



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

Diagnóstico de los pacientes con alergia a gamba

María Rueda García

Director

Antonio Luis Valero Santiago

Tutor

Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado de Medicina - Departament de Medicina

Facultat de Medicina - Universitat Autònoma de Barcelona

2019



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Tesis Doctoral

Diagnóstico de los pacientes con alergia a gamba

Autora

María Rueda García

Director

Antonio Luis Valero Santiago

Servei de Pneumologia i Al·lèrgia Respiratòria,
Institut Clínic del Tòrax, Hospital Clínic
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi
i Sunyer (IDIBAPS)
Barcelona

Tutor

Albert Selva O'Callaghan

Servei de Medicina Interna
Hospital Vall d'Hebron
Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina - Departament de Medicina

Facultat de Medicina - Universitat Autònoma de Barcelona

2019



Universitat Autònoma
de Barcelona

AGRADECIMIENTOS

Ahora que termino esta Tesis quiero agradecer a todos los que me habéis ayudado a recorrer este camino.

A Antonio Valero, en primer lugar y por muchas razones. Me diste una oportunidad al principio de mi carrera profesional y desde entonces han pasado casi 11 años. Confiaste en que podría llevar a cabo este proyecto y me has apoyado siempre, con tu profesionalidad y tu calidad investigadora, pero también como amigo.

A Sonia, por su capacidad para seguir adelante frente a las adversidades, siempre aprendo a tu lado. La próxima tesis es la tuya.

A Eva Abel y Enrique Fernández por su ayuda con el trabajo de laboratorio, y las miles de dudas que me han resuelto, con mucha paciencia y sin perder la sonrisa.

A las enfermeras de la Unidad de Alergia del Hospital Clínic, siempre dispuestas a colaborar con ilusión.

A todo el equipo del Servicio de Alergia y Neumología del Hospital Quirón, por sus palabras de ánimo diarias, que me ayudaban a creer en el proyecto.

A mis amigos, que a pesar de haberles visto menos de lo que nos hubiera gustado, sobretudo en los últimos meses, me han demostrado lo mucho que me quieren. En especial a Mónica, Rosa, Tere, Isa, Andrea, Cris, Robert, Cinthia, Paula, Vanesa, Aroa, Almu, Pulu e Iñaki, porque no dudaron jamás que lo conseguiría; y a Lorena, que sólo con mirarme ya sabe lo que pienso.

A Xael, que es quien más ha sufrido mis nervios y mis dudas en este tiempo. Me has dado fuerza cada día para llegar hasta aquí, y sin tu apoyo, tu paciencia y tu cariño hubiera sido imposible tener esta tesis en nuestras manos. Te quiero, yo más.

A mi padre, que me transmitió su pasión por la Medicina, y a mi madre, una mujer inteligente adelantada a su tiempo, que es capaz de coger un tren y recorrer miles de kilómetros sin dudar para estar conmigo. Nunca encontraré las palabras que puedan reflejar todo lo que os quiero.

A Ana, que es mucho más que mi hermana, me apoya, me comprende, me ayuda incondicionalmente, y me hace reír a carcajadas. Eres una mujer excepcional, y estoy muy orgullosa de tí. Juntas somos..

A Alicia y Juan, les adoro, son mis sacos de mimos, me derrito cada vez que escucho sus voces llamándome “tía ven” y veo sus caritas preciosas. Me habéis robado el alma.

A los que ya no están. Sé que les encantaría disfrutar este momento, y tal vez ahora estén sonriendo..

A todos, me siento afortunada y agradecida cada día de formar parte de vuestra vida.

