

## Patrones de inmuno-reconocimiento de IgA sérica frente a moluscos en sueros de pacientes positivos a *Anisakis simplex*

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

Plaza Ramón y Cajal s/n. Facultad de Farmacia. Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
[nicola7792@hotmail.com](mailto:nicola7792@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 (UC) 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 un trabajo anterior se observaron diferencias significativas en los niveles de IgA medidos por ELISA frente a mejillón cocido entre los grupos de Anisakiosis Gastro-Alérgica (AGA) y UC lo que hace sospechar una asociación entre estos niveles bajos de IgA y presencia de UC. En este trabajo se estudian los patrones de inmuno-reconocimiento de IgA específica frente a *A. simplex*, pulpo (*Octopus vulgaris*), mejillón (*Mytilus edulis*) y almeja (*Venerupis philippinarum*) en sueros de pacientes diagnosticados de UC asociada o no a *A. simplex* comparándolos con aquellos diagnosticados de AGA. Se realizó SDS-PAGE con extractos de pulpo, mejillón, almeja y *A. simplex*, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, incubándose posteriormente con sueros humanos, revelándose con anti-IgA humana marcada con peroxidasa. En el extracto de mejillón cocido, el 90% de los sueros reconocieron una proteína de 50 kDa, aproximadamente. Todos los extractos sometidos a cocción dieron mejores resultados en el reconocimiento de las proteínas por la IgA específica.

**Palabras clave:** Western-blot. IgA. Urticaria. *Anisakis*.

### INTRODUCCIÓN

Se ha observado reacción cruzada entre *Anisakis simplex* y otros alérgenos pertenecientes a diferentes organismos, pudiendo estar implicada la tropomiosina en estos fenómenos, considerada panalérgeno entre los invertebrados. 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 <sup>(1)</sup>. Asimismo la IgA específica se postula que pueda estar implicada en los mecanismos protectores de las reacciones urticariales <sup>(2)</sup>. En un trabajo anterior se estudiaron los niveles de IgA específica por ELISA 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). 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- (3). En el presente trabajo se estudian los patrones de inmuno-reconocimiento de IgA específica frente a *A. simplex*, pulpo (*O. vulgaris*), mejillón (*M. edulis*) y almeja (*V. philippinarum*) en sueros de pacientes diagnosticados de UC+ y UC-, comparándolos con aquellos diagnosticados de AGA y un grupo control sin urticaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de los patrones de inmuno-reconocimiento de IgA específica se utilizaron 20 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) (5 sueros), Urticaria Crónica asociada a sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+) (2 sueros) y Urticaria Crónica sin sensibilización a *A. simplex* (UC-) (5 sueros) y Controles (8 sueros) <sup>(4)</sup>.

Se realizó una extracción de los antígenos [pulpo (*Octopus vulgaris*), mejillón (*Mytilus edulis*) y almeja (*Venerupis philippinarum*)] 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 <sup>(3)</sup>.

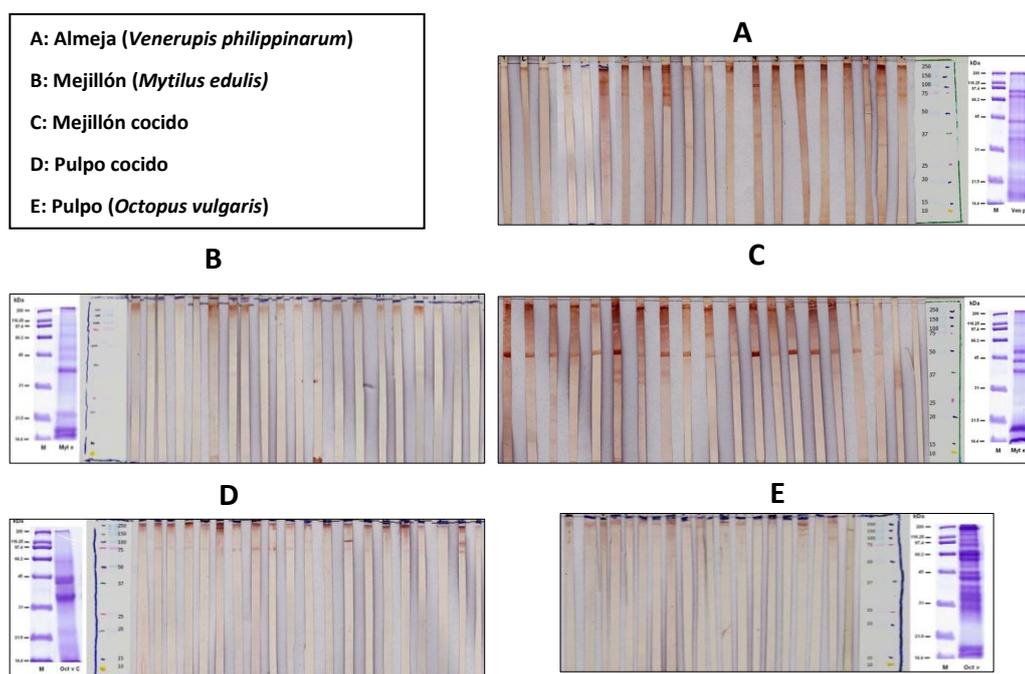
Para realizar la electroforesis en geles al 12,5% de poliacrilamida (0,75mm), se utilizaron cubetas BioRad Mini-PROTEAN® 2 Cell 165-2940. En el carril del marcador se cargó: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad range BioRad 161-0317. En los demás carriles se cargaron 25 µg de proteína y se completaron con tampón de

muestra hasta 20 µl/pocillo. El marcador se diluyó 1:20 en tampón de muestra y todas las muestras, incluido el marcador, se calentaron en un baño a 95°C 5 minutos y se enfriaron en hielo para, a continuación cargarlas en el gel y correrlo a 100 V. La tinción con azul Coomassie se realizó durante 12h en agitación y a temperatura ambiente. (metanol 50%, ácido acético glacial 10% v/v y azul Coomassie  $1 \times 10^{-3}$  g/ml en agua destilada). El gel se decoloró con una solución de metanol 10% y acético 10% v/v en agua destilada.

