

## Relación entre los niveles de IgA sérica frente a moluscos y la Urticaria crónica asociada a *Anisakis simplex*

**Julia María Coronas Serna. Nicola Paccione Basmadji.  
Lucía Rodríguez Castro.**

Plaza Ramón y Cajal s/n. Facultad de Farmacia. Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
[jmcs1992@hotmail.com](mailto:jmcs1992@hotmail.com)

**María del Carmen Cuéllar del Hoyo. Juan González Fernández**

Plaza Ramón y Cajal s/n. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
[cuellarh@farm.ucm.es](mailto:cuellarh@farm.ucm.es)

**Resumen:** Estudios previos han relacionado la Urticaria Crónica con la presencia de anticuerpos IgE anti *Anisakis simplex*. Se ha observado reacción cruzada entre *A. simplex* y otros alérgenos pertenecientes a moluscos, pudiendo estar implicada la tropomiosina en estos fenómenos, considerada panalérgeno entre los invertebrados. Asimismo la IgA se postula que pueda estar implicada en los mecanismos protectores de las reacciones urticariales. En este trabajo se estudian los niveles de IgA específica frente a *A. simplex*, pulpo (*Octopus vulgaris*), mejillón (*Mytilus edulis*) y almeja (*Venerupis philippinarum*) en sueros de pacientes diagnosticados de Urticaria Crónica (UC) asociada (UC+) o no (UC-) a *A. simplex* comparándolos con aquellos diagnosticados de Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA). Se tapizaron placas de ELISA con extractos de pulpo, mejillón, almeja y *A. simplex*, incubándose posteriormente con sueros humanos, revelándose con anti-IgA humana marcada con peroxidasa. Los resultados se expresaron como densidades ópticas (D.O.) a 490 nm. Se estudiaron 79 sueros de pacientes (UC+/29, UC-/34 y AGA/16) siendo los valores obtenidos en D.O. media  $\pm$  SD: *A. simplex* (0,963 $\pm$ 0,763), pulpo crudo (0,491 $\pm$ 0,325) y cocido (0,979 $\pm$ 0,521), mejillón crudo (0,715 $\pm$ 0,355) y cocido (0,783 $\pm$ 0,413) y almeja (0,535 $\pm$ 0,380). Se obtuvieron valores mayores frente a *A. simplex* en el grupo de AGA (1,236 $\pm$ 0,904) y UC+ (1,129 $\pm$ 0,840), existiendo diferencias significativas con UC- (0,692 $\pm$ 0,520). Se observaron diferencias significativas en los niveles de IgA frente a mejillón cocido entre los grupos de AGA (0,976 $\pm$ 0,473) y UC (0,735 $\pm$ 0,386), lo que hace sospechar una asociación entre estos niveles bajos de IgA y presencia de Urticaria Crónica.

**Palabras clave:** ELISA. IgA. Urticaria. *Anisakis*.

## INTRODUCCIÓN

Estudios previos relacionan la Urticaria Crónica con la presencia de anticuerpos IgE anti *Anisakis simplex* (1). Se ha observado reacción cruzada entre *A. simplex* y otros alérgenos pertenecientes a diferentes organismos, pudiendo estar implicada la tropomiosina en estos fenómenos, considerada panalérgeno entre los invertebrados (2). Actualmente, la tropomiosina se considera el alérgeno principal responsable de las reacciones cruzadas, tanto a nivel molecular como clínico, no sólo entre diferentes invertebrados productores de alérgenos inhalantes como ácaros del polvo doméstico e insectos sino también entre crustáceos y moluscos responsables de alergias de tipo alimentario (3). Asimismo la IgA específica se postula que pueda estar implicada en los mecanismos protectores de las reacciones urticariales (4). En este trabajo se estudian los niveles de IgA específica frente a *A. simplex*, comparando los resultados con los obtenidos frente a extractos de moluscos como pulpo (*Octopus vulgaris*), mejillón (*Mytilus edulis*) y almeja (*Venerupis philippinarum*) en sueros de pacientes diagnosticados de Urticaria Crónica (UC) asociada (UC+) o no (UC-) a *A. simplex* así como de individuos con diagnóstico confirmado de Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de los niveles de IgA específica se utilizaron 79 sueros de pacientes con edades entre 17 y 80 años suministrados por el Dr. Daschner atendidos en la Consulta de Alergia del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid con diagnóstico inicial de Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA) (16 sueros), Urticaria Crónica asociada a sensibilización a *A. simplex* (UC+) (29 sueros) y Urticaria Crónica sin sensibilización a *A. simplex* (UC-) (34 sueros).

