros de pacientes diagnosticados de AGA, UC+ y UC- y ocho controles, demostró que el 90% de todos ellos reconocía con gran intensidad una proteína de 50 kDa en el extracto de mejillón cocido (Paccione-Basmadji *et al.*, 2014). Un alérgeno de 50 kDa fue identificado en el calamar blanco (*Loligo edulis*) pero dejó de ser reconocido por la IgE de los pacientes tras la cocción (Yadzir *et al.*, 2010). Sería muy interesante que en el estudio de Yadzir *et al.*, (2010) se hubiera analizado la IgA para comprobar si el reconocimiento de IgE desaparecía pero manteniéndose el de la IgA. Con respecto a la IgG, en el apartado 4.5. observamos que la hemoglobina recombinante de *Anisakis* (rAni s 13) no era reconocida por la IgE de los pacientes pero, curiosamente, el anticuerpo monoclonal murino anti-hemoglobina 4E8g (IgG1), la IgG1 sérica de ratón inmunizado con rAni s 13 y la IgG1 sérica de ratón inmunizado con el antígeno total de *Anisakis* sí la reconocían.

Existen diferencias entre la respuesta inmunológica del ratón y el humano. Estas diferencias han sido recientemente revisadas desde el punto de vista de la respuesta alérgica, habiéndose encontrado, por ejemplo, que la tasa de respuesta en modelos murinos es casi del 100% pero en humanos es del 25% para un único alérgeno. Además el ratio IgG:IgE en suero es mucho más alto en ratones que en humanos atópicos, presentando los niños un ratio más bajo que si la inducción de la IgE tiene lugar en la edad adulta. Por último se ha observado que la respuesta de IgE en ratones es transitoria y en humanos dura muchos años (Aalberse *et al.*, 2016). Asimismo existen diferencias entre la IgG y la IgE. Se sabe que desde el contacto con el antígeno, la producción de IgG es anterior a la de IgE cuyo cambio de isotipo depende fundamentalmente de la presencia de IL-4. Aunque este es el mecanismo principal, se sabe que hay algunas células plasmáticas de memoria que producen IgE de baja afinidad ya que proceden de linfocitos B que han cambiado su isotipo directamente de IgM de baja afinidad a IgE sin haber pasado por la IgG (después del proceso de maduración de la afinidad); y por el contrario, también existen células plasmáticas que producen IgE basal de forma independiente de antígeno y con amplia especificidad. Es muy interesante el fenómeno de “*epitope spreading*” (propagación de epitopos) que sucede en paralelo a la marcha atópica (eczema-rinitis-asma) y en el que con el tiempo, el paciente 1) amplía el reconocimiento de su IgE a otros epitopos de la misma molécula de alérgeno, 2) reconoce moléculas parecidas del mismo organismo del que procedía el alérgeno sensibilizante y, finalmente, 3) produce IgE que reconoce epitopos de alérgenos de diferentes organismos (Aalberse *et al.*, 2016). Por todo ello sospechamos de una especificidad diferente de los anticuerpos IgG *vs* IgE o la existencia de epitopos de unión diferentes, pudiendo ser para la IgG un reconocimiento de epitopos más lineales que

para la IgE ya que no se ven afectados por la cocción ni por posibles defectos en el plegamiento de proteínas recombinantes en procariontas.

Nuestros resultados mostraron una tendencia de niveles más elevados de IgG en los sueros pertenecientes a los grupos UC- y C frente a los extractos de los artrópodos y moluscos; y niveles significativamente elevados de IgG en los sujetos del grupo control (C) frente a extracto de atún. La IgG, y en particular la subclase IgG1, se comienza a producir en los niños a los tres meses de vida incrementándose hasta los cinco años de edad (Schauer *et al.*, 2003). La IgG en concentraciones normales y frente a proteínas exógenas no se relaciona con síntomas clínicos, sino que es una respuesta fisiológica normal del sistema inmunológico (Lessof *et al.*, 1991). Existe un mecanismo denominado tolerancia oral que se refiere a una respuesta inmune inhibitoria frente a un antígeno que ha sido presentado previamente a través de las mucosas (Chase, 1946). Los antígenos alimentarios se detectan en sangre tras la ingesta y son fagocitados por células presentadoras cuyo resultado puede ser la producción de anticuerpos IgG o IgA. Los niveles de IgG sérica y la IgA secretora frente a estos antígenos deben estar en equilibrio ya que si no es así se puede potenciar la penetración epitelial de otras proteínas como alérgenos o toxinas (Vojdani, 2015). Con nuestros resultados únicamente podríamos afirmar que, frente al extracto de atún, la producción de IgG en sujetos control es mayor, por lo que parece proteger de la aparición de urticaria. Además se ha demostrado en un modelo murino de alergia alimentaria que la unión de la IgG a los receptores FcγRIIb inhibe la señalización de degranulación inducida por la IgE unida a los receptores FcεRI en (Oettgen, 2016).

Estudios previos nos han permitido conocer que los niveles de IgG4 no coinciden con los de IgE y, al igual que hemos mencionado en el caso de la IgG en conjunto, indican una exposición prolongada a un alimento u organismo cuando se aumenta la permeabilidad de la mucosa local. Por ejemplo, en los apicultores que son picados por abejas, más del 90% de su IgG sérica es de la subclase IgG4 (Aalberse *et al.*, 1983). Otro ejemplo clásico es la inmunoterapia, en la que hay un aumento en el ratio IgG4:IgG1 con el tiempo de exposición repetida al alérgeno (Gehlhar *et al.*, 1999). Hay laboratorios que miden la IgG4 sérica como método fiable para el diagnóstico de las alergias alimentarias basándose en observaciones realizadas a principios de los años 80 en las que la IgG4 parecía ser anafiláctica al igual que la IgE, induciendo la liberación de histamina. Sin embargo, se han encontrado resultados positivos para IgG4 frente a diferentes alimentos no indicando la presencia de alergia sino una exposición prolongada a los antígenos alimentarios (Stapel *et al.*, 2008). De hecho la IgG4 se encuentra elevada (>1,4 g/l; valores de referencia en adultos 0,052-1,250 g/l) en aproximadamente el 5% de la población normal (Vidarsson *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, se midieron los niveles de IgG4 frente a los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* entre los que se observó reactividad cruzada siendo el grupo de pacientes diagnosticados de AGA los que presentaron niveles más elevados. Está demostrado que los pacientes del grupo AGA presentan mayores niveles de IgG4 que los pacientes del grupo UC+ tanto frente al extracto total de *Anisakis* medidos mediante ImmunoCAP® (Cuéllar *et al.*, 2013) como a los alérgenos particulares Ani s 1 y Ani s 7 medidos mediante ELISA indirecto (Daschner *et al.*, 2014). Las larvas de *Anisakis* intentan invadir la mucosa intestinal liberando sus antígenos, entre los que se encuentran los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7. Este último alérgeno se considera marcador de contacto con el parásito (Anadón *et al.*, 2009) y justo

frente a él los pacientes UC+ parecen no presentar cantidades suficientes de IgG4, por lo que la IgG4 específica podría estar asociada con la protección frente a la urticaria crónica secundaria a la sensibilización por el parásito (Daschner *et al.*, 2014). Finalmente, en nuestros sujetos control no hubo positivos para IgG4 frente a *Anisakis* ni *Ascaris*, ya que se habían seleccionado sujetos que no presentaban urticaria ni síntomas asociados a la parasitación por *Anisakis* por lo que al no estar expuestos al parásito no habían podido generar IgG4. Es probable que si analizásemos la IgG4 de los pacientes y de los controles frente a los organismos no parásitos del estudio, encontrásemos, como ya hemos observado al analizar la clase IgG en su conjunto, unos niveles elevados de esta subclase de inmunoglobulina.

En cuanto a la IgA, el número de positivos frente a los extractos de moluscos estudiados fue muy bajo debido a que los niveles de IgA específicas fueron claramente superiores en los sujetos control y al realizar el cálculo M+3SD, pocos sueros superaron la absorbancia umbral de positividad. En un estudio realizado con pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, se detectaron menores niveles de IgA secretora en heces de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn que en los controles sanos frente a ovoalbúmina, harina de trigo y leche en polvo (Frehn *et al.*, 2014). Esto pone de manifiesto que la presencia de inflamación y daño intestinal ejerce un efecto negativo sobre la secreción de IgA. Por ello, la presencia de niveles más elevados de IgA en los controles que en los pacientes de los grupos UC+ y UC- nos llevó a formular dos hipótesis; por un lado, el valorar si la ingesta de moluscos por pacientes con urticaria crónica podría estar relacionada con la aparición de los síntomas, ya que presentaban más IgE y menos IgG e IgA específicas que los controles; y por otro lado, pensamos en la posibilidad de que los pacientes con urticaria crónica hayan eliminado estos moluscos de su dieta por miedo a sufrir una exacerbación o un nuevo brote al sospechar de alguno de estos alimentos. De este modo, no estarían expuestos a los antígenos de estos moluscos presentando niveles más bajos de IgA. Serían muy interesantes nuevos estudios con estos pacientes eliminando o estimulando el consumo de moluscos en su dieta y la evaluación clínica de su urticaria analizando también la relación entre la urticaria crónica y la enfermedad inflamatoria intestinal. Además, parece importante el papel de una proteína de 50 kDa del mejillón cocido ya que fue reconocida por la IgA del 90% de los 20 sueros del estudio realizado mediante inmunotransferencia anteriormente mencionado (Paccione-Basmadji *et al.*, 2014).

Debido a la aparente reactividad cruzada entre *Anisakis* y crustáceos (Asturias *et al.*, 2000a) sumado a la importancia de la tropomiosina en los pacientes alérgicos al marisco, estudiamos en detalle la reacción cruzada entre las tropomiosinas de *Anisakis* (Ani s 3) y camarón nórdico (*Pandalus borealis*) (Pan b 1) y los extractos totales de *Anisakis* y langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*). Dada la elevadísima identidad (97%) entre Lit v 1 y Pan b 1 fue posible utilizar la tropomiosina Pan b 1 recombinante en su lugar ya que no disponíamos de Lit v 1 recombinante.

Lo primero que observamos fue que Ani s 3 no era un alérgeno principal ya que fue reconocido por el 15,4% (menos del 50%) de los pacientes sensibilizados a *Anisakis*. La definición de alérgeno principal fue establecida por Marsh en 1975 e incluía como “principales” a aquellos alérgenos reconocidos por más del 90% de los pacientes sensibilizados al organismo del que procedía el alérgeno. Dos años más tarde, en 1978, Löwenstein cambió la definición incluyendo como alérgenos principales de un

organismo a todos los reconocidos por más del 50% de los individuos sensibilizados a la fuente del alérgeno (Breiteneder y Chapman, 2014). El hecho de que la tropomiosina de *Anisakis* no sea un alérgeno principal de *Anisakis* ya había sido detectado en otros estudios previos con porcentajes de reconocimiento del 13% (mediante inmunotransferencia fueron positivos ocho de 62 sujetos sin síntomas alérgicos tras la ingesta de pescado parasitado pero con IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l mediante ImmunoCAP[®]) (Asturias *et al.*, 2000a) o del 46% (mediante dot-blot fueron débilmente positivos 16 de 35 pacientes con síntomas de anafilaxia, angioedema, urticaria o síntomas gastrointestinales a las pocas horas de la ingesta de pescado crudo o poco cocinado y con IgE anti-*Anisakis* $\geq 0,70$ kU/l) (Caballero *et al.*, 2012). Aunque Ani s 3 fue reconocido con más intensidad que Pan b 1 por algunos pacientes sensibilizados a *Anisakis*, los niveles y el porcentaje de positivos en ambas eran bastante similares. Este hecho denotaba, sin entrar en detalles, una muy probable reactividad cruzada entre ambas tropomiosinas. Sin embargo, se observó que el porcentaje de reactividad cruzada entre Ani s 3 y Pan b 1 resultó ser de un 35% (siete de 20 pacientes positivos frente a alguna de las tropomiosinas, fueron positivos frente a ambas, indistintamente). Las tropomiosinas de ambos invertebrados comparten un 73% de identidad y un 85% de similitud de secuencia y aunque la tropomiosina es un panalérgeno, no significa que no haya especificidad estructural ya que esas pocas sustituciones aminoacídicas pueden modificar los epitopos de unión a IgE. En un estudio realizado en Noruega con 993 donantes de sangre sanos, se observó que solo cuatro resultaron positivos a *Anisakis* mediante ImmunoCAP[®] y de estos cuatro, solo uno resultó positivo a la tropomiosina de crustáceos, por lo que en este caso es probable que Ani s 3 esté siendo reconocido de forma cruzada con la tropomiosina de crustáceos (Lin *et al.*, 2014). De hecho parece bastante frecuente la especificidad de reconocimiento en tropomiosinas de moluscos *vs* crustáceos (Taylor, 2008). En un estudio realizado con 70 individuos sensibilizados al marisco, 25 (35,7%) estaban sensibilizados solo a crustáceos, 18 (25,7%) solo a moluscos y 27 (38,6%) a ambos (Wu y Williams, 2004).

Los pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-) presentaron niveles más elevados de IgE frente a la tropomiosina del camarón nórdico (Pan b 1) que los controles. Como vimos anteriormente, también presentaban niveles más elevados de IgE frente a todos los organismos estudiados pero lo que no sabemos es si los reconocen debido a que se trata de IgE específica frente a alérgenos de cada organismo o si la IgE se une a panalérgenos como la tropomiosina Pan b 1 reconociendo de forma cruzada a todos los organismos.

En el primer caso en el que existieran bajas cantidades de IgE específica frente a diferentes alérgenos de cada organismo, se ha demostrado que a bajas concentraciones de un alérgeno, la presencia de un segundo alérgeno incrementa la degranulación *in vitro* de basófilos de rata (Handlogten *et al.*, 2014), siendo este un mecanismo posible en la urticaria crónica. Estos basófilos son sensibilizados en el laboratorio con anticuerpos monoclonales IgE específicos frente a haptenos como el 2,4 dinitrofenil o el dansilo presentes en diferentes moléculas sintetizadas por los propios investigadores para el estudio del mecanismo de degranulación (Handlogten *et al.*, 2013a). Los pacientes UC+ o UC-, al presentar mastocitos sensibilizados por medio de IgE específicas frente a más organismos que los controles, podrían ser propensos a una más fácil degranulación ya que la mayoría de los organismos estudiados en esta memoria son frecuentes en la dieta y en el ámbito doméstico.

En el segundo caso, la existencia de IgE con reactividad cruzada, bien por reconocer panalergenos presentes en todos los organismos estudiados, o bien por ser IgE de baja afinidad, podrían ser mecanismos válidos. En el primer supuesto la IgE anti-Pan b 1 es significativamente mayor en los pacientes con urticaria que en los controles, ello podría explicar la observación de niveles más elevados de IgE frente a los extractos de los organismos completos que también contienen tropomiosina y podría estar siendo reconocida. En el segundo supuesto, la presencia de IgE de baja afinidad podría ser esencial para que se produzca el proceso de degranulación de los mastocitos y la consecuente urticaria. En un reciente estudio, se emplearon inhibidores selectivos de la región Fab de las IgE que reconocían epitopos de baja afinidad de un alérgeno tetravalente sintético, para estudiar el papel de la IgE de baja afinidad en el proceso de degranulación de los mastocitos. Empleando un modelo de degranulación de basófilos de rata (*in vitro*) y un modelo murino de alergia basado en la inflamación de la oreja de ratones con anafilaxia cutánea pasiva, se ha demostrado que si se inhibían selectivamente las IgE de baja afinidad por el alérgeno, no se producía la degranulación (Handlogten *et al.*, 2013b). De hecho, los parásitos como *Anisakis* realizan una estimulación policlonal (Daschner *et al.*, 2012) viéndose aumentados los niveles de IgE sérica total en mayor proporción que los de IgE específica (Daschner *et al.*, 1999). La mera presencia de IgE en el microambiente celular ejerce un potente efecto en el aumento de la densidad de los receptores FcεRI en la superficie de mastocitos y basófilos (Davies *et al.*, 2013; Oettgen, 2016; Rajakulasingam *et al.*, 1997) y, por consiguiente un descenso del umbral de señalización facilitando el desarrollo de procesos alérgicos o urticariales.

Como se mencionó anteriormente, la IgG frente a diferentes antígenos alimentarios y ambientales se detecta fisiológicamente en sujetos sanos; sin embargo el hecho de estar expuesto al antígeno no presupone la producción de la subclase IgG4. Aunque la IgG4 anti-*Anisakis* no se detectó en los sujetos del grupo control, esta sí se detectó (aunque sin presentar diferencias con el resto de grupos) frente al langostino, ya que los controles estaban expuestos habitualmente a los antígenos de este organismo por su ingesta más o menos habitual en la dieta. Lo sorprendente fue que al analizar los niveles de IgG4 frente a la tropomiosina, los sujetos control presentaran niveles más elevados que los pacientes de los grupos AGA, UC+ y UC-. Esto nos estaba indicando que la IgG4 anti-tropomiosina se comportaba como protectora frente a la urticaria, ya que los pacientes AGA presentan urticaria aguda y los UC+/UC- urticaria crónica. No es nuevo el papel protector de la IgG4 en la alergia mediante distintos mecanismos como la inhibición de la degranulación de los mastocitos por su unión con alta afinidad a receptores inhibidores FcγRIIb, o el bloqueo de la unión de la IgE al alérgeno por competición (Davies y Sutton, 2015); sin embargo, hay muy pocos estudios realizados en adultos con urticaria crónica en los que se haya medido la IgG4. Como hemos discutido previamente, en el caso de *Anisakis*, la IgG4 específica podría estar asociada con la protección frente a la urticaria crónica secundaria a la sensibilización por el parásito (Daschner *et al.*, 2014). Además encontramos un estudio realizado con 46 pacientes con urticaria crónica y 27 pacientes con prurito crónico generalizado asociado a la ingesta de alimentos. En este estudio, de los 45 pacientes con IgG4 positiva frente a algún alimento, las pruebas de provocación con los alimentos en cuestión no se asociaron con la urticaria y en los siete casos en los que también existía positividad en la IgE, los ratios IgG4:IgE fueron entre 3:1-20:1, destacando la importante cantidad de IgG4 específica medida mediante ImmunoCAP® (Antico *et al.*, 2011). Aunque

la función de la IgG4 específica frente a los alimentos no está clara, este estudio lo que demuestra es que la IgG4 no es patológica (Antico *et al.*, 2011). Nuestros resultados de IgG4 anti-tropomiosina son, por tanto, novedosos y coherentes en la asociación de la IgG4 con un posible papel protector en la urticaria crónica.

Por otro lado, los controles de nuestro estudio no presentaron IgA sérica frente a la tropomiosina, aunque frente al extracto total de langostino, la IgA de los sueros del grupo control fue la más elevada como sucedía frente a moluscos y ácaro pero no frente al cangrejo de río. Esto puede ser debido a que el consumo de cangrejo de río en la actualidad es más bajo que el consumo de langostino (*L. vannamei*) en España (3700 *vs* 150000 toneladas/año, respectivamente) (MAGRAMA, 2014; Souty-Grosset *et al.*, 2016) y por tanto el contacto con sus antígenos es menos probable.

De los 12 pacientes sensibilizados a crustáceos, concretamente los cuatro con niveles más elevados de IgE frente al extracto de langostino (*L. vannamei*), y positivos a la tropomiosina de langostino mediante inmunotransferencia, reconocieron Ani s 3 recombinante en ELISA, demostrando que la IgE de estos pacientes reacciona de forma cruzada con ambas tropomiosinas. En este caso, si solo tuviésemos en cuenta los pacientes sensibilizados a crustáceos, el porcentaje de reactividad cruzada entre Pan b 1 y Ani s 3 sería del 100% (4 de 4).