Para el western-blot, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS empleándose el marcador preteñido Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope 161-0375. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó a 100V y se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS durante una noche. Tras lavar con PBS-Tween se incubaron los sueros 3h en agitación y diluidos 1/25 para IgA en leche descremada al 1% en PBS-Tween. El anti-anticuerpo marcado con peroxidasa se añadió a 1/3000 incubándose 2h a temperatura ambiente (Goat anti-human IgA, HRP Conjugate, Biosource International, Camarillo, CA, USA). Para el revelado se empleó un kit comercial de DAB: Metal Enhanced DAB Substrate Kit 34065 Thermo scientific®.

## RESULTADOS

En el estudio de los patrones de inmuno-reconocimiento de IgA (Fig. 1) se observó que una banda de proteínas de alto peso molecular fue reconocida por el 100% (20 de 20) de los sueros de los pacientes en los extractos de pulpo cocido, mejillón cocido y almeja, en un 85% (17 de 20) y un 90% (18 de 20) en los extractos de pulpo y mejillón, respectivamente. Una banda de proteínas de aproximadamente 150 kDa fue reconocida por el 100% (20 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, en un 70% (14 de 20) en los extractos de pulpo cocido y almeja y 10% (2 de 20) en el antígeno de pulpo. Una banda de proteínas de aproximadamente 100 kDa fue reconocida por el 60% (12 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, en un 45% (9 de 20) en el extracto de almeja, y por un 25% (5 de 20) y un 10% (2 de 20) en los extractos de pulpo cocido y crudo, respectivamente. Destaca una banda de aproximadamente 75kDa que fue reconocida por el 85% (17 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, en un 70% (14 de 20) en el de almeja, y un 60% (12 de 20) en el extracto de pulpo cocido. Finalmente, una banda de proteínas de aproximadamente 50kDa fue reconocida por el 90% (18 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, y por un 10% (2 de 20) en el de almeja.



**Figura 1. Patrones de inmuno-reconocimiento de IgA de los sueros estudiados frente a los diferentes extractos.**

Es de interés remarcar que una banda de proteínas de aproximadamente 37 kDa, probablemente la tropomiosina, fue reconocida por el 20% (4 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, y por un 15% (3 de 20) en el de almeja, mientras que no apareció con los extractos de pulpo.

En el grupo de AGA, frente al mejillón cocido todos presentaron una banda positiva a 150 kDa. Dicha banda, fue en menor medida reconocida en pulpo cocido y en el extracto de almeja. De igual modo en el de mejillón cocido todos los sueros AGA reconocieron una proteína de aproximadamente 50 kDa. En el pulpo cocido todos los sueros reconocieron una banda a 75 kDa que apareció con menor intensidad en el extracto de mejillón cocido.

Todos los sueros de pacientes UC+ reconocieron proteína a aproximadamente 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa y 50 kDa empleando el extracto de mejillón cocido.

Los sueros de pacientes UC- presentaron positividad de IgA para las bandas de 150 kDa y 75 kDa en el extracto de mejillón cocido. Respecto a la tropomiosina, 2 de los 5 sueros UC- reconocieron una proteína de aproximadamente 37 kDa, que dio reacción positiva con la IgA en el extracto de mejillón cocido.

Los sueros del grupo control reconocieron la banda de proteínas de aproximadamente 150kDa [100% (8 de 8) en el extracto de mejillón cocido y almeja, 88% (7 de 8) en el extracto de pulpo cocido y 25% (2 de 8) en el extracto de pulpo].

## CONCLUSIONES

Más del 85% de los sueros estudiados dio respuesta de IgA específica frente a una o varias proteínas de “alto peso molecular” superior a 250 kDa en todos los extractos analizados, tanto crudos como cocidos.

En el extracto de mejillón cocido, el 90% de los sueros reconocieron una proteína de 50 kDa aproximadamente. Todos los extractos sometidos a cocción dieron mejores resultados en el reconocimiento de las proteínas por la IgA específica, lo que sugiere que la IgA humana ha evolucionado para reconocer las proteínas transformadas en los procesos de calentamiento utilizados en la preparación de alimentos.

El reconocimiento de las bandas de 150 kDa, 75kDa y 50 kDa por un número muy elevado de los sueros estudiados en los extractos de mejillón cocido y almeja ponen de manifiesto la existencia de moléculas de IgA con especificidades comunes a numerosos epitopos presentes en la alimentación.

Es de interés destacar que una banda de proteínas de aproximadamente 37 kDa, probablemente la tropomiosina, fue reconocida por el 20% (4 de 20) de los sueros de los pacientes en el extracto de mejillón cocido, y por un 15% (3 de 20) en el de almeja, mientras que no apareció con los extractos de pulpo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Daschner A, Cuéllar C, Rodero M. The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help?. *Trends in Parasitology*. 2012;28(1):9-15.
3. Coronas Serna JM, Paccione Basmadji N, Rodríguez Castro L. Relación entre los niveles de IgA sérica frente a moluscos y la Urticaria crónica asociada a *Anisakis simplex*. *Reduca*. 2013; 4(10).
4. 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.

Recibido: 7 noviembre 2013.  
Aceptado: 24 febrero 2014.