Se realizó una extracción de los antígenos a partir de los organismos enteros salvo los bivalvos, a los que se trituró sin concha. Tras la homogeneización, se sonicaron los extractos en hielo durante 10 segundos, seis veces y se procedió a la extracción una noche a 4°C con PBS. Al día siguiente los extractos se trataron con *n*-hexano proporción 3:7 (ml Hexano: ml Extracto) para eliminar los lípidos y se centrifugaron a 14000 rpm recogiendo los sobrenadantes. Tras la diálisis en membranas Medicell® de 12000-14000 kDa frente a PBS, se valoró el contenido proteico utilizando el método de Bradford.

Las placas de ELISA (Costar, Corning, NY, USA) se sensibilizaron con 100 µl de extractos proteicos totales de *A. simplex*, pulpo (*O. vulgaris*), mejillón (*M. edulis*) y almeja (*V. philippinarum*) a 10 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. Los antígenos se incubaron durante toda la noche a 4°C y se lavaron las placas con PBS-Tween 20 al 0,05%. Se bloquearon las placas con 250 µl/pocillo de BSA al 0,1% en PBS y se incubaron una hora a 37°C. Tras lavar, se añadieron 100 µl de los sueros por pocillo en PBS-Tween al

0,5% con BSA al 0,1% a la dilución 1/100 y por duplicado y se incubaron dos horas a 37°C. Tras lavar se añadieron 100 µl por pocillo de inmunoglobulinas de cabra anti-IgA humana conjugada con peroxidada (BioSource, Camarillo, CA, USA) a la dilución 1/3000. El anticuerpo marcado se incubó una hora a 37°C, las placas se lavaron y se procedió al revelado mediante la adición de 100 µl/pocillo de o-fenileno-diamina al 0,04% en tampón citrato-fosfato pH 5 con peróxido de hidrógeno al 0,04%. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad las placas se frenaron con 50 µl de ácido sulfúrico 3N y se leyeron a 490 nm en un lector de placas ELx808 (Biotek). Simultáneamente se realizó un control de ELISA con los mismos sueros sin la adición de antígeno, restándose la fijación inespecífica a la BSA utilizada en el bloqueo de las placas (5).

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa informático Statgraphics Centurion XVI expresando los resultados como media  $\pm$  desviación estándar y realizándose las comparaciones entre grupos mediante la aplicación del test de Duncan con un intervalo de confianza del 95%.

## RESULTADOS

Determinación de los niveles de IgA específica por ELISA frente a los extractos antigénicos totales en los sueros de los pacientes seleccionados.