Además, observamos que la reactividad cruzada entre los extractos totales de *Anisakis* y langostino era más baja que la existente entre sus tropomiosinas, lo que indicaba que la reactividad cruzada entre estos organismos se debía principalmente a la tropomiosina y no a otras proteínas presentes en los extractos. De los 38 pacientes positivos al extracto de *Anisakis* (IgE mediante ELISA indirecto), solo dos pacientes (5%) fueron positivos frente al extracto de langostino, sin embargo de los seis pacientes positivos a langostino (IgE mediante ELISA indirecto), uno (17%) fue positivo frente al extracto de *Anisakis* por ELISA. Además, estos seis pacientes positivos a langostino presentaron IgE específica anti-*Anisakis* $\geq 0,35$ kU/l mediante ImmunoCAP[®] (Tabla 13). Esto apoya la hipótesis de que la positividad a langostino observada por ELISA pueda estar asociada a la positividad mediante InmunoCAP[®] a *Anisakis* contribuyendo a los falsos positivos que aparecen en personas sin síntomas asociados a la parasitación previa por *Anisakis*. La técnica de ImmunoCAP[®] presenta una falta de especificidad en comparación con el ELISA, debido a la gran cantidad de antígeno adsorbido a las cápsulas para aumentar la sensibilidad (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014; García *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2000a).

Lo siguiente sería preguntarse qué papel tiene la tropomiosina de *Anisakis* en estos falsos positivos. En un estudio previo realizado con distintos métodos de diagnóstico de anisakiosis, se demostró que la tropomiosina de *Anisakis* recombinante solo fue reconocida por un paciente control (atópico) de un total de 52 sujetos investigados y únicamente mediante test de activación de basófilos (ni con ImmunoCAP[®], ni con pruebas cutáneas) (Gamboa *et al.*, 2012). Cabe destacar que en este estudio había 17 sujetos control atópicos (con pruebas cutáneas negativas frente a *Anisakis*) de los cuales, dos resultaron falsamente positivos a *Anisakis* mediante ImmunoCAP[®] y de estos uno fue el positivo a la tropomiosina de *Anisakis* recombinante (Gamboa *et al.*, 2012). Además, en el trabajo mencionado al comienzo de la discusión de López-Matas *et al.*, (2016), el porcentaje de positividad a *Anisakis* (pruebas

cutáneas) en sujetos alérgicos al marisco y sin síntomas de parasitación previa por *Anisakis* fue del 25% (cuatro positivos a *Anisakis* de 16 pacientes alérgicos al marisco) siendo el porcentaje más elevado si lo comparamos con el 3,2% de 789 pacientes alérgicos a los ácaros (López-Matas *et al.*, 2016). Este dato del 25% es bastante importante para apoyar nuestra hipótesis teniendo en cuenta que las pruebas cutáneas son más específicas que el ImmunoCAP® (Gamboa *et al.*, 2012). La hipótesis también se ve reforzada si nos fijamos en los pacientes UC+ 33 y 36 que presentando valores de IgE frente a *Anisakis* positivos mediante ImmunoCAP® (62,9 kU/l y 2,20 kU/l, respectivamente), reconocen Ani s 3 y Pan b 1 y son positivos al extracto de langostino por ELISA. Analizando los datos disponibles, el paciente 33 fue claramente positivo a los alérgenos recombinantes de *Anisakis* Ani s 1 y t-Ani s 7, a la hemoglobina de *Anisakis* (Ani s 13) y a las tropomiosinas recombinantes de *Anisakis* y langostino Ani s 3 y Pan b1 mediante ELISA, sin embargo el paciente 36 únicamente fue positivo a *Anisakis* mediante ImmunoCAP® y a las tropomiosinas recombinantes Ani s 3 y Pan b 1 por lo que probablemente se haya sensibilizado frente al langostino y esta sensibilización haya desembocado en un reconocimiento cruzado de la tropomiosina de *Anisakis* ocasionando un falso positivo a *Anisakis* cuando se realiza el diagnóstico mediante ImmunoCAP®. Además, observamos que el paciente 36 resultaba positivo a la hemoglobina purificada Ani s 13 pero, en la inmunotransferencia, el patrón no encajaba con el de los positivos a hemoglobina (banda a 37 kDa), siendo detectadas bandas alrededor de 20 y 50 kDa (Figura 80) al igual que las observadas en la inmunotransferencia del paciente G1 (sensibilizado a crustáceos) sobre el extracto de *Anisakis* (Figura 115). Estas bandas podrían ser trazas de tropomiosina de *Anisakis* presentes tras el proceso de purificación de la hemoglobina.

La tropomiosina del extracto de langostino solo fue reconocida mediante ELISA por cuatro (33%) de los 12 pacientes sensibilizados a crustáceos. Estos cuatro pacientes presentaban niveles claramente positivos de IgE específica frente al langostino (13,5-70 kU/l) y pruebas cutáneas positivas frente a ácaros del polvo, cuya tropomiosina está relacionada con las reacciones cruzadas entre artrópodos y *Anisakis* (Johansson *et al.*, 2001). Nuestros resultados parecen estar de acuerdo con los observados por López-Matas *et al.*, (2016) ya que la tropomiosina del camarón marrón *Farfantepenaeus aztecus* (Pen a 1), al contrario de lo que se pensaba, no parece comportarse como alérgeno principal en pacientes alérgicos a marisco [seis positivos a Pen a 1 (28,6%) de 21 pacientes], ni incluso en pacientes alérgicos a ácaros y a marisco simultáneamente [15 positivos a Pen a 1 (38,5%) de 39 pacientes], además de no presentar una gran reactividad cruzada en pacientes alérgicos a ácaros [21 positivos a Pen a 1 (2,7%) de 790 pacientes] (López-Matas *et al.*, 2016).

Cuando realizamos la inmunización de los ratones con rAni s 3, detectamos niveles bajos de reconocimiento de tropomiosina por parte del suero murino cuando lo incubamos con el extracto total de *Anisakis* en ELISA indirecto. Cuando inmunizamos los ratones con la miofilina recombinante de *Anisakis* (Figura 83) también fuimos conscientes del tenue reconocimiento de este alérgeno en el extracto total del parásito. Además en la inmunotransferencia del extracto total de *Anisakis* no se detectaba una banda a 37 kDa como en la inmunotransferencia de rAni s 3 sino a 20 kDa.

La aparición de esta banda a 20 kDa probablemente se deba a una ruptura proteolítica mediante enzimas presentes en el propio extracto de *Anisakis*, ya que, por ejemplo tras una incubación de 10 min con 40 U de pepsina, la tropomiosina recombinante del camarón marrón *Farfantepenaeus aztecus* (Pen a 1)

es fragmentada en dos bandas, una de 17 y otra de 50 kDa compatibles con las reconocidas, en nuestro estudio, en el extracto de *Anisakis* (Mahajan *et al.*, 2016).

Además, observando la tira de la inmunotransferencia de rAni s 3 incubada con el suero AniM (de ratón inmunizado con el extracto total de *Anisakis*) vimos que sí se reconocía la banda de 37 kDa, lo que confirmaba que el extracto total de *Anisakis* contenía tropomiosina y que ésta, aun posiblemente fragmentada, era capaz de inducir IgG1 mediante la inmunización de ratones frente a la tropomiosina rAni s 3 transferida.

Además ese fragmento de tropomiosina de 20 kDa debe de estar presente en muy baja cantidad en el extracto ya que en las inmunotransferencias de los pacientes 33 y 36 realizadas frente al extracto total de *Anisakis* en la Figura 90 (ver apartado 4.6.5.) no era aparente el reconocimiento de ninguna banda a este peso molecular. La tropomiosina de *Anisakis* ha sido identificada mediante espectrometría de masas a 40 kDa en la electroforesis del extracto de *Anisakis* (Fæste *et al.*, 2014) por ello cabe la posibilidad de que la tropomiosina presente en nuestro extracto de *Anisakis* haya sufrido degradación proteolítica ya que no hemos utilizado inhibidores de proteasas al realizar los extractos. Además en otro estudio de reactividad cruzada entre los extractos de *Anisakis*, *Blatella* y *Chironomus*, también se ha observado una inhibición de una banda de 25 kDa (compatible con nuestra banda de 20 kDa) en la membrana con el extracto de *Anisakis* transferido, por la absorción previa de una mezcla de 18 sueros de pacientes pediátricos (con IgE específica >10 kU/l frente a *Anisakis*, *Blatella* y *Chironomus* y una IgE total <1000 kU/l) con los extractos de los artrópodos *Blatella* y *Chironomus* conservándose la banda de 40 kDa (Pascual *et al.*, 1997). Esto indica que si la proteína causante de la reactividad cruzada es la tropomiosina, no aparece en el extracto de *Anisakis* a 40 kDa sino a 20 kDa, al igual que sucedía en nuestros resultados.

De los 12 pacientes seleccionados con los niveles más elevados frente al extracto de *Anisakis* de los grupos AGA y UC+, solo el paciente 33 (UC+) reconoció la tropomiosina presente en el extracto de langostino mediante inmunotransferencia. Sin embargo de los seis pacientes sensibilizados a crustáceos con IgE más elevada, todos ellos mostraron alguna banda frente al extracto de *Anisakis*. Este hecho apoya la hipótesis anterior en la que la sensibilización a crustáceos ocasiona falsos positivos a *Anisakis* por la presencia de reacciones cruzadas. De estos seis pacientes dos reconocieron la misma banda de 20 kDa que el suero (IgG1) de ratón inmunizado con rAni s 3, por lo que queda confirmado que esa banda se corresponde con un fragmento de tropomiosina. De estos seis pacientes seleccionados sensibilizados a crustáceos tres reconocieron una banda de 50 kDa del extracto de *Anisakis*. Esta banda de 50-60 kDa también fue observada previamente mediante inmunotransferencia en 11 donantes de sangre sanos que presentaban IgE específica frente a *Anisakis* elevada (3-100 kU/l) pero que no presentaron síntomas sospechosos de parasitación previa por *Anisakis* (Del Rey Moreno *et al.*, 2006). Por tanto, cabría la posibilidad de la existencia de reacción cruzada entre esta proteína de 50-60 kDa de *Anisakis* y algún alérgeno del langostino frente al que estos donantes pudieran estar sensibilizados.

En conclusión, existe una baja reactividad cruzada entre *Anisakis* y el resto de organismos estudiados cuando consideramos los niveles de IgE. Asimismo discutimos que la presencia, en pacientes con urticaria crónica asociada o no a *Anisakis*, de niveles más elevados de IgE reactiva frente a los diferentes extractos podría ser responsable de su patología. Además, la cocción parece ser un mecanismo eficaz

para reducir la unión de IgE, pero no la de la IgG ni IgA. Asimismo, se ha demostrado el papel protector de la IgG4 anti-tropomiosina y la IgA ya que están disminuidas en los pacientes con urticaria comparado con los sujetos control. Finalmente se ha propuesto que una sensibilización previa a tropomiosina de langostino podría generar un reconocimiento cruzado de la de *Anisakis* contribuyendo a la aparición de falsos positivos diagnosticados mediante ImmunoCAP®.

6. CONCLUSIONES

1. Las regiones adyacentes a las posiciones 133-135 y 201 de las tropomiosinas de invertebrados presentan una menor probabilidad de plegamiento en hélice alfa que las de vertebrados y son candidatas a ser las responsables de su alergenicidad.
2. La nueva metodología de análisis utilizada (obtención de la secuencia, modelado, análisis de epitopos, comparación de superficies de epitopos) es adecuada para la predicción de reacciones cruzadas en proteínas de plegamiento sencillo como la tropomiosina.
3. Los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en la urticaria crónica dependen de los hábitos de consumo de pescado y, concretamente en los pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), dependen de la producción de IgE específica frente a *Anisakis*.
4. En los pacientes UC+, la presencia de niveles bajos de DAO les predisponen a una exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado.
5. La hemoglobina de *Anisakis* ha sido descrita como un nuevo alérgeno principal de *Anisakis simplex* (Ani s 13) siendo reconocida en su forma nativa por el 72,1% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* por ELISA indirecto y, particularmente, por el 90% de los pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica. Ninguno de los pacientes que no estaba sensibilizado a *Anisakis* resultó positivo.
6. Las hemoglobinas de *Anisakis* y *Ascaris* no presentan reactividad cruzada lo que convierte a la hemoglobina de *Anisakis* en un candidato potencial para el desarrollo de herramientas más específicas para el diagnóstico de la anisakiosis.
7. El uso de la forma nativa purificada de Ani s 13, en combinación con los alérgenos de referencia actuales, mejoraría la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la anisakiosis.
8. Los tetrámeros y octámeros fueron los oligómeros más abundantes de Ani s 13, pero los octámeros fueron los que presentaron un mayor contenido de grupo hemo unido.
9. En nuestras condiciones experimentales, la miofilina y la arginina quinasa recombinantes de *A. simplex* no pueden ser consideradas alérgenos de *Anisakis*; siendo los individuos no sensibilizados a *Anisakis* los que presentaron los niveles más elevados de IgE anti-arginina quinasa.
10. Existe una baja reactividad cruzada entre *Anisakis* y diferentes organismos de nuestro entorno involucrados en procesos alérgicos como nematodos parásitos, artrópodos domésticos y mariscos.
11. La tropomiosina de *Anisakis* (Ani s 3) fue reconocida por el 15,4% de nuestros pacientes sensibilizados a *Anisakis*, por lo que se confirma que no es un alérgeno principal de *Anisakis*.
12. La cocción del pulpo (*Octopus vulgaris*) y mejillón (*Mytilus edulis*) parece ser un mecanismo eficaz para reducir la unión de IgE, pero no la de la IgG ni IgA.

13. La IgA y la IgG4 anti-tropomiosina están disminuidas en los pacientes con urticaria comparado con los sujetos control, lo que confirma su papel protector en la urticaria crónica.
14. La positividad de la IgE frente a langostino (*Litopenaeus vannamei*) por ELISA está asociada a la positividad a *Anisakis* mediante InmunoCAP® contribuyendo a los falsos positivos que aparecen en personas sin síntomas asociados a la parasitación previa por *Anisakis*.
15. La tropomiosina podría ser un importante alérgeno en pacientes que presentan reacciones adversas recurrentes tras la ingesta de pescado.

CONCLUSIONS

1. Regions adjacent to positions 133-135 and 201 of invertebrate tropomyosins have lower probability of alpha helix folding than those of vertebrates and may be responsible for their allergenicity.
2. The new methodology that was used (obtaining the sequence, modeling, analyzing the epitopes, comparing epitope surfaces) is suitable for the prediction of cross-reactions among simple folding proteins such as tropomyosin.
3. Serum diamine-oxidase (DAO) levels in chronic urticaria patients depend on fish-consumption habits and – particularly in patients diagnosed with *Anisakis* sensitization-associated chronic urticaria (CU+) – are dependent on the production of specific IgE against *Anisakis*.
4. In the CU+ patients, the presence of low levels of DAO predisposes them to an exacerbation of urticaria after ingesting fish.
5. *Anisakis* hemoglobin has been described as a new major allergen of *Anisakis simplex* (Ani s 13). It has been recognized in its native form by 72.1% of the *Anisakis*-sensitized patients by indirect ELISA and, particularly, by 90% of patients diagnosed with gastro-allergic anisakiasis. None of the non-*Anisakis*-sensitized patients were positive.
6. The hemoglobins of *Anisakis* and *Ascaris* hemoglobins are not cross-reactive, which makes *Anisakis* hemoglobin a potential candidate for the development of more specific tools for diagnosing anisakiasis.
7. The use of the purified native form of Ani s 13, in combination with the current gold-standard allergens, would improve sensitivity and specificity in the diagnosis of anisakiasis.
8. Tetramers and octamers were the most abundant oligomers of Ani s 13, but the octamers were the ones with the highest content of attached heme group.
9. Under our experimental conditions, recombinant myophilin and arginine kinase from *A. simplex* cannot be considered *Anisakis* allergens, because it was the non-*Anisakis*-sensitized individuals who had the highest levels of anti-arginine kinase IgE.
10. There is low cross-reactivity between *Anisakis* and different local organisms that are involved in allergic processes, such as parasitic nematodes, domestic arthropods and shellfish.
11. *Anisakis* tropomyosin (Ani s 3) was recognized by 15.4% of *Anisakis*-sensitized patients, which confirms that it is not a major allergen of *Anisakis*.
12. The cooking of octopus (*Octopus vulgaris*) and mussels (*Mytilus edulis*) seems to be an effective mechanism for reducing the binding of IgE, but not IgG and IgA.
13. IgA and anti-tropomyosin IgG4 levels are lower in patients with urticaria compared with control subjects, confirming their protective role in chronic urticaria.

14. The positivity of IgE against whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ELISA is associated with the positivity to *Anisakis* by ImmunoCAP® and contributes to false positives in people without symptoms associated with a previous parasitization by *Anisakis*.
15. Tropomyosin could be an important allergen in patients who have recurrent adverse reactions after ingesting fish.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Åkerström, J. (2002). Characterisation of antibodies against arginine kinase – an enzyme from shellfish. Diploma thesis, Uppsala, Sweden.
- Aalberse, R.C. (2000). Structural biology of allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, 228-238.
- Aalberse, R.C., y Stadler, B.M. (2006). *In silico* predictability of allergenicity: From amino acid sequence via 3-D structure to allergenicity. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 625-627.
- Aalberse, J.A., Meijer, Y., Derksen, N., Van Der Palen-Merkus, T., Knol, E., y Aalberse, R.C. (2013). Moving from peanut extract to peanut components: Towards validation of component-resolved IgE tests. *Allergy* 68, 748-756.
- Aalberse, R.C., van der Gaag, R., y van Leeuwen, J. (1983). Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *Journal of Immunology* 130, 722-726.
- Aalberse, R.C., Akkerdaas, J., y van Ree, R. (2001). Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 56, 478-490.
- Aalberse, R.C., Platts-Mills, T.A., y Rispens, T. (2016). The developmental history of IgE and IgG4 antibodies in relation to atopy, eosinophilic esophagitis, and the modified Th2 Response. *Current Allergy and Asthma Reports* 16, 45.
- Abascal, F., Zardoya, R., y Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104-2105.
- Abascal, F., Irisarri, I., y Zardoya, R. (2014). Filogenia y evolución molecular. En *Bioinformática con Ñ: Principios de Bioinformática*, A. Sebastián, y A. Pascual-García, eds. pp. 57-85.
- Abattouy, N., Valero, A., Martín-Sánchez, J., Peñalver, M.C., y Lozano, J. (2012). Sensitization to *Anisakis simplex* species in the population of Northern Morocco. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 22, 514-519.
- Abe, N., y Teramoto, I. (2014). Oral inoculation of live or dead third-stage larvae of *Anisakis simplex* in rats suggests that only live larvae induce production of antibody specific to *A. simplex*. *Acta parasitologica* 59, 184-188.
- Abollo, E., Gestal, C., y Pascual, S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: An updated perspective. *Parasitology Research* 87, 492-499.
- Adams, E.J., Gu, S., y Luoma, A.M. (2015). Human gamma delta T cells: evolution and ligand recognition. *Cellular Immunology* 296, 31-40.
- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., y Lake, J.A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-493.
- Agúndez, J.A.G., Ayuso, P., Cornejo-García, J.A., Blanca, M., Torres, M.J., Doña, I., Salas, M., Blanca-López, N., Canto, G., Rondon, C., *et al.*, (2012). The diamine oxidase gene is associated with hypersensitivity response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *PLoS One* 7, e47571.
- Akasaka, Y., Kizu, M., Aoike, A., y Kawai, K. (1979). Endoscopic management of acute gastric anisakiasis. *Endoscopy* 11, 158-162.
- Allen, J.E., y Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews. Immunology* 11, 375-388.
- Alonso, A., Moreno-Ancillo, A., Daschner, A., y López-Serrano, M.C. (1999). Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy* 54, 517-520.

- Alonso, E., Guix, S., Palop, A., Ros, G., y Santos, J.Á. (2016). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a *Anisakis*. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN* 24, 23-33.
- Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, Á., López-Serrano, M.C., Suárez de Parga, J.M., Daschner, Á., Caballero, M.T., Barranco, P., y Cabañas, R. (2004). *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitology research* 93, 378-384.
- Anadón, A.M., Romarís, F., Escalante, M., Rodríguez, E., Gárate, T., Cuéllar, C., y Ubeira, F.M. (2009). The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clinical and Experimental Immunology* 156, 471-478.
- Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, M.T., Cuéllar, C., Romarís, F., Chivato, T., Rodero, M., González-Díaz, H., y Ubeira, F.M. (2010). Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens *versus* the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 496-502.
- Annunziato, F., Romagnani, C., y Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135, 626-635.
- Antico, A., Pagani, M., Vescovi, P.P., Bonadonna, P., y Senna, G. (2011). Food-specific IgG4 lack diagnostic value in adult patients with chronic urticaria and other suspected allergy skin symptoms. *International Archives of Allergy and Immunology* 155, 52-56.
- APROMAR (2012). Evaluación de la presencia de nematodos del género *Anisakis* en los pescados de acuicultura marina españoles. http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/fondos-europeos/acciones_colectivas.aspx.
- Arcos, S.C., Ciordia, S., Roberston, L., Zapico, I., Jiménez-Ruiz, Y., González-Muñoz, M., Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A., Albar, J.P., *et al.*, (2014). Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics* 14, 1547-1568.
- Arlian, L.G., Morgan, M.S., Quirce, S., Marañón, F., y Fernández-Caldas, E. (2003). Characterization of allergens of *Anisakis simplex*. *Allergy* 58, 1299-1303.
- Arnon, R., y van Regenmortel, M.H. V. (1992). Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *The FASEB Journal* 6, 3265-3274.
- Arrieta, I., Del Barrio, M., Vidarte, L., Del Pozo, V., Pastor, C., Gonzalez-Cabrero, J., Cárdbaba, B., Rojo, M., Mínguez, A., Cortegano, I., *et al.*, (2000). Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Ani s 1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 107, 263-268.
- Asaishi, K., Nishino, C., Totsuka, M., Hayasaka, H., y Suzuki, T. (1980a). Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. 2. Epidemiologic study of inhabitants and questionnaire survey in Japan. *Gastroenterologia Japonica* 15, 128-134.
- Asaishi, K., Nishino, C., Ebata, T., Totsuka, M., Hayasaka, H., y Suzuki, T. (1980b). Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. 1. Immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva. *Gastroenterologia Japonica* 15, 120-127.
- Asnoussi-Alsharif, A.H. (2015). Molecular and immunological characterisation of proteins from *Anisakis pegreffii* and their immune stimulatory effect on the human health system. Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT University).
- Asturias, J.A., Eraso, E., Moneo, I., y Martínez, A. (2000a). Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 55, 898-899.
- Asturias, J. a, Eraso, E., y Martínez, A. (2000b). Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Molecular and Biochemical Parasitology* 108, 263-267.

- Audicana, M.T., De Corres, L.F., Muñoz, D., Fernández, E., Navarro, J.A., y Del Pozo, M.D. (1995). Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96, 558-560.
- Ayuso, P., Blanca, M., Cornejo-García, J.A., Torres, M.J., Doña, I., Salas, M., Blanca-López, N., Canto, G., Rondón, C., Campo, P., *et al.*, (2013). Variability in histamine receptor genes HRH1, HRH2 and HRH4 in patients with hypersensitivity to NSAIDs. *Pharmacogenomics* 14, 1871-1878.
- Ayuso, R., Lehrer, S.B., Tanaka, L., Ibañez, M.D., Pascual, C., Burks, A.W., Sussman, G.L., Goldberg, B., Lopez, M., y Reese, G. (1999). IgE antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 83, 399-405.
- Ayuso, R., Sánchez-García, S., Lin, J., Fu, Z., Ibañez, M.D., Carrillo, T., Blanco, C., Goldis, M., Bardina, L., Sastre, J., *et al.*, (2010). Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, 1286-1293.
- Backert, L., y Kohlbacher, O. (2015). Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. *Genome Medicine* 7, 119.
- De Baere, I., Liu, L., van Beeumen, J., y Moens, L. (1991). The hemoglobin of *Ascaris suum*: Structure and partial sequence of domain 1. En *Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers*, S.N. Vinogradov, y O.H. Kapp, eds. (New York, NY: Springer-Verlag), pp. 271-277.
- De Baere, I., Liu, L., Moens, L., Van Beeumen, J., Gielens, C., Richelle, J., Trotman, C., Finch, J., Gerstein, M., y Perutz, M. (1992). Polar zipper sequence in the high-affinity hemoglobin of *Ascaris suum*: amino acid sequence and structural interpretation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4638-4642.
- Baeza, M.L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., De Barrio, M., Herrero, T., Santaolalla, M., y Zubeldia, J.M. (2004). Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clinical and Experimental Allergy* 34, 296-302.
- Bagrov, A.A. (1981). On the variability of larvae of the nematode *Anisakis schupakovi* Mosgovoy, 1951. *Parazitologiya* 15, 246-250.
- Bagrov, A.A. (1982). On morphological variability of larvae of nematodes of the genus *Anisakis* (Nematoda, Anisakidae). *Parazitologiya* 16, 469-475.
- Baird, F.J., Su, X., Aibinu, I., Nolan, M.J., Sugiyama, H., Otranto, D., Lopata, A.L., y Cantacessi, C. (2016). The *Anisakis* transcriptome provides a resource for fundamental and applied studies on allergy-causing parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004845.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., y Mccammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10037-10041.
- Bañuelos, S., Saraste, M., y Carugo, K.D. (1998). Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure* 6, 1419-1431.
- Barbarroja-Escudero, J., Sánchez-González, M.-J., Rodríguez-Rodríguez, M., Antolín-Amérigo, D., Bartolomé, B., y Alvarez-Mon, M. (2016). Bleak allergy: first case report. *Allergology International* 65, 472-473.
- Barletta, B., Tinghino, R., Corinti, S., Afferni, C., Iacovacci, P., Mari, A., Pini, C., y Di Felice, G. (1998). Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen allergens. Identification of cross-reactive periodate-resistant and -sensitive epitopes with monoclonal antibodies. *Allergy* 53, 586-593.
- Barrett, J., y Brophy, P.M. (2000). *Ascaris* haemoglobin: New tricks for an old protein. *Parasitology Today* 16, 90-91.

- Barua, B., Pamula, M.C., y Hitchcock-DeGregori, S.E. (2011). Evolutionarily conserved surface residues constitute actin binding sites of tropomyosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10150-10155.
- Baumgart, D.C., y Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627-1640.
- Baur, X., Dewair, M., Fruhmann, G., Aschauer, H., Pfletschinger, J., y Braunitzer, G. (1982). Hypersensitivity to chironomids (non-biting midges): localization of the antigenic determinants within certain polypeptide sequences of hemoglobins (erythrocrucorins) of *Chironomus thummi thummi* (Diptera). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69, 66-76.
- Baur, X., Dewair, M., Haegele, K., Prelicz, H., Scholl, A., y Tichy, H. (1983). Common antigenic determinants of haemoglobin as basis of immunological cross-reactivity between chironomid species (Diptera, Chironomidae): studies with human and animal sera. *Clinical and Experimental Immunology* 54, 599-607.
- Benkert, P., Tosatto, S.C.E., y Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins* 71, 261-277.
- Benkert, P., Künzli, M., y Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research* 37, W510-W514.
- Benkert, P., Biasini, M., y Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343-350.
- Bergmann-Leitner, E.S., Chaudhury, S., Steers, N.J., Sabato, M., Delvecchio, V., Wallqvist, A.S., Ockenhouse, C.F., y Angov, E. (2013). Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the *in vivo* immune response to a novel malarial antigen. *PLoS One* 8, e71610.
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of Bacteriology* 186, 595-600.
- Bielory, B.P., Mainardi, T., y Rottem, M. (2013). Evolutionary immune response to conserved domains in parasites and aeroallergens. *Allergy and Asthma Proceedings* 34, 93-102.
- Bingham, C.O. (2008). Immunomodulatory approaches to the management of chronic urticaria: an immune-mediated inflammatory disease. *Current Allergy and Asthma Reports* 8, 278-287.
- Blair, J.E. (2009). Animals (Metazoa). En *The Timetree of Life*, S.B. Hedges, y S. Kumar, eds. (Oxford University Press), pp. 223-230.
- Blaxter, M.L. (1993). Nemoglobins: Divergent nematode globins. *Parasitology Today* 9, 353-360.
- Blaxter, M.L., Vanfleteren, J.R., Xia, J., y Moens, L. (1994). Structural characterization of an *Ascaris* myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 30181-30186.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., et al., (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum *Nematoda*. *Nature* 392, 71-75.
- Borley, D.W., Mahapatra, M., Paton, D.J., Esnouf, R.M., Stuart, D.I., y Fry, E.E. (2013). Evaluation and use of *in-silico* structure-based epitope prediction with foot-and-mouth disease virus. *PLoS One* 8, e61122.
- Breiteneder, H., y Chapman, M.D. (2014). Allergen Nomenclature. En *Allergens and Allergen Immunotherapy*, R.F. Lockey, y D.K. Ledford, eds. (Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group), pp. 37-49.
- Brennan, P.J., Brigl, M., y Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews. Immunology* 13, 101-117.
- Bugajska-Schretter, A., Elfman, L., Fuchs, T., Kaplotis, S., Rumpold, H., Valenta, R., y Spitzauer, S.

- (1998). Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101, 67-74.
- Bykova, N. V., Igamberdiev, A.U., Ens, W., y Hill, R.D. (2006). Identification of an intermolecular disulfide bond in barley hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347, 301-309.
- Caballero, M.L., y Moneo, I. (2002). Specific IgE determination to Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 89, 74-77.
- Caballero, M.L., Umpierrez, A., Moneo, I., y Rodriguez-Perez, R. (2011). Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitology International* 60, 209-212.
- Caballero, M.L., Umpierrez, A., Perez-Piñar, T., Moneo, I., De Burgos, C., Asturias, J.A., y Rodríguez-Pérez, R. (2012). *Anisakis simplex* recombinant allergens increase diagnosis specificity preserving high sensitivity. *International Archives of Allergy and Immunology* 158, 232-240.
- Caballero, M.L., Asero, R., Antonicelli, L., Kamberi, E., Colangelo, C., Fazii, P., De Burgos, C., y Rodríguez-Perez, R. (2013). *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: Clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. *International Archives of Allergy and Immunology* 162, 39-44.
- Capobianco, F., Butteroni, C., Barletta, B., Corinti, S., Afferni, C., Tinghino, R., Boirivant, M., y Di Felice, G. (2008). Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions. *International immunology* 20, 1077-1086.
- Caraballo, L., y Acevedo, N. (2011). New allergens of relevance in tropical regions: The impact of *Ascaris lumbricoides* infections. *The World Allergy Organization Journal* 4, 77-84.
- Caraballo, L., y Zakzuk, J. (2012). Consideraciones sobre la evolución de la respuesta inmunitaria Th2 y sus posibles relaciones con parasitosis y alergia. *Biomédica* 32, 145-157.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A.I., Puente, S., Gutiérrez, M.T., Moneo, I., y González-Muñoz, M. (2014). *Anisakis/Ascaris* IgE ratio improves specificity for the diagnosis of *Anisakis simplex* sensitization in travellers and immigrants. *Acta Tropica* 138, 1-4.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Navas, A., Moneo, I., y González-Muñoz, M. (2016a). Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004864.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Navas, A., Caballero, T., Dominguez-Ortega, J., Jurado-Palomo, J., y González-Muñoz, M. (2016b). Ani s 11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for *Anisakis* Allergy Component-Resolved Diagnosis. *International Archives of Allergy and Immunology* 169, 108-112.
- Chase, M.W. (1946). Inhibition of Experimental Drug Allergy by Prior Feeding of the Sensitizing Agent. *Experimental Biology and Medicine* 61, 257-259.
- Chehayeb, J.F., Robertson, A.P., Martin, R.J., y Geary, T.G. (2014). Proteomic analysis of adult *Ascaris suum* fluid compartments and secretory products. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2939.
- Chikazawa, S., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., y Satoh, T. (2015). Fish collagen allergy: a pitfall of the prick-to-prick test with raw fish. *British Journal of Dermatology* 173, 1330-1331.
- Cho, H.J., Cho, S.I., Kim, H.O., Park, C.W., y Lee, C.H. (2013). Lack of association of plasma histamine with diamine oxidase in chronic idiopathic urticaria. *Annals of Dermatology* 25, 189-195.
- Cirkovic-Velickovic, T., Gavrovic-Jankulovic, M., y Jankov, R.M. (2005). Overview of the most commonly used methods in allergen characterization. *Journal of the Serbian Chemical Society* 70, 347-360.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., y Deléage, G. (2000). NPS@: Network protein sequence

- analysis. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 147-150.
- Coronas-Serna, J.M., Cuéllar, C., y González-Fernández, J. (2014). Modelado bioinformático tridimensional de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 y respuesta IgA específica en pacientes sensibilizados a *Anisakis simplex*. *Reduca* 6, 170-175.
- Cramer, R. (2013). The crux with a reliable *in vitro* and *in vivo* diagnosis of allergy. *Allergy* 68, 693-694.
- Cranston, P.S. (1988). Allergens of non-biting midges (Diptera: Chironomidae): a systematic survey of chironomid haemoglobins. *Medical and Veterinary Entomology* 2, 117-127.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., y Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14, 1188-1190.
- Cuéllar, C., Rodero, M., y Daschner, A. (2010). Inhibition of cytokine production in Gastro-allergic Anisakiasis and *Anisakis simplex* sensitization-associated chronic urticaria. *Parasite Immunology* 32, 528.
- Cuéllar, C., Fernández-Fígares, V., Rodero, M., Valls, A., de Frutos, C., y Daschner, A. (2012a). Cytokine production in gastro-allergic anisakiosis and associated chronic urticaria. *European Multicollloquim of Parasitology XI. Cluj-Napoca*. SY24, P01.
- Cuéllar, C., Daschner, A., Valls, A., De Frutos, C., Fernández-Fígares, V., Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, T., Rodero, M., y Ubeira, F.M. (2012b). Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct *Anisakis simplex*-associated allergic clinical disorders. *Archives of Dermatological Research* 304, 283-288.
- Cuéllar, C., Valls, A., de Frutos, C., Rodero, M., y Daschner, A. (2013). Avidity studies in *Anisakis simplex*-associated allergic diseases. *Journal of Allergy* 2013, 106781.
- Cunha-Neto, E., Bilate, A.M., Hyland, K. V, Fonseca, S.G., Kalil, J., y Engman, D.M. (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39, 41-54.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., y Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology* 30, 223-226.
- Darawshe, S., y Daniel, E. (1991). Molecular symmetry and arrangement of subunits in extracellular hemoglobin from the nematode *Ascaris suum*. *European journal of biochemistry / FEBS* 201, 169-173.
- Darawshe, S., Tsafadyah, Y., y Daniel, E. (1987). Quaternary structure of erythrocrucorin from the nematode *Ascaris suum*. *Biochemical Journal* 242, 689-694.
- Daschner, A., y Cuéllar, C. (2010). The hidden sense of symptoms: urticaria can be beneficial. *Medical hypotheses* 75, 623-626.
- Daschner, A., y Pascual, C.Y. (2005). *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5, 281-285.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Caballero, T., Suarez-de-Parga, J.M., y López-Serrano, M.C. (1999). Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clinical and Experimental Allergy* 29, 1260-1264.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J.M., y López-Serrano, M.C. (2000). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease - clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 176-181.
- Daschner, A., Cuéllar, C., Sánchez-Pastor, S., Pascual, C.Y., y Martín-Esteban, M. (2002). Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response.

Parasite Immunology 24, 243-251.

- Daschner, A., Vega de la Osada, F., y Pascual, C.Y. (2005). Allergy and parasites reevaluated: wide-scale induction of chronic urticaria by the ubiquitous fish-nematode *Anisakis simplex* in an endemic region. *Allergologia et immunopathologia* 33, 31-37.
- Daschner, A., Rodero, M., De Frutos, C., Valls, A., y Cuéllar, C. (2010a). Chronic urticaria is associated with a differential helminth-arthropod-related atopy phenotype. *The Journal of Dermatology* 37, 780-785.
- Daschner, A., De Frutos, C., Valls, A., y Vega, F. (2010b). *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria: Short-lived immediate type or prolonged acute urticaria. *Archives of Dermatological Research* 302, 625-629.
- Daschner, A., Rodero, M., De Frutos, C., Valls, A., Vega, F., Blanco, C., y Cuéllar, C. (2011). Different serum cytokine levels in chronic vs. acute *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria. *Parasite Immunology* 33, 357-362.
- Daschner, A., Cuéllar, C., y Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology* 28, 9-15.
- Daschner, A., Fernández-Fígares, V., Valls, A., Frutos, C. De, Rodero, M., Ubeira, F.M., y Cuéllar, C. (2013). Different fish-eating habits and cytokine production in chronic urticaria with and without sensitization against the fish-parasite *Anisakis simplex*. *Allergy International* 62, 191-201.
- Daschner, A., Fernández-Fígares, V., Rodero, M., Valls, A., De Frutos, C., Ubeira, F.M., y Cuéllar, C. (2014). Specific IgG4: possible role in the pathogenesis and a new marker in the diagnosis of *Anisakis*-associated allergic disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 79, 120-126.
- Daul, C.B., Morgan, J.E., Waring, N.P., McCants, M.L., Hughes, J., y Lehrer, S.B. (1987). Immunologic evaluation of shrimp-allergic individuals. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 80, 716-722.
- Davies, A.M., y Sutton, B.J. (2015). Human IgG4: A structural perspective. *Immunological Reviews* 268, 139-159.
- Davies, J.M., Platts-Mills, T.A., y Aalberse, R.C. (2013). The enigma of IgE+ B-cell memory in human subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 972-976.
- Dhanda, S.K., Usmani, S.S., Agrawal, P., Nagpal, G., Gautam, A., y Raghava, G.P.S. (2016). Novel *in silico* tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Briefings in Bioinformatics* 1-12.
- Dixon, B., Walker, B., Kimmins, W., y Pohajdak, B. (1991). Isolation and sequencing of a cDNA for an unusual hemoglobin from the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5655-5659.
- Dixon, B., Kimmins, W., y Pohajdak, B. (1993). Variation in colour of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Anisakidae) larvae correlates with haemoglobin concentration in the pseudocoelomic fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 767-771.
- van Do, T., Elsayed, S., Florvaag, E., Hordvik, I., y Endresen, C. (2005). Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 1314-1320.
- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., y Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* 32, W665-W667.
- Duerr, C.U., y Fritz, J.H. (2016). Regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Cytokine* 87, 1-8.
- EFSA (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *The EFSA Journal* 8, 1543.

- Ellington, W.R. (2001). Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annual Review of Physiology* 63, 289-325.
- Erickson, H.P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online* 11, 32-51.
- Escolano-Tercero, M.Á., y Tomás-Tomás, Á. (2006). Descripción y control de plagas del arroz. *Dossier Técnico* 12, 25-27.
- Ewan, P., y Coote, D. (1990). Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the immunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 45, 22-29.
- Fæste, C.K., Jonscher, K.R., Dooper, M.M.W.B., Egge-Jacobsen, W., Moen, A., Daschner, A., Egaas, E., y Christians, U. (2014). Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteomics* 4, 140-155.
- Fagarasan, S., y Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature reviews. Immunology* 3, 63-72.
- FAO/WHO (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology (Rome: FAO/WHO).
- FAO/WHO (2009). Assessment of possible allergenicity. En *Foods derived from modern biotechnology*. Codex Alimentarius, FAO/WHO, ed. (Rome: FAO/WHO), pp. 52-55.
- FDA (2004). Food allergen labeling and consumer protection Act of 2004. *Public Law* Sec. 202, 905-911.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fernandes, J., Reshef, A., Patton, L., Ayuso, R., Reese, G., y Lehrer, S.B. (2003). Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 956-961.
- Fernández-Caldas, E., Puerta, L., Caraballo, L., y Lockey, R.F. (2014). Mite Allergens. En *Allergens and Allergen Immunotherapy Subcutaneous, Sublingual and Oral*, R.F. Lockey, y D.K. Ledford, eds. (CRC Press Taylor and Francis Group), pp. 181-203.
- Fernández-Fígares, V., Rodero, M., Valls, A., De Frutos, C., Daschner, A., y Cuéllar, C. (2014). Positive associations between infections of *Toxoplasma gondii* and seropositivity with *Anisakis simplex* in human patients suffering from chronic urticaria. *Journal of Helminthology* 89, 707-713.
- Fernández de Corres, L., Del Pozo, M., y Aizpuru, F. (2001). Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas, en relación a las diferentes tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica* 16, 337-346.
- Ferrari, I., Levin, M.J., Wallukat, G., Elies, R., Lebesgue, D., Chiale, P., Elizari, M., Rosenbaum, M., y Hoebeke, J. (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta1-adrenergic receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 59-65.
- Ferrer-Puga, M., García-Abujeta, J.L., y Lopez-SanMartín, M. (2010). Guía urticaria y angioedema (Madrid (España): SEAIC).
- Fischetti, V.A. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinical Microbiology Reviews* 2, 285-314.
- Fitch, W.M., y Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284.
- Fitzsimmons, C.M., y Dunne, D.W. (2009). Survival of the fittest: allergology or parasitology? *Trends in Parasitology* 25, 447-451.