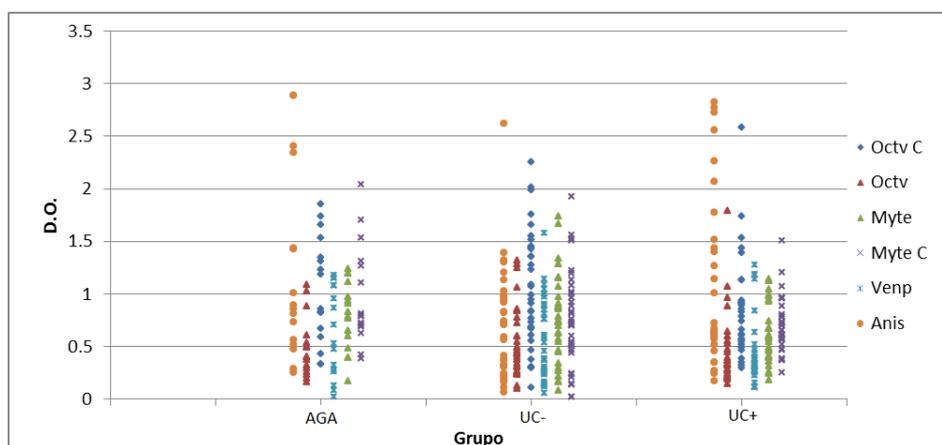


Figura 1. Niveles de IgA frente a (Octv C) *Octopus vulgaris* cocido, (Octv) *O. vulgaris* crudo, (Myte) *Mytilus edulis* crudo, (Myte C) *M. edulis* cocido, (Venp) *Venerupis philipinarum* y (Anis) *Anisakis simplex* expresados en D.O. en los 79 sueros estudiados y distribuidos por patologías (AGA, UC- y UC+)

Los valores medidos en D.O. para todos los sueros se recogen en la tabla 1.

Origen del extracto	Media $\pm$ desviación estándar			
	Totales	AGA	UC-	UC+
<i>O. vulgaris</i> cocido	0,979 $\pm$ 0,521	1,046 $\pm$ 0,505	1,044 $\pm$ 0,546	0,867 $\pm$ 0,497
<i>O. vulgaris</i> crudo	0,491 $\pm$ 0,325	0,487 $\pm$ 0,285	0,525 $\pm$ 0,328	0,454 $\pm$ 0,348
<i>M. edulis</i> crudo	0,714 $\pm$ 0,355	0,789 $\pm$ 0,321	0,771 $\pm$ 0,412	0,608 $\pm$ 0,276
<i>M. edulis</i> cocido	0,783 $\pm$ 0,413	0,976 $\pm$ 0,473	0,759 $\pm$ 0,466	0,706 $\pm$ 0,269
<i>V. phillipinarum</i>	0,534 $\pm$ 0,379	0,642 $\pm$ 0,425	0,555 $\pm$ 0,387	0,453 $\pm$ 0,339
<i>A. simplex</i>	0,963 $\pm$ 0,763	1,236 $\pm$ 0,904	0,693 $\pm$ 0,52	1,129 $\pm$ 0,841

**Tabla 1. Medias  $\pm$  desviación estándar de los valores de IgA expresados en D.O. en función del extracto para la totalidad de los sueros y diferenciando en función de las patologías diagnosticadas.**

En el caso de *A. simplex* el grupo UC- presentaba diferencias significativas con los grupos UC+ y AGA, formando estos un grupo homogéneo. Así mismo, en el caso de Myte C (mejillón cocido), el grupo UC+ presentaba diferencias significativas con AGA lo que sugiere la inexistencia de reacción cruzada entre ambos extractos.

También se clasificaron los sueros según la edad y el sexo, obteniéndose los resultados que figuran en las tablas 2 y 3. No se observaron diferencias significativas en los valores de IgA obtenidos.

Origen del extracto	17-40 años	41-60 años	61+ años
Pulpo cocido	1,05 $\pm$ 0,518	0,927 $\pm$ 0,504	0,925 $\pm$ 0,546
Pulpo crudo	0,545 $\pm$ 0,324	0,479 $\pm$ 0,322	0,429 $\pm$ 0,329
Mejillón crudo	0,735 $\pm$ 0,333	0,664 $\pm$ 0,413	0,728 $\pm$ 0,345
Mejillón cocido	0,726 $\pm$ 0,338	0,76 $\pm$ 0,427	0,879 $\pm$ 0,489
Almeja	0,559 $\pm$ 0,38	0,527 $\pm$ 0,383	0,507 $\pm$ 0,389
<i>Anisakis</i>	0,785 $\pm$ 0,599	0,9585 $\pm$ 0,764	1,209 $\pm$ 0,911