- Fitzsimmons, C.M., Falcone, F.H., y Dunne, D.W. (2014). Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Frontiers in Immunology* 5, 61.
- Flescher, E., Bowlin, T.L., Ballester, A., Houk, R., y Talal, N. (1989). Increased polyamines may downregulate interleukin 2 production in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 83, 1356-1362.
- Flicker, S., y Valenta, R. (2003). Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* 132, 13-24.
- Fraga, D., Aryal, M., Hall, J.E., Rae, E., y Snider, M. (2015). Characterization of the arginine kinase isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 187, 85-101.
- Frehn, L., Jansen, A., Bennek, E., Mandic, A.D., Temizel, I., Tischendorf, S., Verdier, J., Tacke, F., Streetz, K., Trautwein, C., *et al.*, (2014). Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 9.
- Fu, S., Xu, J., Li, X., Xie, Y., Qiu, Y., Du, X., Yu, S., Bai, Y., Chen, Y., Wang, T., *et al.*, (2012). Immunization of mice with recombinant protein cobb or AsnC Confers protection against *Brucella abortus* infection. *PLoS One* 7.
- Fudge, K.R., y Heeley, D.H. (2015). Biochemical characterization of the roles of glycines 24 and 27 and threonine 179 in tropomyosin from the fast skeletal trunk muscle of the Atlantic salmon. *Biochemistry* 54, 2769-2776.
- Fumagalli, M., Pozzoli, U., Cagliani, R., Comi, G.P., Riva, S., Clerici, M., Bresolin, N., y Sironi, M. (2009). Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *Journal of Experimental Medicine* 206, 1395-1408.
- Gallagher, S.R., y Desjardins, P.R. (2007). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Human Genetics* 53, A.3D.1-A.3D.21.
- Gamboa, P.M., Asturias, J., Martínez, R., Antépara, I., Jáuregui, I., Urrutia, I., Fernández, J., y Sanz, M.L. (2012). Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 22, 13-19.
- García, B.E., y Lizaso, M.T. (2011). Cross-reactivity syndromes in food allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 21, 162-170.
- García, M., Moneo, I., Audicana, M.T., Del Pozo, M.D., Muñoz, D., Fernández, E., Díez, J., Etxenagusia, M.A., Ansotegui, I.J., y De Corres, L.F. (1997). The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99, 497-501.
- García-Boronat, M., Díez-Rivero, C.M., Reinherz, E.L., y Reche, P.A. (2008). PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Research* 36, W35-41.
- García-Martín, E., Ayuso, P., Martínez, C., y Agúndez, J.A.G. (2007). Improved analytical sensitivity reveals the occurrence of gender-related variability in diamine oxidase enzyme activity in healthy individuals. *Clinical Biochemistry* 40, 1339-1341.
- García-Martín, E., Ayuso, P., Martínez, C., Blanca, M., y Agúndez, J.A.G. (2009). Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 10, 867-883.
- García-Mayoral, M.F., Treviño, M.A., Pérez-Piñar, T., Caballero, M.L., Knaute, T., Umpierrez, A., Bruix, M., y Rodríguez-Pérez, R. (2014). Relationships between IgE/IgG4 epitopes, structure and function in *Anisakis simplex* Ani s 5, a member of the SXP/RAL-2 protein family. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2735.
- Garnier, J., Gibrat, J.F., y Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology* 266, 540-553.

- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 14, 685-695.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., y Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Totowa, NJ: Humana Press Inc.).
- Geeves, M.A., Hitchcock-DeGregori, S.E., y Gunning, P.W. (2015). A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36, 147-153.
- Gehlhar, K., Schlaak, M., Becker, W.M., y Bufe, A. (1999). Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: The ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clinical and Experimental Allergy* 29, 497-506.
- Ghosh, D., y Gupta-Bhattacharya, S. (2008). Structural insight into protein T1, the non-allergenic member of the Bet v 1 allergen family-An *in silico* analysis. *Molecular Immunology* 45, 456-462.
- Ghosh, N., Sircar, G., Saha, B., Pandey, N., y Bhattacharya, S.G. (2015). Search for allergens from the pollen proteome of sunflower (*Helianthus annuus* L): A major sensitizer for respiratory allergy patients. *PLoS One* 10, e0138992.
- Goldberg, D.E. (1999). Oxygen-avid hemoglobin of *Ascaris*. *Chemical Reviews* 99, 3371-3378.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.K., Osborne, B.A., y Kuby, J. (2003). Immunology (New York, NY: W.H. Freeman and Company).
- Gong, W., Huang, F., Ma, Y., Bai, H., Yin, L., Li, J., Chen, C., Xu, X., y Chen, X.-P. (2015). Protective immunity against *Schistosoma japonicum* infection can be provided by IgG antibodies towards periodate-sensitive or periodate-resistant glycans. *Parasites and Vectors* 8, 234.
- González-de-Olano, D., Bartolomé, B., Maroto, A.S., Vivanco, F., y Pastor-Vargas, C. (2012). Asthma after chicken consumption due to cross-reactivity between fish and chicken parvalbumin. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 22, 215-235.
- González-Fernández, J., Daschner, A., Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., Frutos, C. De, Valls, A., y Cuéllar, C. (2015). Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *International Journal for Parasitology* 45, 399-407.
- Greenfield, N.J., y Hitchcock-DeGregori, S.E. (1995). The stability of tropomyosin, a two-stranded coiled-coil protein, is primarily a function of the hydrophobicity of residues at the helix-helix interface. *Biochemistry* 34, 16797-16805.
- Guarneri, F., Guarneri, C., y Benvenega, S. (2007). Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *International journal of dermatology* 46, 146-150.
- Guida, B., De Martino, C.D., De Martino, S.D., Tritto, G., Patella, V., Trio, R., D'Agostino, C., Pecoraro, P., y D'Agostino, L. (2000). Histamine plasma levels and elimination diet in chronic idiopathic urticaria. *European Journal of Clinical Nutrition* 54, 155-158.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-321.
- Gupta, R., y Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* 7, 310-322.
- Haahtela, T., Holgate, S., Pawankar, R., Akdis, C.A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., Demain, J., Portnoy, J., y von Hertzen, L. (2013). The biodiversity hypothesis and allergic disease: World Allergy Organization position statement. *The World Allergy Organization Journal* 6, 3.
- Haas, J., Roth, S., Arnold, K., Kiefer, F., Schmidt, T., Bordoli, L., y Schwede, T. (2013). The Protein Model Portal - a comprehensive resource for protein structure and model information. *Database (Oxford)* 2013, bat031.

- Hajeb, P., y Selamat, J. (2012). A contemporary review of seafood allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 42, 365-385.
- Hames, B.D. (1986). An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En *Gel Electrophoresis in Proteins*, (Oxford: IRL Press), p.
- Handlogten, M.W., Kiziltepe, T., y Bilgicer, B. (2013a). Design of a heterotetravalent synthetic allergen that reflects epitope heterogeneity and IgE antibody variability to study mast cell degranulation. *The Biochemical Journal* 449, 91-99.
- Handlogten, M.W., Kiziltepe, T., Serezani, A.P., Kaplan, M.H., y Bilgicer, B. (2013b). Inhibition of weak-affinity epitope-IgE interactions prevents mast cell degranulation. *Nature Chemical Biology* 9, 789-+.
- Handlogten, M.W., Deak, P.E., y Bilgicer, B. (2014). Two-allergen model reveals complex relationship between IgE crosslinking and degranulation. *Chemistry and Biology* 21, 1445-1451.
- Hardison, R.C. (1996). A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5675-5679.
- Harnett, W. (2014). Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Molecular and Biochemical Parasitology* 195, 130-136.
- Hashimoto, M., Takamiya, S., Yokota, T., Nakajima, Y., Yamakura, F., Sugio, S., y Aoki, T. (2008). *Ascaris suum* cytochrome b5, an adult-specific secretory protein reducing oxygen-avid ferric hemoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 471, 42-49.
- Hayley, M., Chevaldina, T., Mudalige, W.A.K.A., Jackman, D.M., Dobbin, A.D., y Heeley, D.H. (2008). Shark skeletal muscle tropomyosin is a phosphoprotein. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 29, 101-107.
- Hilger, C., Swiontek, K., Hentges, F., Donnay, C., de Blay, F., y Pauli, G. (2010). Occupational inhalant allergy to pork followed by food allergy to pork and chicken: sensitization to hemoglobin and serum albumin. *International Archives of Allergy and Immunology* 151, 173-178.
- Hodgkinson, J.L., El-Mezgueldi, M., Craig, R., Vibert, P., Marston, S.B., y Lehman, W. (1997). 3-D image reconstruction of reconstituted smooth muscle thin filaments containing calponin: visualization of interactions between F-actin and calponin. *Journal of Molecular Biology* 273, 150-159.
- Hoffman, D.R., Day, E.D., y Miller, J.S. (1981). The major heat stable allergen of shrimp. *Annals of Allergy* 47, 17-22.
- Højgaard, D.P. (1998). Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. *Sarsia* 83, 21-28.
- van Holde, K.E. (1985). *Physical biochemistry* (Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall).
- Honzawa, Y., Nakase, H., Matsuura, M., y Chiba, T. (2011). Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflammatory Bowel Diseases* 17, 23-25.
- Huang, Y., Li, W., Huang, L., Hu, Y., Chen, W., Wang, X., Sun, J., Liang, C., Wu, Z., Li, X., *et al.*, (2012). Identification and characterization of myophilin-like protein: a life stage and tissue-specific antigen of *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research* 111, 1143-1150.
- Huang, Y.-Y., Liu, G.-M., Cai, Q.-F., Weng, W.-Y., Maleki, S.J., Su, W.-J., y Cao, M.-J. (2010). Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1196-1201.
- Hunter, C. a, y Jones, S. a (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology* 16, 448-457.

- Hurford, A., y Day, T. (2013). Immune evasion and the evolution of molecular mimicry in parasites. *Evolution* 67, 2889-2904.
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Navarrete, I., y Sanmartín, M.L. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitology Research* 82, 378-381.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695-716.
- Ishikura, H., Kikuchi, K., Nagasawa, K., Ooiwa, T., Takamiya, H., Sato, N., y Sugane, K. (1993). Anisakidae and Anisakidosis. *Progress in Clinical Parasitology* III, 43-102.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., y Shlomchik, M. (2001). Glossary. En *Immunobiology: The immune system in health and disease*, (New York, NY: Garland Science), p.
- Jenkins, J.A., Breiteneder, H., y Mills, E.N.C. (2007). Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 1399-1405.
- Jeong, K.Y., Park, J.W., y Hong, C.S. (2012). House dust mite allergy in Korea: The most important inhalant allergen in current and future. *Allergy, Asthma and Immunology Research* 4, 313-325.
- Jiz, M., Friedman, J.F., Leenstra, T., Jarilla, B., Pablo, A., Langdon, G., Pond-Tor, S., Wu, H.W., Manalo, D., Olveda, R., *et al.*, (2009). Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG4. *Infection and Immunity* 77, 2051-2058.
- Johansson, E., Aponno, M., Lundberg, M., y van Hage-Hamsten, M. (2001). Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 56, 660-666.
- Jurado, J., Fuentes-Almagro, C.A., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Esteban, M.Á., y Prieto-Álamo, M.J. (2015). Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Proteomics* 120, 21-34.
- Kabbua, T., Anwised, P., Boonmee, A., Subedi, B.P., Pierce, B.S., y Thammasirirak, S. (2014). Autoinduction, purification, and characterization of soluble alpha-globin chains of crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 103, 56-63.
- Kadam, K., Sawant, S., Jayaraman, V.K., y Kulkarni-kale, U. (2016). Databases and algorithms in allergen informatics. En *Bioinformatics - Updated Features and Applications*, pp. 53-84.
- van Kampen, V., Liebers, V., Sander, I., Chen, Z., Baur, X., Raulf-Heimsoth, M., y Falkenberg, F.W. (2001). B-cell epitopes of the allergen Chi t 1.01: peptide mapping of epitopes recognized by rabbit, murine, and human antibodies. *Allergy* 56, 118-125.
- Kanneganti, K., Makker, J.S., y Remy, P. (2013). *Ascaris lumbricoides*: To expect the unexpected during a routine colonoscopy. *Case Reports in Medicine* 2013, 579464.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Schohn, H., Feldman, L., Mallie, J.P., y Gueant, J.L. (1993). Abnormalities in histamine pharmacodynamics in chronic urticaria. *Clinical and Experimental Allergy* 23, 1015-1020.
- Karkhah, A., y Amani, J. (2016). A potent multivalent vaccine for modulation of immune system in atherosclerosis: an *in silico* approach. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 5, 50-59.
- Kasperska-Zajac, A., Sztylec, J., Machura, E., y Jop, G. (2011). Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clinical and Experimental Allergy* 41, 1386-1391.
- Kasuya, S., y Koga, K. (1992). Significance of detection of specific IgE in *Anisakis*-related diseases.

- Japanese Journal of Allergology* 41, 106-110.
- Kasuya, S., Hamano, H., y Izumi, S. (1990). Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *The Lancet* 335, 665.
- Kelly, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., y Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols* 10, 845-858.
- Khan, A.R., y Fallon, P.G. (2013). Helminth therapies: Translating the unknown unknowns to known knowns. *International Journal for Parasitology* 43, 293-299.
- Khora, S.S. (2016). Seafood-Associated Shellfish Allergy: A Comprehensive Review. *Immunological Investigations* 139, 1-27.
- Kim, J., Jo, J.O., Choi, S.H., Cho, M.K., Yu, H.S., Cha, H.J., y Ock, M. (2011). Seroprevalence of antibodies against *Anisakis simplex* larvae among health-examined residents in three hospitals of southern parts of Korea. *Korean Journal of Parasitology* 49, 139-144.
- Klimpel, S., Palm, H.W., Rückert, S., y Piatkowski, U. (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology Research* 94, 1-9.
- Kobayashi, Y., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2007a). Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitology Research* 100, 1233-1241.
- Kobayashi, Y., Shimakura, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2007b). Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 155, 138-145.
- Kobayashi, Y., Ohsaki, K., Ikeda, K., Kakemoto, S., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2011). Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitology International* 60, 144-150.
- Kobayashi, Y., Kakemoto, S., Shimakura, K., y Shiomi, K. (2015). Molecular cloning and expression of a new major allergen, Ani s 14 from *Anisakis simplex*. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 56, 194-199.
- Kobayashi, Y., Akiyama, H., Hüge, J., Kubota, H., Chikazawa, S., Satoh, T., Miyake, T., Uhara, H., Okuyama, R., Nakagawara, R., *et al.*, (2016). Fish collagen is an important panallergen in the Japanese population. *Allergy* 71, 720-723.
- Køie, M. (2001). Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Parasitology Research* 87, 32-36.
- Køie, M., Berland, B., y Burt, M.D.B. (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 134-139.
- Komericki, P., Klein, G., Reider, N., Hawranek, T., Strimitzer, T., Lang, R., Kranzelbinder, B., y Aberer, W. (2011). Histamine intolerance: Lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: A randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wiener Klinische Wochenschrift* 123, 15-20.
- Krawczyk, K., Liu, X., Baker, T., Shi, J., y Deane, C.M. (2014). Improving B-cell epitope prediction and its application to global antibody-antigen docking. *Bioinformatics* 30, 2288-2294.
- Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O., y Nielsen, M. (2012). Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Computational Biology* 8, e1002829.
- Kringelum, J.V., Nielsen, M., Padkjær, S.B., y Lund, O. (2013). Structural analysis of B-cell epitopes in

- antibody:protein complexes. *Molecular Immunology* 53, 24-34.
- Kuehn, A., Swoboda, I., Arumugam, K., Hilger, C., y Hentges, F. (2014). Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Frontiers in Immunology* 5, 1-8.
- Kulathunga, D.G.R.S., Wickramasinghe, S., Rajapakse, R.P.V.J., Yatawara, L., Jayaweera, W.R., y Agatsuma, T. (2012). Immunolocalization of arginine kinase (AK) in *Toxocara canis*, *Toxocara vitulorum*, and *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology Research* 111, 663-671.
- Kumar, S., y Hedges, S.B. (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 392, 917-920.
- La, D., Esquivel-Rodríguez, J., Venkatraman, V., Li, B., Sael, L., Ueng, S., Ahrendt, S., y Kihara, D. (2009). 3D-SURFER: software for high-throughput protein surface comparison and analysis. *Bioinformatics* 25, 2843-2844.
- De la Rosa-Trevín, J.M., Otón, J., Marabini, R., Zaldívar, A., Vargas, J., Carazo, J.M., y Sorzano, C.O.S. (2013). Xmipp 3.0: An improved software suite for image processing in electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 184, 321-328.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.*, (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., y Pelletier, S.L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. En *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*, S.E. Harding, A.J. Rowe, y J.C. Horton, eds. (Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry), pp. 90-125.
- Le, S.Q., y Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307-1320.
- Leles, D., Gardner, S.L., Reinhard, K., Iñiguez, A., y Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites and Vectors* 5, 42.
- Lessof, M.H., Gant, V., Hinuma, K., Murphy, G.M., y Dowling, R.H. (1990). Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity. *Clinical and Experimental Allergy* 20, 373-376.
- Lessof, M.H., Kemeny, D.M., y Price, J.F. (1991). IgG antibodies to food in health and disease. *Allergy Proceedings* 12, 305-307.
- Leung, N.Y.H., Wai, C.Y.Y., Shu, S., Wang, J., Kenny, T.P., Chu, K.H., y Leung, P.S.C. (2014). Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 46, 180-197.
- Li, B., Turuvekere, S., Agrawal, M., La, D., Ramani, K., y Kihara, D. (2008). Characterization of local geometry of protein surfaces with the visibility criterion. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 71, 670-683.
- Lin, A.H., Nepstad, I., Florvaag, E., Egaas, E., y Van Do, T. (2014). An extended study of seroprevalence of anti-*Anisakis simplex* IgE antibodies in norwegian blood donors. *Scandinavian Journal of Immunology* 79, 61-67.
- Liu, R., Holck, A.L., Yang, E., Liu, C., y Xue, W. (2013). Tropomyosin from tilapia (*Oreochromis mossambicus*) as an allergen. *Clinical and Experimental Allergy* 43, 365-377.
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S.K., Zhu, H., Wu, Z., y Hou, Y. (2012). Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *Journal of Nutrition* 142, 2017-2024.
- Liu, Z., Xia, L., Wu, Y., Xia, Q., Chen, J., y Roux, K.H. (2009). Identification and characterization of an

- arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *International Archives of Allergy and Immunology* 150, 8-14.
- López-Matas, M.A., de Larramendi, C.H., Moya, R., Sánchez-Guerrero, I., Ferrer, A., Huertas, A.J., Flores, I., Navarro, L.A., García-Abujeta, J.L., Vicario, S., *et al.*, (2016). *In vivo* diagnosis with purified tropomyosin in mite and shellfish allergic patients. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 116, 538-543.
- Loreille, O., y Bouchet, F. (2003). Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 39-46.
- Lorenzo, S., Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Ansotegui, I.J., García, M., y Fernández de Corres, L. (2000a). Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 55, 627-633.
- Lorenzo, S., Romarís, F., Iglesias, R., Audicana, M.T., Alonso, J.M., Leiro, J., y Ubeira, F.M. (2000b). O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clinical and Experimental Allergy* 30, 551-559.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., y Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6, 666-677.
- Magnaval, J.F., Fabre, R., Maurières, P., Charlet, J.P., y De Larrard, B. (1992). Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2269-2274.
- MAGRAMA (2014). Mercado de los crustáceos - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General de Pesca (Madrid (España)).
- Mahajan, A., Youssef, L.A., Cleyrat, C., Grattan, R., Lucero, S.R., Mattison, C.P., Erasmus, M.F., Jacobson, B., Tapia, L., Hlavacek, W.S., *et al.*, (2016). Allergen valency, dose, and FcεRI occupancy set thresholds for secretory responses to Pen a 1 and motivate design of hypoallergens. *The Journal of Immunology* 1601334.
- Mahesh, S.P., Li, Z., Buggage, R., Mor, F., Cohen, I.R., Chew, E.Y., y Nussenblatt, R.B. (2005). Alpha tropomyosin as a self-antigen in patients with Behçet's disease. *Clinical and Experimental Immunology* 140, 368-375.
- Maintz, L., y Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition* 85, 1185-1196.
- Maintz, L., Benfadal, S., Allam, J.P., Hagemann, T., Fimmers, R., y Novak, N. (2006). Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 1106-1112.
- Maldonado, J., Hita, L.M., Sáez, V.D., Almendros, I.M., López, A.V., y Bueno, M.C. (2004). Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex s. l.* and other ascarid nematodes. *Parasite* 11, 219-223.
- Manfredi, M.T., Crosa, G., Galli, P., y Ganduglia, S. (2000). Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitology Research* 86, 551-553.
- Martin, R.M., Gasser, R.B., Jones, M.K., y Lightowers, M.W. (1995). Identification and characterization of myophilin, a muscle-specific antigen of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 70, 139-148.
- Martin, R.M., Colebrook, A.L., Gasser, R.B., y Lightowers, M.W. (1996). Antibody responses of patients with cystic hydatid disease to recombinant myophilin of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica* 61, 307-314.
- Martin, R.M., Chilton, N.B., Lightowers, M.W., y Gasser, R.B. (1997a). *Echinococcus granulosus* myophilin-Relationship with protein homologues containing «calponin motifs». *International*

Journal for Parasitology 27, 1561-1567.

- Martin, R.M., Csar, X.F., Gasser, R.B., Felleisen, R., y Lightowlers, M.W. (1997b). Myophilin of *Echinococcus granulosus*: isoforms and phosphorylation by protein kinase C. *Parasitology* 115, 205-211.
- Martínez-Aranguren, R.M., Gamboa, P.M., García-Lirio, E., Asturias, J., Goikoetxea, M.J., y Sanz, M.L. (2014). *In vivo* and *in vitro* testing with rAni s 1 can facilitate diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 24, 431-438.
- Maslowski, K.M., y Mackay, C.R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology* 12, 5-9.
- Mattiucci, S., y D'Amelio, S. (2014). Anisakiasis. En *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*, F. Bruschi, ed. (Wien: Springer-Verlag), pp. 325-365.
- Mattiucci, S., y Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology* 66, 47-148.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., y Webb, S.C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: Morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74, 199-217.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S.C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D.I., y Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology* 100, 199-214.
- Maung, M. (1975). An ascaridoid nematode from a hippopotamus. *International Journal for Parasitology* 5, 431-439.
- McKenna, O.E., Asam, C., R. Araujo, G., Roulias, A., Goulart, L.R., y Ferreira, F. (2016). How relevant is panallergen sensitisation in the development of allergies? *Pediatric Allergy and Immunology* 27, 560-568.
- Mikita, C.P., y Padlan, E.A. (2007). Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin of certain animals than to that of others? *Medical Hypotheses* 69, 1070-1073.
- Minkiewicz, P., Sokolowska, J., y Darewicz, M. (2015). The occurrence of sequences identical with epitopes from the allergen Pen a 1.0102 among food and non-food proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 65, 21-29.
- Minning, D.M., y Goldberg, D.E. (1998). Determinants of *Ascaris* hemoglobin octamer formation. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 32644-32649.
- Mirza, Z.K., Sastri, B., Lin, J.J.-C., Amenta, P.S., y Das, K.M. (2006). Autoimmunity against human tropomyosin isoforms in ulcerative colitis: localization of specific human tropomyosin isoforms in the intestine and extraintestinal organs. *Inflammatory Bowel Diseases* 12, 1036-1043.
- Mlynek, A., Zalewska-Janowska, A., Martus, P., Staubach, P., Zuberbier, T., y Maurer, M. (2008). How to assess disease activity in patients with chronic urticaria? *Allergy* 63, 777-780.
- Moens, L., y Kondo, M. (1976). The structure of *Artemia salina* haemoglobins. A comparative characterisation of four naupliar and adult haemoglobins. *European journal of biochemistry / FEBS* 67, 397-402.
- Moens, L., y Kondo, M. (1978). Evidence for a dimeric form of *Artemia salina* extracellular hemoglobins with high-molecular-weight subunits. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 82, 65-72.
- Mondovi, B., Fogel, W.A., Federico, R., Calinescu, C., Mateescu, M.A., Rosa, A.C., y Masini, E. (2013). Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. *Recent Patents on*

Inflammation and Allergy Drug Discovery 7, 20-34.

- Moneo, I., Audicana, M., Alday, E., Curiel, G., del Pozo, M., y García, M. (1997). Periodate treatment of *Anisakis simplex* allergens. *Allergy* 52, 565-569.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Gómez, F., Ortega, E., y Alonso, M.J. (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, 177-182.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I., Rodríguez-Perez, R., y Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research* 96, 285-289.
- Mourad, A.A., y Bahna, S.L. (2015). Fish-allergic patients may be able to eat fish. *Expert Reviews Clinical Immunology* 11, 419-430.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K., y Kai, A. (2011). Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (*Nematoda: Anisakidae*) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitology International* 60, 193-198.
- Mušič, E., Korošec, P., Šilar, M., Adamič, K., Košnik, M., y Rijavec, M. (2013). Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wiener Klinische Wochenschrift* 125, 239-243.
- Myrset, H.R., Barletta, B., Di Felice, G., Egaas, E., y Dooper, M.M.B.W. (2013). Structural and immunological characterization of recombinant pan b 1, a major allergen of Northern Shrimp, *Pandalus borealis*. *International Archives of Allergy and Immunology* 160, 221-232.
- Nagasawa, K. (1990). The life cycle of *Anisakis simplex*: A review. En *Intestinal anisakiasis in Japan*, H. Ishikura, y K. Kikuchi, eds. (Tokyo: Springer-Verlag), pp. 31-40.
- Nagataki, M., Uda, K., Jarilla, B.R., Tokuhiro, S., Wickramasinghe, S., Suzuki, T., Blair, D., y Agatsuma, T. (2012). Molecular and catalytic properties of an arginine kinase from the nematode *Ascaris suum*. *Journal of Helminthology* 86, 276-286.
- Nakamura, A., Watanabe, K., Ojima, T., Ahn, D.H., y Saeki, H. (2005). Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7559-7564.
- Nakamura, A., Sasaki, F., Watanabe, K., Ojima, T., Ahn, D.H., y Saeki, H. (2006). Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9529-9534.
- Nakane, H., Sonobe, Y., Watanabe, T., y Nakano, K. (2004). Histamine: its novel role as an endogenous regulator of Con A-dependent T cell proliferation. *Inflammation Research* 53, 324-328.
- Nayak, A.P., Green, B.J., Sussman, G., Berlin, N., Lata, H., Chandra, S., Elsohly, M.A., Hettick, J.M., y Beezhold, D.H. (2013). Characterization of *Cannabis sativa* allergens. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 111, 32-37.
- Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics* (New York, NY: Oxford University Press).
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.*, (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367-1370.
- Nicholas, K.B., y Nicholas Jr., H.B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Nielsen, M., y Marcatili, P. (2015). Prediction of antibody epitopes. *Methods in Molecular Biology* 1348, 23-32.
- Nieuwenhuizen, N.E., y Lopata, A.L. (2013). *Anisakis* - A food-borne parasite that triggers allergic host defences. *International Journal for Parasitology* 43, 1047-1057.

- Nieuwenhuizen, N., Lopata, A.L., Jeebhay, M.F., Herbert, D.R., Robins, T.G., y Brombacher, F. (2006). Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 1098-1105.
- Nieuwenhuizen, N.E., Meter, J.M., Horsnell, W.G., Hoving, J.C., Fick, L., Sharp, M.F., Darby, M.G., Parihar, S.P., Brombacher, F., y Lopata, A.L. (2013). A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2395.
- Novy, R., y Morris, B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pET System. *inNovations* 13, 8-10.
- Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews* 11, A479-A485.
- Oettgen, H.C. (2016). Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137, 1631-1645.
- Oliver, A.P., Esteban, M.M., Pascual, V.C., Suárez, V.M., y Canales, E.T. (2007). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. *Revista del Comité científico de la AESAN* 6, 59-65.
- Olsson, M.H.M., Søndergaard, C.R., Rostkowski, M., y Jensen, J.H. (2011). PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7, 525-537.
- Onuma, E.K., Amenta, P.S., Ramaswamy, K., Lin, J.J.C., y Das, K.M. (2000). Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): A predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5. *Clinical and Experimental Immunology* 121, 466-471.
- Van Oort, E., De Heer, P.G., Dieker, M., Van Leeuwen, A.W., Aalberse, R.C., y Van Ree, R. (2004). Characterization of natural Dac g 1 variants: An alternative to recombinant group 1 allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, 1124-1130.
- van Oss, C.J. (1995). Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molecular Immunology* 32, 199-211.
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U.C., Akdis, M., y Akdis, C.A. (2011). Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clinical and Experimental Allergy* 41, 1226-1234.
- Paccione-Basmadji, N., Coronas-Serna, J.M., Rodríguez-Castro, L., Cuéllar, C., y González-Fernández, J. (2014). Patrones de inmuno-reconocimiento de IgA sérica frente a moluscos en sueros de pacientes positivos a *Anisakis simplex*. *Reduca* 6, 98-102.
- Park, J.Y., An, Y.-R., Kanda, N., An, C.-M., An, H.S., Kang, J.-H., Kim, E.M., An, D.-H., Jung, H., Joung, M., et al., (2015). Cetaceans evolution: insights from the genome sequences of common minke whales. *BMC Genomics* 16, 13.
- Pascal, M., Grishina, G., Yang, A.C., Sánchez-García, S., Lin, J., Towle, D., Ibañez, M.D., Sastre, J., Sampson, H.A., y Ayuso, R. (2015). Molecular diagnosis of shrimp allergy: Efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 3, 521-529.
- Pascual, C.Y., Crespo, J.F., San Martín, S., Ornia, N., Ortega, N., Caballero, T., Muñoz-Pereira, M., y Martín-Esteban, M. (1997). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy* 52, 514-520.
- Pazos, M., Méndez, L., Vázquez, M., y Aubourg, S.P. (2015). Proteomics analysis in frozen horse mackerel previously high-pressure processed. *Food Chemistry* 185, 495-502.
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología* 18, 265-267.

- Peng, H., Song, K., Huang, C., Ye, S., Song, H., Hu, W., Han, Z., McManus, D.P., Zhao, G., y Zhang, Q. (2008). Expression, immunolocalization and serodiagnostic value of a myophilin-like protein from *Schistosoma japonicum*. *Experimental Parasitology* 119, 117-124.
- Pereira, C.A. (2014). Arginine Kinase: A potential pharmacological target in trypanosomiasis. *Infectious Disorders* 14, 30-36.
- Pérez-Pérez, J., Fernández-Caldas, E., Marañón, F., Sastre, J., Bernal, M.L., Rodríguez, J., y Bedate, C.A. (2000). Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology* 123, 120-129.
- Perteguer, M.J., Águila, C., Fenoy, S., Guillén, J.L., y Cuéllar, C. (2003a). Cross-reactivity induced by *Anisakis simplex* and *Toxocara canis* in mice. *Journal of Helminthology* 77, 331-334.
- Perteguer, M.J., Cuéllar, C., Guillén, J.L., Águila, C., Fenoy, S., Chivato, T., y Laguna, R. (2003b). Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Tropica* 89, 85-89.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8, 785-786.
- Picó-Durán, G., Pulleiro-Potel, L., Abollo, E., Pascual, S., y Muñoz, P. (2016). Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial cephalopods from the Spanish Mediterranean coast. *Veterinary Parasitology* 220, 47-53.
- Polimeno, L., Loiacono, M., Pesetti, B., Mallamaci, R., Mastrodonato, M., Azzarone, A., Annoscia, E., Gatti, F., Amoruso, A., y Ventura, M.T. (2010). Anisakiasis, an underestimated infection: effect on intestinal permeability of *Anisakis simplex*-sensitized patients. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 809-814.
- Ponce De León, P., Foresto, P., y Valverde, J. (2010). *Ascaris lumbricoides*: Molecular mimicry by P1 epitope absorption. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 44, 253-257.
- Poulain-Godefroy, O., Gaubert, S., Lafitte, S., Capron, A., y Grzych, J.M. (1996). Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: Stimulatory role of egg antigens. *Infection and Immunity* 64, 763-768.
- Del Pozo, M., Díez, J., Fernández, E., Audicana, M., Muñoz, D., y Corres, L.F. de (1996). Prevalence of sensitization to *Anisakis simplex* (a parasitizing fish nematode). *Allergy* 51 supl.31, 53.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., y Piantanida, M. (2012). *Anisakis simplex*: current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 44, 150-156.
- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 28, 1547-1560.
- Prester, L. (2015). Seafood allergy, toxicity, and intolerance: a review. *Journal of the American College of Nutrition* 7, 1-13.
- PROSITE documentation PDOC00018 (2006). EF-hand calcium-binding domain signature and profile.
- Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F.M., y Cuéllar, C. (2008). *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Experimental Parasitology* 118, 271-274.
- Quiazon, K.M. a, Yoshinaga, T., Ogawa, K., y Yukami, R. (2008). Morphological differences between larvae and *in vitro*-cultured adults of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International* 57, 483-489.
- Quiazon, K.M. a, Zenke, K., y Yoshinaga, T. (2013). Molecular characterization and comparison of four *Anisakis* allergens between *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* from Japan.

Molecular and Biochemical Parasitology 190, 23-26.

- Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R.E., Larsen, J.N., Lidholm, J., Pomés, A., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Thomas, W.R., *et al.*, (2014). Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy* 69, 413-419.
- Rajakulasingam, K., Durham, S.R., O'Brien, F., Humbert, M., Barata, L.T., Reece, L., Kay, A.B., y Grant, J.A. (1997). Enhanced expression of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha chain in human allergen-induced rhinitis with co-localization to mast cells, macrophages, eosinophils, and dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100, 78-86.
- Reese, G., Ayuso, R., y Lehrer, S.B. (1999). Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *International Archives of Allergy and Immunology* 119, 247-258.
- Restani, P., Ballabio, C., Tripodi, S., y Fiocchi, A. (2009). Meat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 265-269.
- Del Rey Moreno, A., Valero, A., Mayorga, C., Gómez, B., Torres, M.J., Hernández, J., Ortiz, M., y Lozano Maldonado, J. (2006). Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Tropica* 97, 265-269.
- Robin, Y. (1974). Phosphagens and molecular evolution in worms. *Biosystems* 6, 49-56.
- Rodríguez, E., Anadón, A.M., García-Bodas, E., Romarís, F., Iglesias, R., Gárate, T., y Ubeira, F.M. (2008). Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy* 63, 219-225.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., Gomez-Aguado, F., Rodríguez-Perez, R., Corcuera, M.T., Caballero, M.L., y Moneo, I. (2007). Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *International Journal for Parasitology* 37, 907-917.
- Rodríguez-Pérez, R., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A., y Moneo, I. (2007). Cloning and expression of a biologically active *Anisakis simplex* allergen Ani s 1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and biochemical parasitology* 154, 115-118.
- Rodríguez-Pérez, R., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A., y Caballero, M.L. (2008). Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 159, 92-97.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., *et al.*, (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, 638-646.
- Rook, G.A.W. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 126, 3-11.
- Rosmilah, M., Shahnaz, M., Zailatul, H.M.Y., Noormalin, A., y Normilah, I. (2012). Identification of tropomyosin and arginine kinase as major allergens of *Portunus pelagicus* (blue swimming crab). *Tropical Biomedicine* 29, 467-478.
- Rossmann, M.G. (2009). Chapter 3: Recollection of the events leading to the discovery of the structure of haemoglobin. *Journal of Molecular Biology* 392, 23-32.
- Rouvinen, J., Jänis, J., Laukkanen, M.-L., Jylhä, S., Niemi, M., Päivinen, T., Mäkinen-Kiljunen, S., Haahtela, T., Söderlund, H., y Takkinen, K. (2010). Transient Dimers of Allergens. *PLoS One* 5, e9037.
- Ruan, W.-W., Cao, M.-J., Chen, F., Cai, Q.-F., Su, W.-J., Wang, Y.-Z., y Liu, G.-M. (2013). Tropomyosin contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate but not to enzymatic deglycosylation. *Journal of Food Science* 78, C1116-C1121.
- Rubtsova, K., Marrack, P., y Rubtsov, A. V (2014). TLR7, IFN gamma, and T-bet: Their roles in the

- development of ABCs in female-biased autoimmunity. *Cellular Immunology* 294, 80-83.
- Rudge, J.F., Kleine, T., y Bourdon, B. (2010). Broad bounds on Earth's accretion and core formation constrained by geochemical models. *Nature Geoscience* 3, 439-443.
- Rzhetsky, A., y Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9, 945-967.
- Sael, L., y Kihara, D. (2009). Protein surface representation and comparison: New approaches in structural proteomics (Chapman & Hall/CRC).
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Salaman, M.R., y Warwicker, J. (2005). Anomalies in the ionic properties of serum albumin. *Proteins* 61, 468-472.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sánchez-Andrade, R., Sánchez-Andradea, A., Suárez, J.L., Arias, M., Francisco, I., Díez, C., Romasanta, A., Morrondo, P., Díez-Baños, P., y Paz-Silva, A. (2009). Relationship among presence of antibodies against *Ascaris suum*, eosinophilia and autoantibodies (IgM-RM). *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 7, 57-62.
- Sánchez-Monsalvez, I., De Armas-Serra, C., Martínez, J., Dorado, M., Sánchez, A., y Rodríguez-Caabeiro, F. (2005). A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. *Journal of Food Protection* 68, 1066-1072.
- Sánchez-Monsalvez, I., De Armas-Serrá, C., Bernadina, W., y Rodríguez-Caabeiro, F. (2003). Altered autonomic control in rat intestine due to both infection with *Anisakis simplex* and incubation with the parasite's crude extract. *Digestive Diseases and Sciences* 48, 2342-2352.
- Santiago, H.D.C., Bennuru, S., Ribeiro, J.M.C., y Nutman, T.B. (2012). Structural differences between human proteins and aero- and microbial allergens define allergenicity. *PLoS One* 7, e40552.
- dos Santos, J.C., Azor, M.H., Nojima, V.Y., Lourenço, F.D., Prearo, E., Maruta, C.W., Rivitti, E.A., da Silva Duarte, A.J., y Sato, M.N. (2008). Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *International Immunopharmacology* 8, 1433-1440.
- Sastre, J., Lluch-Bernal, M., Quirce, S., Arrieta, I., Lahoz, C., Del Amo, A., Fernández-Caldas, E., y Marañón, F. (2000). A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy* 55, 560-564.
- Schauer, U., Stemberg, F., Rieger, C.H.L., Borte, M., Schubert, S., Riedel, F., Herz, U., Renz, H., Wick, M., Carr-Smith, H.D., *et al.*, (2003). IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. *Clinical Chemistry* 49, 1924-1929.
- Schechter, A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112, 3927-3938.
- Schevzov, G., Whittaker, S.P., Fath, T., Lin, J.J., y Gunning, P.W. (2011). Tropomyosin isoforms and reagents. *Bioarchitecture* 1, 135-164.
- Schmid-Grendelmeier, P., Holzmann, D., Himly, M., Weichel, M., Tresch, S., Rückert, B., Menz, G., Ferreira, F., Blaser, K., Wüthrich, B., *et al.*, (2003). Native Art v 1 and recombinant art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated *in vitro* and *in vivo* responses in mugwort allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 1328-1336.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity

- ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal* 78, 1606-1619.
- Schwelberger, H.G. (2010). Histamine intolerance: A metabolic disease? *Inflammation Research* 59, S219-S221.
- Schwelberger, H.G., y Bodner, E. (1997). Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1340, 152-164.
- Schwelberger, H.G., Hittmair, A., y Kohlwein, S.D. (1998). Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflammation Research* 47, S60-S61.
- Sereda, M.J., Hartmann, S., y Lucius, R. (2008). Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends in Parasitology* 24, 272-278.
- Sereda, M.J., Hartmann, S., Büttner, D.W., Volkmer, R., Hovestädt, M., Brattig, N., y Lucius, R. (2010). Characterization of the allergen filarial tropomyosin with an invertebrate specific monoclonal antibody. *Acta Tropica* 116, 61-67.
- Shanti, K.N., Martin, B.M., Nagpal, S., Metcalfe, D.D., y Rao, P.V.S. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *Journal of Immunology* 151, 5354-5363.
- Shimakura, K., Miura, H., Ikeda, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shirai, T., Kasuya, S., y Shiomi, K. (2004). Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 135, 69-75.
- de Silva, N.R., Brooker, S., Hotez, P.J., Montresor, A., Engels, D., y Savioli, L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology* 19, 547-551.
- Simons, F.E.R., Arduoso, L.R.F., Bil, M.B., El-Gamal, Y.M., Ledford, D.K., Ring, J., Sanchez-Borges, M., Senna, G.E., Sheikh, A., y Thong, B.Y. (2011). World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: Summary. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 587-593.
- Sletten, G., Van Do, T., Lindvik, H., Egaas, E., y Florvaag, E. (2010). Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species. *International Archives of Allergy and Immunology* 151, 223-236.
- Smeesters, P.R., McMillan, D.J., y Sriprakash, K.S. (2010). The streptococcal M protein: A highly versatile molecule. *Trends in Microbiology* 18, 275-282.
- Smith, J.W., y Wootten, R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in Parasitology* 16, 93-163.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., y Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- Sneath, P.H.A., y Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification (San Francisco: W.H. Freeman and Company).
- Söding, J., Biegert, A., y Lupas, A.N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research* 33, W244-W248.
- Sohn, M.H., y Kim, K.E. (2012). The cockroach and allergic diseases. *Allergy, Asthma and Immunology Research* 4, 264-269.
- Song, W.-B., Lv, Y.-H., Zhang, Z.-S., Li, Y.-N., Xiao, L.-P., Yu, X.-P., Wang, Y.-Y., Ji, H.-L., y Ma, L. (2009). Soluble intercellular adhesion molecule-1, D-lactate and diamine oxidase in patients with inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 15, 3916-3919.
- Sookrung, N., Diraphat, P., Chaicumpa, W., Tongtawe, P., Sakolvaree, Y., Tapchaisri, P., Mahakittikun, V., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., y Bunnag, C. (2003). Cockroach allergen detection and cockroach allergens of allergic Thai patients. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 21, 1-9.