**Tabla 2. Medias  $\pm$  desviación estándar en función del extracto y la edad de los pacientes.**

Origen del extracto	Varones	Mujeres
Pulpo cocido	0,908 $\pm$ 0,504	1,025 $\pm$ 0,531
Pulpo crudo	0,465 $\pm$ 0,35	0,509 $\pm$ 0,31
Mejillón crudo	0,644 $\pm$ 0,245	0,76 $\pm$ 0,406
Mejillón cocido	0,668 $\pm$ 0,284	0,858 $\pm$ 0,466
Almeja	0,457 $\pm$ 0,329	0,585 $\pm$ 0,405
<i>Anisakis</i>	0,903 $\pm$ 0,743	1,002 $\pm$ 0,782

**Tabla 3. Medias  $\pm$  desviación estándar en función del extracto y el sexo de los pacientes.**

Finalmente, se trabajó con los datos teniendo solo en cuenta la presencia o ausencia de urticaria crónica independientemente de que existiera o no sensibilización a

A. *simplex*, obteniéndose los resultados que se reflejan en la tabla 4.

Origen del extracto	No urticaria crónica	Urticaria crónica
Pulpo cocido	1,046±0,505	0,962±0,527
Pulpo crudo	0,487±0,285	0,492±0,336
Mejillón crudo	0,789±0,321	0,696±0,363
Mejillón cocido	0,976±0,473	0,735±0,386
Almeja	0,632±0,425	0,508±0,366
<i>Anisakis</i>	1,26±0,904	0,894±0,715

Tabla 4. Medias  $\pm$  desviación estándar en función del extracto y la presencia o ausencia de UC.

En este caso se encontraron diferencias significativas en el caso de *A. simplex* y mejillón cocido, siendo mayores los niveles de IgA en los pacientes sin urticaria crónica.

## CONCLUSIONES

Como era de esperar, los valores de IgA frente a *A. simplex* fueron superiores en el grupo diagnosticado de AGA y UC+, existiendo diferencias significativas con el grupo de pacientes diagnosticados de UC-. Esto demuestra que ambos grupos de pacientes constituyen un grupo homogéneo en su respuesta de IgA anti-*A. simplex* y por lo tanto, el hecho de que los valores de IgA frente al extracto de mejillón cocido resultaran significativamente más elevados en el grupo diagnosticado de AGA comparados con los obtenidos en el grupo de UC+ demuestra la inexistencia de reacción cruzada entre ambos extractos antigénicos.

Teniendo en cuenta la presencia o ausencia de Urticaria Crónica independientemente de que exista o no relación con la sensibilización a *A. simplex*, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgA frente al extracto de mejillón cocido entre los grupos de AGA y Urticaria Crónica, lo que hace sospechar una asociación entre estos niveles bajos de IgA específica, considerada como factor protector, y presencia de Urticaria Crónica independientemente de la presencia o ausencia de sensibilización a *A. simplex*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Daschner A, Rodero M, DE Frutos C, Valls A, Vega F, Blanco C, Cuéllar C. Different serum cytokine levels in chronic vs. acute *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria. *Parasite Immunology*. 2011;33(6):357-362.

2. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of *Ani s 2* and *Ani s 3*. *International Journal of Dermatology*. 2007;46(2):146-150.
3. Lopata AL, O'Hehir RE, Lehrer SB. Shellfish allergy. *Clinical and Experimental Allergy*. 2010;40(6):850-858.
4. Daschner A, Cuéllar C, Rodero M. The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*. 2012;28(1):9-15.
5. Andreu-Ballester JC, Ballester F, Pérez-Griera J, Amigo V, Peñarroja-Otero C, Colomer-Rubio E, Ortiz-Tarín I, Pelayo V, García-Hernández P, Rodero M, Cuéllar C. Differential effect of appendectomy and tonsillectomy on anti-*Kudoa* sp. antibodies in patients with MALTectomy. *Parasitology International*. 2009;58(4):401-405.

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.