- Sookrung, N., Chaicumpa, W., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., Bunnag, C., Ramasoota, P., Tongtawe, P., Sakolvaree, Y., y Tapchaisri, P. (2006). *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Environmental Health Perspectives* 114, 875-880.
- Sookrung, N., Choopong, J., Seesuy, W., Indrawattana, N., y Chaicumpa, W. (2016). Allergenicity of native and recombinant major allergen groups 1 and 2 of *Dermatophagoides* mites in mite sensitive Thai patients. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 34, 51-58.
- Sorzano, C.O.S., Bilbao-Castro, J.R., Shkolnisky, Y., Alcorlo, M., Melero, R., Caffarena-Fernández, G., Li, M., Xu, G., Marabini, R., y Carazo, J.M. (2010). A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 171, 197-206.
- Sousa, A.D., y Farah, C.S. (2002). Quantitative analysis of tropomyosin linear polymerization equilibrium as a function of ionic strength. *The Journal of biological chemistry* 277, 2081-2088.
- Souty-Grosset, C., Anastácio, P.M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., y Tricarico, E. (2016). The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologica* 58, 78-93.
- Stapel, S.O., Asero, R., Ballmer-Weber, B.K., Knol, E.F., Strobel, S., Vieths, S., y Kleine-Tebbe, J. (2008). Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 63, 793-796.
- Stentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.-B.G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., *et al.*, (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal* 32, 1478-1488.
- Steigemann, W., y Weber, E. (1979). Structure of erythrocrucorin in different ligand states refined at 1,4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 127, 309-338.
- Stewart, M. (2001). Structural basis for bending tropomyosin around actin in muscle thin filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8165-8166.
- Strandberg, B. (2009). Chapter 1: Building the ground for the first two protein structures: myoglobin and haemoglobin. *Journal of Molecular Biology* 392, 2-10.
- Strauss, J.D., y Murphy, R.A. (1996). Regulation of cross-bridge cycling in smooth muscle. En *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*, M. Bárány, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 341-353.
- Su, S.N., Peng, H.J., Yang, S.Y., Tsai, L.C., Chow, L.P., y Huang, S.W. (2003). Purification and characterization of a novel isoallergen of a major Bermuda grass pollen allergen, Cyn d 1. *Journal of Biomedical Science* 10, 111-119.
- Sugimachi, K., Inokuchi, K., Ooiwa, T., Fujino, T., y Ishii, Y. (1985). Acute Gastric Anisakiasis. Analysis of 178 cases. *The Journal of the American Medical Association* 253, 1012-1013.
- Sultan, K., Omar, M., Desouky, A.Y., y El-Seify, M.A. (2015). Molecular and phylogenetic study on *Toxocara vitulorum* from cattle in the mid-Delta of Egypt. *Journal of Parasitic Diseases* 39, 584-587.
- Sumida, J.P., Wu, E., y Lehrer, S.S. (2008). Conserved Asp-137 imparts flexibility to tropomyosin and affects function. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 6728-6734.
- Sun, P., Ju, H., Liu, Z., Ning, Q., Zhang, J., Zhao, X., Huang, Y., Ma, Z., y Li, Y. (2013). Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2013, 943636.
- Suzuki, T., y Ishida, K. (1979). *Anisakis simplex* and *Anisakis physeteris*: Physicochemical properties of larval and adult hemoglobins. *Experimental Parasitology* 48, 225-234.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tandon, R. (2014). Preventing rheumatic fever: M-protein based vaccine. *Indian Heart Journal* 66, 64-67.
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., y Ludtke, S.J. (2007). EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 157, 38-46.
- Taylor, S.L. (2008). Molluscan Shellfish Allergy. *Advances in Food and Nutrition Research* 54, 141-165.
- Thein, S.L. (2011). Milestones in the history of hemoglobin research (In memory of Professor Titus H.J. Huisman). *Hemoglobin* 35, 450-462.
- ThermoScientific (2011). NanoDrop: Assessment of nucleic acid purity. *Protocols and Product Manuals* T042, 1-2.
- Thewissen, J.G.M., Cooper, L.N., Clementz, M.T., Bajpai, S., y Tiwari, B.N. (2007). Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature* 450, 1190-1194.
- van Thiel, P. (1962). Anisakiasis (Abstract). *Parasitology* 52, 16P-17P.
- Torsten, O., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., *et al.*, (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489-493.
- Tsabouri, S., Triga, M., Makris, M., Kalogeromitros, D., Church, M.K., y Priftis, K.N. (2012). Fish and shellfish allergy in children: review of a persistent food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 23, 608-615.
- Tsai, L.C., Chao, P.L., Hung, M.W., Sun, Y.C., Kuo, I.C., Chua, K.Y., y Liaw, S.H. (2000). Protein sequence analysis and mapping of IgE and IgG epitopes of an allergenic 98-kDa *Dermatophagoides farinae* paramyosin, Der f 11. *Allergy* 55, 141-147.
- Turner, J.D., Faulkner, H., Kamgno, J., Kennedy, M.W., Behnke, J., Boussinesq, M., y Bradley, J.E. (2005). Allergen-specific IgE and IgG4 are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. *Microbes and Infection* 7, 990-996.
- Tyagi, N., Farnell, E.J., Fitzsimmons, C.M., Ryan, S., Tukahebwa, E., Maizels, R.M., Dunne, D.W., Thornton, J.M., y Furnham, N. (2015). Comparisons of allergenic and metazoan parasite proteins: Allergy the price of immunity. *PLoS Computational Biology* 11, 1-24.
- Ubeira, F.M., Anadón, A.M., Salgado, A., Carvajal, A., Ortega, S., Aguirre, C., López-Goikoetxea, M.J., Ibanez, L., y Figueiras, A. (2011). Synergism between prior *Anisakis simplex* infections and intake of NSAIDs, on the risk of upper digestive bleeding: A case-control study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, 1-6.
- Uda, K., Fujimoto, N., Akiyama, Y., Mizuta, K., Tanaka, K., Ellington, W.R., y Suzuki, T. (2006). Evolution of the arginine kinase gene family. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 1, 209-218.
- UE (2004). Reglamento (CE) 853/2004. Normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* L139, 55.
- Umair, S., Knight, J.S., Bland, R.J., y Simpson, H. V. (2013). Molecular and biochemical characterisation of arginine kinases in *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Experimental Parasitology* 134, 362-367.
- Unni, S., Huang, Y., Hanson, R.M., Tobias, M., Krishnan, S., Li, W.W., Nielsen, J.E., y Baker, N.A. (2011). Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *Journal of Computational Chemistry* 32, 1488-1491.
- Untersmayr, E., y Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food

- allergy outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, 1301-1308.
- Usui, M., Harada, A., Ishimaru, T., Sakumichi, E., Saratani, F., Sato-Minami, C., Azakami, H., Miyasaki, T., y Hanaoka, K. (2013). Contribution of structural reversibility to the heat stability of the tropomyosin shrimp allergen. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 948-953.
- Valera Vera, E.A., Sayé, M., Reigada, C., Damasceno, F.S., Silber, A.M., Miranda, M.R., y Pereira, C.A. (2016). Resveratrol inhibits *Trypanosoma cruzi* arginine kinase and exerts a trypanocidal activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 87, 498-503.
- Valero, A., López-Cuello, M. del M., Benítez, R., y Adroher, F.J. (2006). *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitologica* 51, 209-212.
- Vanfleteren, J.R., Van De Peer, Y., Blaxter, M.L., Tweedie, S.A.R., Trotman, C., Lu, L., Van Hauwaert, M.-L., y Moens, L. (1994). Molecular genealogy of some nematode taxa as based on cytochrome c and globin amino acid sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3, 92-101.
- Ventura, M.T., Napolitano, S., Menga, R., Cecere, R., y Asero, R. (2013). *Anisakis simplex* hypersensitivity is associated with chronic urticaria in endemic areas. *International Archives of Allergy and Immunology* 160, 297-300.
- Vickery, B., Scurlock, A., Jones, S., y Burks, A. (2011). Mechanisms of immune tolerance to food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 576-586.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., y Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology* 5, 1-17.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., y Vanfleteren, J.R. (2006). A phylogenomic profile of globins. *BMC Evolutionary Biology* 6, 31.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., y Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research* 47 Suppl. 1, 3-27.
- Vojdani, A. (2009). Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens. *Nutrition and Metabolism* 6, 22.
- Vojdani, A. (2015). Oral tolerance and its relationship to food immunoreactivities. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 21, 23-32.
- Vrhovski, B., Thézé, N., y Thiébaud, P. (2008). Structure and evolution of tropomyosin genes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 644, 6-26.
- Wagner, N., Dirk, D., Peveling-Oberhag, A., Reese, I., Rady-Pizarro, U., Mitzel, H., y Staubach, P. (2016). A Popular myth - low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria - fact or fiction? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*.
- Walker, M.J., Barnett, T.C., McArthur, J.D., Cole, J.N., Gillen, C.M., Henningham, A., Sriprakash, K.S., Sanderson-Smith, M.L., y Nizet, V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 264-301.
- Wammes, L.J., Mpairwe, H., Elliott, A.M., y Yazdanbakhsh, M. (2014). Helminth therapy or elimination: Epidemiological, immunological, and clinical considerations. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 1150-1162.
- Wang, D.Y., Kumar, S., y Hedges, S.B. (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of The Royal Society B* 266, 163-171.
- Wang, H.-W., Ramey, V.H., Westermann, S., Leschziner, A.E., Welburn, J.P.I., Nakajima, Y., Drubin, D.G., Barnes, G., y Nogales, E. (2007). Architecture of the Dam1 kinetochore ring complex and implications for microtubule-driven assembly and force-coupling mechanisms. *Nat. Struct. & Mol.*

Biol. 14, 721-726.

- Wang, X., Li, L., Xu, F., y Zhang, G. (2011). Tropomyosin is a nice marker gene for phylogenetic analysis of molluscs. *Molecular Biology Reports* 38, 4589-4593.
- Weber, R.E., y Vinogradov, S.N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews* 81, 569-628.
- Wickramasinghe, S., Uda, K., Nagataki, M., Yatawara, L., Rajapakse, R.P.V.J., Watanabe, Y., Suzuki, T., y Agatsuma, T. (2007). *Toxocara canis*: Molecular cloning, characterization, expression and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase. *Experimental Parasitology* 117, 124-132.
- Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R.P.V.J., Uda, K., Suzuki, T., y Agatsuma, T. (2008). Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitology Research* 103, 853-858.
- Wittenberg, B.A., Okazaki, T., y Wittenberg, J.B. (1965). The hemoglobin of *Ascaris* perienteric fluid. I. Purification and spectra. *Biochimica et Biophysica Acta* 111, 485-495.
- Woo, C.K., y Bahna, S.L. (2011). Not all shellfish «allergy» is allergy! *Clinical and Translational Allergy* 1, 3.
- Woodward, M.P., Young, W.W., y Bloodgood, R.A. (1985). Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *Journal of Immunological Methods* 78, 143-153.
- Wu, A.Y., y Williams, G.A. (2004). Clinical characteristics and pattern of skin test reactivities in shellfish allergy patients in Hong Kong. *Allergy and Asthma Proceedings* 25, 237-242.
- Wu, L.C., y Zarrin, A.A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature Reviews. Immunology* 14, 247-259.
- Xu, Y., Zheng, Y., Fan, J.S., y Yang, D. (2006). A new strategy for structure determination of large proteins in solution without deuteration. *Nature Methods* 3, 931-937.
- Yadzir, Z., Misnan, R., Abdullah, N., Bakhtiar, F., Arip, M., y Murad, S. (2010). Identification of IgE-binding proteins of raw and cooked extracts of *Loligo edulis* (white squid). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 41, 653-659.
- Yang, J., Kloek, A.P., Goldberg, D.E., y Mathews, S.F. (1995). The structure of *Ascaris* hemoglobin domain I at 2.2 Å resolution: molecular features of oxygen avidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4224-4228.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., y van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296, 490-494.
- Yong, T.-S., Lee, J.-S., Lee, I.-Y., Park, S.-J., Park, G.-M., Ree, H.-I., Park, J.-W., Hong, C.-S., y Park, H.-S. (1999). Identification of *Chironomus kiiensis* allergens, a dominant species of non-biting midges in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 37, 171-179.
- Yu, H.L., Cao, M.J., Cai, Q.F., Weng, W.Y., Su, W.J., y Liu, G.M. (2011). Effects of different processing methods on digestibility of *Scylla paramamosain* allergen (tropomyosin). *Food and Chemical Toxicology* 49, 791-798.
- Zaborsky, N., Brunner, M., Wallner, M., Himly, M., Karl, T., Schwarzenbacher, R., Ferreira, F., y Achatz, G. (2010). Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *Journal of immunology* 184, 725-735.
- Zhu, B., Cai, G., Hall, E.O., y Freeman, G.J. (2007). In-Fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques* 43, 1-6.
- Zohar, I., y Biton, R. (2011). Land, lake, and fish: Investigation of fish remains from Gesher Benot

- Ya'aqov (paleo-Lake Hula). *Journal of Human Evolution* 60, 343-356.
- Zuberbier, T., Aberer, W., Asero, R., Bindslev-Jensen, C., Brzoza, Z., Canonica, G.W., Church, M.K., Ensina, L.F., Giménez-Arnau, A., Godse, K., *et al.*, (2014). The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: The 2013 revision and update. *Allergy* 69, 868-887.
- Zuckerkindl, E., y Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. En *Evolving Genes and Proteins*, V. Bryson, y H.J. Vogel, eds. (New York, NY: Academic Press), pp. 97-166.

ANEXOS

I. Publicaciones y capítulos de libro

Artículos en revistas indexadas

1. **González-Fernández, J.**, Rodero, M., Daschner, A., Cuéllar, C. (2014). New insights into the allergenicity of tropomyosin: a bioinformatics approach. *Molecular Biology Reports* 41, 6509-6517.
2. **González-Fernández, J.**, Daschner, A., Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., De Frutos, C., Valls, A., Cuéllar, C. (2015). Hemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *International Journal for Parasitology* 45, 399-407.
3. Daschner, A., **González-Fernández, J.**, Valls, A., de Frutos, C., Rodero, M., Cuéllar, C. (2015). Diamine oxidase levels in different chronic urticaria phenotypes. *Allergologia et Immunopathologia* 43, 593-600.
4. **González-Fernández, J.**, Veleiro, B., Daschner, A., Cuéllar, C. (2016). Are fish tropomyosins allergens? *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 116, 72-88.
5. **González-Fernández, J.**, Daschner, A., Cuéllar, C. (2016). Allergenicity of vertebrate tropomyosins: challenging an immunological dogma. *Allergologia et Immunopathologia*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.002>.

Capítulos de libro

1. **González-Fernández, J.** (2017). Estudios filogenéticos de los alérgenos de *Anisakis* y su interpretación evolutiva. En *Medicina Evolucionista: Aportaciones Pluridisciplinarias Volumen III*, A. Daschner, J.L. Gómez Pérez, M.J. Trujillo Tiebas, eds. (Madrid: MedEvo), pp. 79-90. ISBN-13: 9781544032979.

New insights into the allergenicity of tropomyosin: a bioinformatics approach

Juan González-Fernández · Marta Rodero ·
Alvaro Daschner · Carmen Cuéllar

Received: 17 April 2013 / Accepted: 19 June 2014 / Published online: 2 July 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The invertebrate panallergen tropomyosin is a protein with an extremely simple folding. This makes it a perfect target for investigating structural differences between invertebrate and vertebrate tropomyosins, which are not considered allergenic. Phylogenetic and sequence analyses were conducted in order to explore the differences in primary structure between several tropomyosins and to promote an experimental development in the field of food allergy, based on the study of tropomyosin. The phylogenetic analyses showed that tropomyosin is a useful evolutionary marker. The phylogenetic trees obtained with tropomyosin were not always phylogenetically correct, but they might be useful for allergen avoidance by tropomyosin allergic individuals. Sequence analyses revealed that the probability of alpha helix folding in invertebrate tropomyosins was lower than in all the studied vertebrate ones, except for the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* tropomyosin. This suggested that the lack of alpha helix folding may be involved in the immunogenicity of tropomyosins. More specifically, the regions adjacent to the positions 133–135 and 201 of the invertebrate tropomyosins, presented lower probability of alpha helix folding than those of vertebrates and are candidates to be responsible for their allergenicity.

Keywords *Anisakis simplex* · Allergy · Bioinformatics · Epitopes · Evolutionary Marker · Tropomyosin

Introduction

The prevalence of food allergies is unknown on a world-wide basis. However, in the United States, the overall prevalence of food allergies has been estimated at 3.5–4 % [1]. Concerning shellfish allergy, the approximate prevalence is estimated at 0.5–2.5 % of the general population [2]. In Spain it is about 0.2–2 % [3]. In spite of the high prevalence of shellfish allergy, there are few treatment options available and avoidance is the only recommended solution. The frequency and severity of reactions after accidental exposure to shellfish make it necessary to improve the knowledge on tropomyosin, which is the major allergen in these foods.

Tropomyosin is an allergenic protein identified as the major shrimp allergen in the 90's [4, 5]. Nowadays, it is also considered a major allergen in decapods [6] and an invertebrate panallergen. Allergenic tropomyosins are found in crustaceans, arachnids, insects, molluscs, and helminths. The amino acid sequence of invertebrate tropomyosins is highly conserved [7]. The allergenic tropomyosins identified so far are shown in Table 1.

Interestingly, vertebrate tropomyosins have generally been found to not be immunogenic in humans and to not cause allergies [8]. However, Liu et al. have recently showed the first allergenic tropomyosin from vertebrates, the fish *Oreochromis mossambicus* [9]. Furthermore, proteins that exhibit more than 63 % sequence identity with their human homologues are rarely allergenic [10]. A further analytical approach should be the assessment of allergenicity of pan-allergens in parasites, which contrary to food allergens could

J. González-Fernández (✉) · M. Rodero · C. Cuéllar
Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
e-mail: quintas_copo@hotmail.com

A. Daschner
Servicio de Alergia, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital
Universitario de La Princesa, 28006 Madrid, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijparaHaemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*

Juan González-Fernández^{a,*}, Alvaro Daschner^b, Natalie E. Nieuwenhuizen^c, Andreas L. Lopata^d, Consolación De Frutos^b, Ana Valls^b, Carmen Cuéllar^a

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Servicio de Alergia, Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Universitario de La Princesa, 28006 Madrid, Spain

^c Department of Immunology, Max Planck Institut für Infektionsbiologie, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

^d Department of Molecular and Cell Biology, Centre for Biodiscovery and Molecular Development of Therapeutics, James Cook University, 4811, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2014

Received in revised form 13 January 2015

Accepted 14 January 2015

Available online 12 February 2015

Keywords:

Ani s 13
Haemoglobin
Epitope
Anisakis
Ascaris
IgE

ABSTRACT

Gastro-allergic anisakiasis and *Anisakis* sensitisation associated chronic urticaria are diseases which differ in their IgE and IgG4 responses against both crude extract and specific allergens. *Anisakis* and *Ascaris* are closely related nematodes that usually cause problems with specificity in immunodiagnosics. In this study we measured IgE and IgG4 antibodies against *Anisakis simplex* sensu lato (s. l.) and *Ascaris suum* haemoglobins in sera of 21 gastro-allergic anisakiasis and 23 chronic urticaria patients. We used a capture ELISA with the anti-*Anisakis* haemoglobin monoclonal antibody 4E8g, which also recognises *Ascaris* haemoglobin. In addition, we determined specific IgE and IgG4 to both nematodes by indirect ELISA and immunoblotting. Anti-*A. simplex* s. l. haemoglobin IgE and IgG4 levels were higher in gastro-allergic anisakiasis than in chronic urticaria patients ($P = 0.002$ and 0.026 , respectively). Surprisingly, no patient had detectable IgE levels against *A. suum* haemoglobin. Finally, we carried out an in silico study of the B-cell epitopes of both haemoglobin molecules. Five epitopes were predicted in *Anisakis pegreffii* and four in *A. suum* haemoglobin. The epitope propensity values of *Anisakis* haemoglobin in the equivalent IgE binding region of the allergenic haemoglobin *Chi t 1* from *Chironomus thummi*, were higher those of the *Ascaris* haemoglobin. In conclusion, we describe *A. simplex* haemoglobin as a new major allergen (*Ani s 13*), being recognised by a large number (64.3%) of sensitised patients and up to 80.9% in patients with gastro-allergic anisakiasis. The presence of a specific epitope and the different values of epitope propensity between *Anisakis* and *Ascaris* haemoglobin could explain the lack of cross-reactivity between the two molecules. The absence of IgE reactivity to *Ascaris* haemoglobin in *Anisakis* patients makes *Anisakis* haemoglobin (*Ani s 13*) a potential candidate for developing more specific diagnosis tools.

© 2015 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most of the parasitic anisakid nematodes use cetaceans and pinnipeds as definitive hosts, crustaceans as intermediate hosts and fish as paratenic hosts (Mattiucci and Nascetti, 2008). Live *Anisakis* L3 are able to infect humans, causing a disease known as anisakiasis (Nieuwenhuizen and Lopata, 2013). Gastro-allergic anisakiasis (GAA) was described in 2000 as a concept in which an acute allergic reaction (ranging from urticaria or angioedema to anaphylaxis) accompanies the penetration of the fish-nematode *Anisakis simplex* through the gastric mucosa (Daschner et al., 2000). The allergic reaction in GAA is simultaneous with the entrance of the nematode into the gastric mucosa. GAA, considered to be a secondary infection, gives rise to a polyclonal stimulation of all immunoglobulin

isotypes including Th1 and Th2 associated IgE, IgG, IgG4 and IgA, and in addition stimulates the production of new IgE (Daschner et al., 2002).

Haemoglobins are ubiquitous proteins, present in prokaryotes, fungi, plants and animals (Hardison, 1996). In comparison with the exhaustively studied vertebrate tetrameric human haemoglobin (64 kDa) and monomeric myoglobin (17 kDa), invertebrate haemoglobins show a wide variety of functions and structures (Weber and Vinogradov, 2001).

Although sensitisation to pork and chicken haemoglobins has been reported in a case of occupational allergy (Hilger et al., 2010), only haemoglobin of the midge *Chironomus thummi* has been characterised as an allergen in humans (Baur et al., 1982). These insects may cause severe allergic respiratory diseases in sensitised subjects (Yong et al., 1999).

Nematode haemoglobin has been investigated for its high oxygen binding affinity (De Baere et al., 1992) but nothing is

* Corresponding author. Tel.: +34 913941818; fax: +34 913941815.

E-mail address: quintas_copo@hotmail.com (J. González-Fernández).



Allergologia et immunopathologia

Sociedad Española de Inmunología Clínica,
Alergología y Asma Pediátrica

www.elsevier.es/ai



ORIGINAL ARTICLE

Diamine oxidase levels in different chronic urticaria phenotypes



A. Daschner^{a,*}, J. González-Fernández^b, A. Valls^a, C. de Frutos^a,
M. Rodero^b, C. Cuéllar^b

^a Servicio de Alergia, Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Received 19 September 2014; accepted 14 January 2015

Available online 13 May 2015

KEYWORDS

Diamine oxidase;
Anisakis;
Chronic urticaria;
Cytokines;
Diet

Abstract

Background: Diamine oxidase (DAO) is a polyamine-degrading enzyme also implicated in histamine metabolism. Chronic urticaria (CU) has a wide spectrum of clinical presentations and causes. *Anisakis* sensitisation associated chronic urticaria (CU+) has been characterised as a phenotype with different clinical and immunological characteristics and possibly associated with previous acute parasitism. We aimed to analyse serum DAO levels in different CU phenotypes. We further analysed the possible association of DAO with fish eating habits.

Methods: We studied 35 CU+ patients and 39 non-sensitised CU patients (CU-) as well as 19 controls. We analysed fish-eating frequency as well as fish intake associated exacerbation of CU (FIAE) or gastro-intestinal complaints (GI). DAO levels were further analysed with respect to lymphoproliferative responses, cytokine and specific IgE production.

Results: DAO levels were not different between CU and controls, but were significantly higher in CU+ than in CU-. CU+ patients with FIAE had lower DAO levels, but no differences were detected in patients with GI. DAO levels correlated positively with oily and canned fish consumption in CU-. In CU+, DAO levels correlated positively with specific *Anisakis* IgE, percentages of proliferation in *Anisakis* stimulated peripheral blood lymphocytes, serum IL-2 and IL-6, but correlated negatively with mitogen stimulated TGF- β in supernatants.

Conclusions: DAO levels in CU depend on fish-eating habits and in CU+ on the amount of specific IgE production. In the CU+ phenotype, lower levels of DAO predispose to urticaria exacerbation after fish intake, probably due to a relative insufficient enteric availability of this enzyme.

© 2014 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abbreviations: CU, chronic urticaria; CU+*Anisakis*, sensitisation associated chronic urticaria; CU, chronic urticaria without sensitisation against *Anisakis*; FIAE, fish intake associated exacerbation of urticaria; GI, fish intake associated gastro-intestinal complaints.

* Corresponding author.

E-mail address: alvarodaschner@gmail.com (A. Daschner).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2015.01.009>

0301-0546/© 2014 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

An important question is whether EoE-related FTT can be reversed with medical management. Longitudinal data showing the evolution of FTT after diagnosis were available for 14 of the 15 patients. Of these, 8 (62%) resolved their FTT at a median of 18 months after EoE diagnosis (range 3 to 72 months), suggesting medical interventions might have been helpful in these cases. However, because our observations were retrospective and based on a small number of patients, it is difficult to evaluate specific reasons for favorable or unfavorable evolution. All patients underwent many different interventions (including targeted elimination or elemental diet, topical swallowed steroid, short course of oral prednisone, and treatments for other allergic diseases), which makes it difficult to single out the effect of one specific treatment. The fact that FTT did not resolve in 6 patients further underlines the need for new effective therapeutic options in EoE.

Clinical characteristics of our cohort were comparable to previous pediatric series, which suggests it was representative of the pediatric EoE population.⁹ That said, replication in other pediatric EoE cohorts should be performed before results are generalized. One should note that many patients (n = 59) initially referred to our clinic did not meet current clinical and pathologic diagnostic criteria for EoE and thus were excluded from analysis.⁸ This can be explained in part by the long study period, over which EoE criteria have evolved, but it mostly underlines the importance of medical education and of performing a complete investigation before making a definitive diagnosis of EoE in children.

In conclusion, by using various anthropometric criteria to evaluate growth, we found a high rate of FTT in children diagnosed with EoE. Because no single clinical feature can accurately predict it, it is important to maintain a high level of suspicion for FTT in all children with a confirmed or suspected diagnosis of EoE, and inversely, EoE should be included in the differential diagnosis of FTT. Although it resolves in most cases, FTT can persist in some despite medical treatment, highlighting the need for research and new therapies.

Are fish tropomyosins allergens?

Vertebrate tropomyosins are generally not allergenic, with the only exception being tilapia tropomyosin.¹ With a special workup of a patient with fish-induced symptoms, we found that several vertebrate tropomyosins can be allergenic.

Tropomyosin is a highly conserved protein with a wide variety of isoforms in vertebrates and invertebrates. It was the major shrimp allergen in the 1990s but is currently considered an invertebrate pan-allergen. Patients with antitropomyosin IgE against house dust mites or cockroach may have positive skin prick test (SPT) results and oral allergy syndrome after eating shellfish. There are different tropomyosins, doses, and frequencies of exposure (inhalation/ingestion) that are clinically relevant.² Parvalbumins, enolases, aldolases, and fish gelatine are the most important fish allergens.³ However, tropomyosin was not considered a fish allergen until the identification of Ore m 4, the first vertebrate allergenic tropomyosin.¹ The *Anisakis* allergy debate on the necessity of live larvae to elicit allergic symptoms was terminated after it was found that fish with dead larvae are tolerated by patients with previous gastroallergic anisakiasis.⁴

Disclosures: Authors have nothing to disclose.

Funding Sources: Mr González-Fernández is supported by a PhD fellowship from Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2015.09.015>.

Brenda Paquet, MD*

Philippe Bégin, MD, MSc*[‡]

Louis Paradis, MD*

Eric Drouin, MD[†]

Anne Des Roches, MD*[‡]

*Allergy Division

[†]Service of Gastroenterology, Department of Pediatrics

CHU Sainte-Justine

[‡]CHU Sainte-Justine Research Center

Montreal, Quebec, Canada

a.des.roches@umontreal.ca

References

- [1] Soon IS, Butzner JD, Kaplan GG, de Bruyn JC. Incidence and prevalence of eosinophilic esophagitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57:72–80.
- [2] Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:3–20.
- [3] Cole S, Lanham J. Failure to thrive: an update. *Am Fam Physician.* 2011;83:829–834.
- [4] Liacouras CA, Spergel J, Guber LM. Eosinophilic esophagitis: clinical presentation in children. *Gastroenterol Clin North Am.* 2014;43:219–229.
- [5] Spergel JM, Beausoleil JL, Mascarenhas M, et al. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:363–368.
- [6] Wilkinson DS, Fregert S, Magnusson B, et al. Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1970;50:287.
- [7] Dietitians of Canada; Canadian Paediatric Society; College of Family Physicians of Canada; Community Health Nurses of Canada, Secker D. Promoting optimal monitoring of child growth in Canada: using the new WHO growth charts. *Can J Diet Pract Res.* 2010;71:e1–e3.
- [8] Dellon S, Gonsalves N, Hirano I, Furuta G, Liacouras C. ACG clinical guideline: evidenced based approach to the diagnosis and management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). *Am J Gastroenterol.* 2013;108:679–692.
- [9] Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Beausoleil JL, et al. 14 Years of eosinophilic esophagitis: clinical features and prognosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:30–36.



A 19-year-old, white man with a history of house dust mite and shellfish allergy reported ocular redness, epigastralgia, abdominal colic pain, and wheezing 30 minutes after ingestion of several species of fish (Table 1). The patient did not have any digestive disease. Special workup was performed with written consent of the patient and approved by the ethics committee of the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña in Spain. At the age of 3 years, he began an atopic march that revealed rhinitis and asthma. When he was 6 years old, SPT and specific IgE data revealed positivity to house dust mites. At this age, he also had oral, pharyngeal, and scalp pruritus and dyspnea when he consumed crustaceans and molluscs. At the age of 13 years, oral pruritus also occurred with octopus and squid. He simultaneously began having symptoms after fish intake. He tolerates canned sardines, anchovies, canned tuna, and smoked or cooked salmon.

A SPT was performed with a battery of allergenic extracts (ALK-Abelló, Madrid, Spain). All positive SPT results had a minimum size of 5 × 6 mm with a histamine control of 5 × 5 mm (Table 1).

His total IgE level was 688 kU/L. Specific IgE determinations by ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden) are listed in Table 1.

Anti-*Anisakis simplex* tropomyosin (Ani s 3) IgE was determined by an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the monoclonal antibody (mAb) TM311 (Sigma, St Louis, MO). Then mAb (1.5 µg per well) was added and



**Allergologia et
immunopathologia**
Sociedad Española de Inmunología Clínica,
Alergología y Asma Pediátrica
www.elsevier.es/ai



POINT OF VIEW

Allergenicity of vertebrate tropomyosins: Challenging an immunological dogma

J. González-Fernández^{a,*}, A. Daschner^b, C. Cuéllar^a

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Servicio de Alergia, Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Universitario de La Princesa, 28006 Madrid, Spain

Received 6 July 2016; accepted 1 August 2016

KEYWORDS

Cross-reactivity;
Evolution;
Fish;
IgE;
Panallergen;
Tropomyosin

Abstract With the exception of tilapia tropomyosin, other anecdotic reports of tropomyosin recognition of vertebrate origin are generally not accompanied by clinical significance and a dogmatic idea is generally accepted about the inexistence of allergenicity of vertebrate tropomyosins, based mainly on sequence similarity evaluations with human tropomyosins. Recently, a specific work-up of a tropomyosin sensitised patient with seafood allergy, demonstrated that the IgE-recognition of tropomyosin from different fish species can be clinically relevant. We hypothesise that some vertebrate tropomyosins could be relevant allergens. The hypothesis is based on the molecular evolution of the proteins and it was tested by *in silico* methods. Fish, which are primitive vertebrates, could have tropomyosins similar to those of invertebrates. If the hypothesis is confirmed, tropomyosin should be included in different allergy diagnosis tools to improve the medical protocols and management of patients with digestive or cutaneous symptoms after fish intake.

© 2016 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

What is known

Tropomyosins are a large family of fibrous proteins which are found in muscle and non-muscle cells. They stabilise and regulate the actin cytoskeleton which is involved in many cellular functions such as motility, division, contraction,

signalling, transcription and intracellular transport.¹ Plenty of tropomyosin isoforms are expressed in opisthokonts, a broad phylogenetic group of eukaryotes including both the animal and fungus kingdoms. However, it is not found in plants, protists or procaryotes.² Cross-reactivity among tropomyosins from invertebrates is the reason for being considered invertebrate panallergens.³ Sequence identity of more than 50% between allergens seems to be necessary to exhibit cross-reactivity.⁴ Vertebrate tropomyosins share more than 50% of the protein sequence with that of invertebrates but, in contrast, they are not recognised by

* Corresponding author.
E-mail address: quintas.copo@hotmail.com
(J. González-Fernández).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.002>

0301-0546/© 2016 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Please cite this article in press as: González-Fernández J, et al. Allergenicity of vertebrate tropomyosins: Challenging an immunological dogma. Allergol Immunopathol (Madr). 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.002>

II. Abreviaturas

3D: Tridimensional

A_{λ} : Absorbancia a una longitud de onda λ (nm)

Ac: Acetil

ACF: Adyuvante Completo de Freund

ACTG: Gamma-actina

AG: Anisakiosis gástrica

AGA: Anisakiosis gastroalérgica

AniM: Suero de los ratones inmunizados con el extracto total de *Anisakis*

ATP: *Adenosine triphosphate*

BCA: *Bicinchoninic acid*

BIC: *Bayesian Information Criterion*

bp: *Base pair*

Breg: Linfocitos B reguladores

BSA: *Bovine serum albumin*

CAI: Centro de Apoyo a la Investigación

cAMP: *Cyclic adenosine monophosphate*

CD: *Cluster of differentiation*

cDNA: *Complementary DNA*

CE: Comisión Europea

CH: *Calponin homology*

CIB-CSIC: Centro de Investigaciones Biológicas-Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CNM: Centro Nacional de Microbiología

Con A: Concanavalina A

CRP/CAP: *cAMP receptor protein* o *Catabolite activator protein*

D.O.: Densidad óptica

DAB: 3,3'-Diaminobencidina

DAO: Diamino-oxidasa

DDBJ: *DNA Data Bank of Japan*

DEAE: *Diethylaminoethyl*

DNA/ADN: *Deoxyribonucleic acid*/Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: *2'-Deoxynucleoside 5'-triphosphates*

dsDNA: *Double stranded DNA*

ES: Excreción/Secreción

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EFSA: *European Food Safety Authority*

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

ESI: *Electrospray ionization*

FALC: *Fat-associated lymphoid clusters*

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FBS: *Fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FIAE: *Fish Intake Associated Exacerbation*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FMDV: *Foot-and-mouth disease virus*

Gal: Galactosa

GI: Molestias gastrointestinales

Glc: Glucosa

h: Hora

HCD: *Higher-energy collisional dissociation*

HMM: *Hidden Markov Model*

HPLC: *High performance liquid chromatography*

HRP: *Horseradish peroxidase*

Hsp: *Heat shock protein*

IFN: *Interferon*
 IL: *Interleukin*
 ILC: *Innate lymphoid cells*
 IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido)
 IQR: *Interquartile range*
 ISCH: Instituto de Salud Carlos III
 ISU-E: Unidades Estandarizadas ImunoCAP® ISAC para IgE específica
 ITIS: *Integrated Taxonomic Information System*
 ITS: *Internal transcribed spacer*
 IUIS: *International Union of Immunological Societies*
 L1: Larva de primer estadio
 L2: Larva de segundo estadio
 L3: Larva de tercer estadio
 L4: Larva de cuarto estadio-preadulto
 LB: *Lysogeny broth*
 LC: *Liquid chromatography*
 M: Media aritmética
 MBP: *Major basic protein*
 ME: *Minimum Evolution*
 MHC/CPH: *Major histocompatibility complex/Complejo principal de histocompatibilidad*
 min: Minuto
 ML: *Maximum Likelihood*
 MP: *Maximum Parsimony*
 mRNA: *Messenger RNA*
 MS: *Mass spectrometry*
 mtDNA: *Mitochondrial DNA*
 MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
 N: Número
 NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
 NJ: *Neighbor Joining*
 NMBU: *Norges Miljø- og Bionvitenskapelige Universitet – Norwegian University of Life Sciences*
 NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*
 NNI: *Nearest Neighbor Interchange*
 PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*
 PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells*
 PBS: *Phosphate-buffered saline*
 PBS-Tween: Tween 20 al 0,05% en PBS
 PCR: *Polymerase chain reaction*
 PDB: *Protein Data Bank*
 PE: *Phycerythrin*
 PEG: Polietilenglicol
 PTB: PBS-Tween con BSA al 0,1%
 rDNA: *Ribosomal DNA*
 RELM- β : *Resistin-like molecule β*
 RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 RNA/ARN: *Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico*
 RNasa: Ribonucleasa
 ROS: *Reactive oxygen species*
 SAO: Síndrome de alergia oral
 SD: *Standard deviation*
 SDAP: *Structural Database of Allergenic Proteins*
 SDS: *Sodium dodecyl sulfate*
 SGF: *Simulated gastric fluid*
 SIF: *Simulated intestinal fluid*
 SPT: *Skin Prick Test*
 t-Ani s 7: Ani s 7 truncado
 TGF- β : *Transforming growth factor β*
 Th: *T helper cells*

TMB: Tetrametilbencidina

Tn: Troponina

TNF- α : *Tumor necrosis factor α*

TOPA: *Trihydroxy-phenylalanine*

Treg: Linfocitos T reguladores

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

tRNA: *Transfer RNA*

TSLP: *Thymic stromal lymphopoietin*

U: Unidades

UAS: *Urticaria Activity Score*

UC: Urticaria crónica

UC-: Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis*

UC+: Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UE: Unión Europea

UPGMA: *Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages*

WHO/OMS: *World Health Organization*/Organización Mundial de la Salud

III. Índice de Figuras

Figura 1. Especies del género <i>Anisakis</i> y morfología larvaria.	13
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Anisakis simplex</i>	14
Figura 3. Superhélice de tropomiosina.	28
Figura 4. Estructura de la hemoglobina alergénica Chi t 1 de <i>Chironomus thummi</i> (17 kDa).	32
Figura 5. Patogenia de <i>Anisakis simplex</i> en el contexto del paradigma de la regulación inmunológica por helmintos.	38
Figura 6. Síntesis de plásmidos recombinantes mediante el método In-Fusion®.	51
Figura 7. Regulación de la expresión de las proteínas recombinantes miofilina y arginina quinasa de <i>Anisakis</i>	52
Figura 8. Esquema de una placa para ELISA indirecto.	64
Figura 9. Esquema de una placa para ELISA captura.	65
Figura 10. Métodos de reconstrucción filogenética.	72
Figura 11. Relaciones evolutivas obtenidas con el método <i>Unweight Pair Group Method with arithmetic Averages</i> comparando 17 tropomiosinas.	78
Figura 12. Relaciones evolutivas obtenidas con el método <i>Neighbor Joining</i> comparando 17 tropomiosinas.	79
Figura 13. Relaciones evolutivas obtenidas con el método <i>Minimum Evolution</i> comparando 17 tropomiosinas.	79
Figura 14. Relaciones evolutivas obtenidas con el método <i>Maximum Parsimony</i> comparando 17 tropomiosinas.	80
Figura 15. Relaciones evolutivas obtenidas con el método <i>Maximum Likelihood</i> comparando 17 tropomiosinas.	80
Figura 16. Variabilidad de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.	81
Figura 17. Conservación y variabilidad aminoacídica de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.	81
Figura 18. Análisis de las secuencias de tropomiosina por grupos; vertebrados <i>vs</i> invertebrados.	82
Figura 19. Alineamiento de las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.	83
Figura 20. Alineamiento de las tropomiosinas resaltando los aminoácidos con diferencias significativas en su proporción entre los grupos de tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.	84
Figura 21. Probabilidad de plegamiento en hélice alfa en las tropomiosinas de vertebrados (negro) e invertebrados (naranja).	85
Figura 22. Probabilidad de plegamiento en hélice alfa por posición.	86
Figura 23. Visualización tridimensional de los modelos de tropomiosina realizados.	87
Figura 24. Representación de los valores de <i>Discotope Score</i> de las tropomiosinas de langostino blanco (Lit v 1) (<i>Litopenaeus vannamei</i>), cerdo (<i>Sus scrofa</i>) y <i>Anisakis simplex</i> y su comparativa con el nivel umbral de predicción (<i>Discotope Score</i> =-3,7) y con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1 (Ayuso <i>et al.</i> , 2010).	89

Figura 25. Representación de los valores medios de <i>Discotope Score</i> de las tropomiosinas de vertebrados, parásitos e invertebrados no parásitos; así como su comparativa con el nivel umbral de predicción (<i>Discotope Score</i> =-3,7) y con el porcentaje de reconocimiento experimental en Lit v 1 (Ayuso <i>et al.</i> , 2010).	89
Figura 26. Dendrograma estructural de las tropomiosinas completas de todas las especies analizadas.....	91
Figura 27. Dendrograma estructural del epítipo central de la tropomiosina (posiciones 115-183) de las principales especies que provocan fenómenos de reacción cruzada en el diagnóstico de <i>Anisakis</i>	91
Figura 28. Posición relativa de los fragmentos generados de más de siete aminoácidos tras la digestión enzimática <i>in silico</i> de las tropomiosinas.....	92
Figura 29. Alineamiento de las tropomiosinas con los motivos identificados en los epítipos de unión a IgE de pacientes alérgicos al langostino blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) (Ayuso <i>et al.</i> , 2010).	94
Figura 30. Esquema de modificaciones postraduccionales (glicosilaciones y fosforilaciones) y su posición relativa en las moléculas de tropomiosina de los grupos estudiados (parásitos, invertebrados no parásitos, vertebrados) en comparación con <i>Anisakis simplex</i>	95
Figura 31. Medianas y rangos intercuartiles de los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica en pacientes con urticaria crónica y controles.....	97
Figura 32. Medianas y rangos intercuartiles de los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica <i>vs</i> exacerbación de la urticaria tras la ingesta de pescado (FIAE) en pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+).	97
Figura 33. Correlación entre los niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica e IgE específica frente <i>Anisakis</i> medida mediante ImmunoCAP® en 35 pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+).	99
Figura 34. Porcentajes de linfoproliferación inducida mediante estimulación <i>in vitro</i> con extracto de <i>Anisakis</i> y con Concanavalina A junto con los niveles de diamino-oxidasa (U/ml) por paciente.....	99
Figura 35. Mediana y rangos intercuartiles de A: IgE total, B: IgE anti- <i>Ascaris suum</i> , C: IgE anti- <i>Anisakis simplex sensu lato</i> y D: IgG4 anti- <i>A. simplex s. l.</i>	102
Figura 36. Medianas y rangos intercuartiles de los niveles de IgE (A) e IgG4 (B) anti-hemoglobina de <i>Anisakis simplex sensu lato (s. l.)</i>	103
Figura 37. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgG4 de los pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica (cursiva).	105
Figura 38. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal 4E8g anti-hemoglobina de <i>Anisakis</i>	106
Figura 39. Alineamiento de las secuencias de las diferentes hemoglobinas analizadas y sus epítipos.	109
Figura 40. <i>Discotope Score</i> por posición en el alineamiento (A) y representación gráfica de los epítipos en las estructuras tridimensionales de las hemoglobinas: Chi t 1 (PDB: 1ECO)	

(<i>Chironomus thummi</i>), Ani p (Ani s 13) (<i>Anisakis pegreffii</i>), Asc s (<i>Ascaris suum</i>), Pse d (<i>Pseudoterranova decipiens</i>), Tox c (<i>Toxocara canis</i>) (B).	110
Figura 41. <i>Discotope Score</i> por posición en el alineamiento de la hemoglobina alergénica Chi t 1 (<i>Chironomus thummi</i>) y la media de las puntuaciones de las subunidades α y β (Media HbA y Media HbB) de las hemoglobinas de los hospedadores definitivos: <i>Tursiops truncatus</i> , <i>Phoca vitulina</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Canis lupus familiaris</i> y <i>Homo sapiens</i>	111
Figura 42. Porcentaje de aminoácidos cargados en las secuencias de hemoglobina.	111
Figura 43. Potencial electrostático de las hemoglobinas de los nematodos estudiados y del alérgeno Chi t 1.	113
Figura 44. Potencial electrostático de las hemoglobinas de los hospedadores definitivos estudiados.	113
Figura 45. Dendrograma de similitud estructural de los dominios I (D1) de las hemoglobinas de nematodos y las subunidades α (A) de sus hospedadores definitivos.	114
Figura 46. Tinción Coomassie de extractos proteicos de parásitos.	117
Figura 47. Tinción Coomassie de extractos proteicos de mamíferos y aves.	117
Figura 48. Tinción Coomassie de extractos proteicos de pescados blancos.	118
Figura 49. Tinción Coomassie de extractos proteicos de pescados azules.	119
Figura 50. Tinción Coomassie de extractos proteicos de moluscos.	120
Figura 51. Tinción Coomassie de extractos proteicos de crustáceos.	121
Figura 52. Tinción Coomassie de extractos proteicos de atún enlatado y raya.	121
Figura 53. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: <i>Anisakis simplex</i> , B: <i>Trichinella spiralis</i> y C: <i>Ascaris suum</i>	124
Figura 54. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: cerdo, B: vaca, C: conejo y D: pollo.	124
Figura 55. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: merluza, B: lubina, C: rape, D: bacalao, E: gallo y F: tilapia.	125
Figura 56. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: atún, B: trucha, C: emperador, D: salmón, E: boquerón y F: bonito.	125
Figura 57. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: mejillón, B: navaja, C: almeja japonesa, D: pulpo, E: calamar y F: berberecho.	126
Figura 58. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: cangrejo de río, B: langostino (en la tira número 5 se transfirió la tropomiosina recombinante rPan b 1), C: camarón y D: nécora.	126

Figura 59. Patrones de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina TM311 (carril 1), IgE del paciente (carril 2), IgG4 del paciente (carril 3) e IgA del paciente (carril 4) para A: atún enlatado y B: raya.....	127
Figura 60. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de larvas de tercer estadio de <i>Anisakis simplex sensu lato</i>	130
Figura 61. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Merluccius merluccius</i> (Merluza europea).	131
Figura 62. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina).....	131
Figura 63. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Lophius piscatorius</i> (Rape).	132
Figura 64. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Gadus morhua</i> (Bacalao del Atlántico).	132
Figura 65. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Gallo).	133
Figura 66. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Xiphias gladius</i> (Emperador).	133
Figura 67. Patrones de inmunorreconocimiento de IgE, IgG4 e IgA del suero de los pacientes frente al extracto total de <i>Thunnus alalunga</i> (Bonito).....	134
Figura 68. Alineamiento de la hemoglobina completa (Ani_s_13) y de la parcial recombinante (rAni_s_13) de <i>Anisakis simplex</i> con las hemoglobinas de <i>Anisakis pegreffii</i> (Ani_p), <i>Pseudoterranova decipiens</i> (Pse_d) y <i>Ascaris suum</i> (Asc_s).....	137
Figura 69. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-hemoglobina de <i>Anisakis</i> recombinante (r Ani s 13).....	138
Figura 70. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE sérica de los individuos sensibilizados a <i>Anisakis</i> frente a la hemoglobina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 13).	138
Figura 71. Análisis de la hemoglobina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 13) mediante inmunotransferencia.	139
Figura 72. Niveles de IgG1 inducidos por la hemoglobina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 13).	139
Figura 73. Inmunotransferencia de inhibición de IgG1 con hemoglobina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 13).....	140
Figura 74. Cromatografía de intercambio aniónico del precipitado rojo obtenido mediante ultracentrifugación a partir del extracto de <i>Anisakis</i> y SDS-PAGE.	141
Figura 75. Presencia de Ani s 13 en diferentes pasos del proceso de purificación.	141
Figura 76. Análisis mediante ultracentrifugación analítica de la hemoglobina de <i>Anisakis simplex</i> (Ani s 13).....	142
Figura 77. Tinción negativa de los oligómeros dispersos de Ani s 13 mediante microscopía electrónica de transmisión.	143
Figura 78. Sensibilidad de la unión antígeno-anticuerpo tras el tratamiento con peryodato.	144
Figura 79. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-hemoglobina de <i>Anisakis</i> nativa (nAni s 13).....	144

Figura 80. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de los pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (cursiva) frente a la hemoglobina de <i>Anisakis</i> nativa (nAni s 13).....	146
Figura 81. Amplificación mediante PCR de los genes que codifican para la miofilina de <i>Anisakis</i> (A) y para la arginina quinasa de <i>Anisakis</i> (B).....	149
Figura 82. Tinción Coomassie de la miofilina (M) y de la arginina quinasa (A) recombinantes de <i>Anisakis simplex</i>	150
Figura 83. Niveles de IgG1 inducidos por la miofilina recombinante de <i>Anisakis</i>	151
Figura 84. Inmunotransferencia de inhibición de IgG1 con miofilina recombinante de <i>Anisakis</i>	151
Figura 85. Patrones de inmunorreconocimiento de IgG1 de ratón inmunizado con miofilina recombinante de <i>Anisakis</i>	152
Figura 86. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de pacientes sensibilizados a <i>Anisakis</i> frente a la miofilina (A) y arginina quinasa (B) recombinantes de <i>Anisakis</i>	153
Figura 87. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-miofilina y anti-arginina quinasa recombinantes de <i>Anisakis</i>	155
Figura 88. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE anti-miofilina y anti-arginina quinasa recombinantes de <i>Anisakis</i> por grupos.....	155
Figura 89. Reconocimiento de la arginina quinasa recombinante de <i>Anisakis</i> por la IgE de los sueros 307 (grupo control) y 51 (grupo de urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i>) mediante inmunotransferencia.....	156
Figura 90. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (cursiva) frente al extracto total de <i>Anisakis</i>	157
Figura 91. Porcentajes de reacción cruzada de la IgE los pacientes positivos a <i>Anisakis simplex</i> frente a los extractos de los organismos estudiados.....	161
Figura 92. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de <i>Anisakis</i> empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i> (UC-) y sujetos control (C).....	162
Figura 93. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de <i>Ascaris</i> empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i> (UC-) y sujetos control (C).....	163
Figura 94. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de <i>Trichinella</i> empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i> (UC-) y sujetos control (C).....	164
Figura 95. Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de cucaracha empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i> (UC-) y sujetos control (C).....	165

- Figura 96.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de ácaro empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 166
- Figura 97.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de cangrejo de río empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 167
- Figura 98.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de pulpo empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 168
- Figura 99.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de pulpo cocido empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 169
- Figura 100.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de mejillón empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 170
- Figura 101.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de mejillón cocido empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 171
- Figura 102.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de almeja empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 172
- Figura 103.** Niveles de IgE sérica medidos mediante ELISA indirecto y porcentajes de positividad frente al extracto de atún empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-) y sujetos control (C)..... 173
- Figura 104.** Medianas y rangos intercuartiles de la IgG frente a los extractos de *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Procambarus clarkii*, *Blatella germanica* y *Dermatophagoides pteronyssinus*..... 176
- Figura 105.** Medianas y rangos intercuartiles de la IgG frente a los extractos de *Octopus vulgaris* crudo y cocido, *Mytilus edulis* crudo y cocido, *Ruditapes philippinarum* y *Thunnus thynnus*..... 177
- Figura 106.** Porcentajes de positividad y niveles de IgG4 sérica medidos mediante ELISA indirecto frente a los extractos de *Anisakis* y *Ascaris* empleando sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a

sensibilización por <i>Anisakis</i> (UC+), urticaria crónica sin sensibilización a <i>Anisakis</i> y sujetos control (C).....	178
Figura 107. Medianas y rangos intercuartiles de la IgA frente a los extractos de <i>Anisakis simplex</i> , <i>Ascaris suum</i> , <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Procambarus clarkii</i> , <i>Blatella germanica</i> y <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	180
Figura 108. Medianas y rangos intercuartiles de la IgA frente a los extractos de <i>Octopus vulgaris</i> crudo y cocido, <i>Mytilus edulis</i> crudo y cocido, <i>Ruditapes philippinarum</i> y <i>Thunnus thynnus</i>	181
Figura 109. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE, IgG4 e IgA frente a las tropomiosinas recombinantes de <i>Anisakis</i> (Ani s 3) y camarón nórdico (Pan b 1).....	184
Figura 110. Medianas y rangos intercuartiles de la IgE, IgG4 e IgA frente a los extractos proteicos totales de <i>Anisakis simplex</i> y langostino blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	185
Figura 111. Niveles de IgE frente a los extractos proteicos totales de langostino blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) y <i>Anisakis simplex</i> y frente a la tropomiosina de <i>Anisakis</i> (Ani s 3) recombinante, en pacientes sensibilizados a crustáceos (G1-G12), medidos mediante ELISA indirecto.....	186
Figura 112. Niveles de IgG1 inducidos por la tropomiosina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 3).	187
Figura 113. Patrones de inmunorreconocimiento de IgG1 de ratón inmunizado con tropomiosina recombinante de <i>Anisakis</i>	188
Figura 114. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de los pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita) y urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (cursiva) frente a la tropomiosina recombinante de <i>Anisakis</i> (rAni s 3).	189
Figura 115. Patrones de inmunorreconocimiento de la IgE de pacientes con anisakiosis gastroalérgica (negrita), urticaria crónica asociada a sensibilización por <i>Anisakis</i> (cursiva) y sensibilizados a crustáceos (G) frente a los extractos de langostino blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) y larvas de <i>Anisakis</i>	190
Figura 116. Niveles de diamino-oxidasa (DAO) sérica y su asociación con distintos marcadores inmunológicos en la urticaria crónica.....	200
Figura 117. Representación esquemática del dogma actual de la alergenicidad de las tropomiosinas, nuevas perspectivas y nuestra hipótesis.....	210

IV. Índice de Tablas

Tabla 1. Capturas de pesca marítima por buques pesqueros españoles en el año 2014.....	15
Tabla 2. Prevalencia de larvas de <i>Anisakis simplex</i> en pescados de diferentes áreas geográficas.....	16
Tabla 3. Condiciones y tratamientos efectivos para matar las larvas de <i>Anisakis simplex</i>	17
Tabla 4. Alergenos caracterizados de <i>Anisakis simplex</i>	24
Tabla 5. Organismos del estudio.....	43
Tabla 6. Curva patrón de BSA para la valoración de un extracto por el método de Bradford.	44
Tabla 7. Condiciones para la amplificación de la miofilina de <i>Anisakis</i> mediante PCR.	48
Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la miofilina de <i>Anisakis</i> mediante PCR con cebadores diseñados para su inserción en el plásmido pTriEx®-6 3C/LIC mediante el método In-Fusion®	50
Tabla 9. Condiciones para la amplificación de la arginina quinasa de <i>Anisakis</i> mediante PCR.....	54
Tabla 10. Condiciones para la amplificación de la arginina quinasa de <i>Anisakis</i> mediante PCR con cebadores diseñados para su inserción en el plásmido pTriEx®-6 3C/LIC mediante el método In-Fusion®	54
Tabla 11. Características clínicas de los sujetos cuyos sueros han sido utilizados para la realización de los experimentos relacionados directamente con <i>Anisakis</i>	56
Tabla 12. Cuestionario estandarizado sobre hábitos de ingesta de pescado.....	57
Tabla 13. Características clínicas de los pacientes alérgicos a crustáceos.	57
Tabla 14. Características clínicas de los pacientes con efectos adversos tras la ingesta de pescado.....	59
Tabla 15. Secuencias y estructuras tridimensionales de tropomiosina.....	70
Tabla 16. Secuencias y estructuras tridimensionales de hemoglobina.	71
Tabla 17. Diferencias aminoacídicas entre las tropomiosinas de vertebrados e invertebrados.	83
Tabla 18. QMEAN-Score de los modelos tridimensionales de las tropomiosinas.....	88
Tabla 19. Citoquinas (mediana y rango intercuartil) en suero y en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimulados con Concanavalina A (Con A) o extracto de <i>Anisakis</i>	100
Tabla 20. Mediana y rangos intercuartiles (IQR) de los niveles de IgE e IgG4 determinados por ELISA frente a los extractos totales de larvas de tercer estadio de <i>Anisakis simplex sensu lato</i> y adultos de <i>Ascaris suum</i> en pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA) y urticaria crónica con sensibilización a <i>Anisakis</i> (UC+).	107
Tabla 21. Positividad del suero del paciente frente a la tropomiosina, síntomas y resultados de las pruebas cutáneas e <i>in vitro</i> frente a diferentes organismos.	123
Tabla 22. Síntomas específicos y bandas detectadas por la IgE de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.	129
Tabla 23. Bandas detectadas por la IgG4 de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.	134
Tabla 24. Síntomas específicos y bandas detectadas por la IgA de los pacientes mediante inmunotransferencia en diferentes especies de pescado.	135

Tabla 25. Porcentajes de reconocimiento de la IgE del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i> frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.....	160
Tabla 26. Porcentaje de reacción cruzada de la IgE de los pacientes positivos a <i>Anisakis simplex</i> por grupos frente a los extractos de los organismos estudiados.....	161
Tabla 27. Porcentajes de reconocimiento de la IgG del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i> frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.....	175
Tabla 28. Porcentajes de reconocimiento de la IgA del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i> frente a los extractos de diferentes invertebrados y pescados mediante ELISA indirecto.....	179
Tabla 29. Porcentajes de reconocimiento de la IgE, IgG4 e IgA del suero de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con <i>Anisakis</i> frente a las tropomiosinas recombinantes de <i>Anisakis</i> (Ani s 3) y camarón nórdico (Pan b 1) y frente a los extractos totales de <i>Anisakis</i> y langostino blanco mediante ELISA indirecto.....	182