Abreviaturas, por orden alfabético

AF: anafilaxia

AK: arginina quinasa (de su nombre en inglés *arginine kinase*)

ADP: adenosina difosfato

AINEs: fármacos antiinflamatorios no esteroideos

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: enzima que cataliza la defosforilación del ATP

BSA: albúmina de suero bovino (de su nombre en inglés *bovine serum albumin*)

BT: *Blomia tropicalis*

C: carril

C+: control positivo

C-: control negativo

CLM: cadena ligera de la miosina

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CUT: síntomas cutáneos

DF: *Dermatophagoides farinae*

DIG: síntomas digestivos

DPT: *Dermatophagoides pteronyssinus*

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (de su nombre en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Fab: fracción variable de los anticuerpos (de su nombre en inglés *fragment antigen binding*)

FBPA: fructosa 1-6 bifosfato aldolasa

Fig: figura

g: gramo

GDPH: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

°C: grados centígrados

HCl: ácido clorhídrico

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IgA, IgE, IgG, IgM: inmunoglobulinas de tipo A, E, G y M

IL: interleucina

IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17: interleucinas de tipo 4, 5, 8, 9, 13, 17

INH: síntomas respiratorios por inhalación de vapor de cocción

kDa: kilodalton

KUA/L: kilounidades de anticuerpo específico contra alérgeno por litro de sangre

M: molar

µg: microgramo

mg/ml: microgramo/mililitro

Mix Cocido: extracto de mezcla de 4 especies cocidas (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*)

Mix Crudo: extracto de mezcla de 4 especies crudas (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*)

ml: mililitro

MLC: cadena ligera de la miosina (de su nombre en inglés *myosin light chain*)

mM: milimolar

µm: micrómetro

mV: milivoltio

MW: peso molecular (de su nombre en inglés *molecular weight*)

N: normal

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (de su nombre en inglés *National Center for Biotechnology Information*)

nm: nanómetro

p: resultado del valor estadístico adecuado para cada comparación

p/v: peso/volumen

PC: pruebas cutáneas intraepidérmicas

PBS: tampón fosfato salino (de su nombre en inglés *phosphate buffered saline*)

PBS-T: tampón fosfato salino *Tween*

PS: *Parapenaeopsis stylifera*

RES: síntomas respiratorios

R²: coeficiente de regresión lineal

RI: rango intercuartílico

rpm: revoluciones por minuto

SAO: síndrome de alergia oral

SCBP: proteína sarcoplásmica de unión a calcio (de su nombre en inglés *sarcoplasmic calcium binding protein*)

sd: sin datos

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (de su nombre en inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEAIC: Sociedad Española de Alergología

SERCA: ATPasa del retículo endoplásmico

SME: *Solenocera melantho*

SME⁺DPT⁺: pacientes con IgE positiva a gamba y a ácaros

SME⁺DPT⁻: pacientes con IgE positiva a gamba e IgE negativa a ácaros

SME⁻DPT⁺: pacientes con IgE negativa a gamba e IgE positiva a ácaros

SME⁻DPT⁻: pacientes con IgE negativa a gamba y a ácaros

SPT: pruebas cutáneas intraepidérmicas (de su nombre en inglés *skin prick test*)

Tc: linfocito T citotóxico

TCEP: tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (de su nombre en inglés *tris (2-carboxyethyl) phosphine clorhydrate*)

TFI: triosa fosfato isomerasa

Th: linfocito T colaborador (de su nombre en inglés *T helper*)

Th1, Th2, Th17: linfocito T colaborador de tipo 1, 2 y 17

TM: tropomiosina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (de su nombre en inglés *tumor necrosis factor*)

Treg: linfocito T regulador

UFT: ultrafiltración tangencial

vs: frente a (del latinismo *versus*)

WHO/IUIS: Organización Mundial de la Salud y Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (de su nombre en inglés *World Health Organization/International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee*)

Índice

	Página
Resumen en castellano	13
Resumen en inglés	15
Lista de figuras	17
Lista de tablas	18
1. Introducción	21
1.1. El Sistema Inmunológico	23
1.2. Alérgenos	25
1.3. Alergia a Alimentos	26
1.4. Alergia a Marisco	28
1.4.1. Epidemiología de la alergia a marisco	29
1.4.2. Alérgenos implicados en la alergia a marisco	30
1.4.2.1. Tropomiosina	31
1.4.2.2. Arginina quinasa	33
1.4.2.3. Cadena ligera de la miosina	34
1.4.2.4. Proteína sarcoplásmica de unión a calcio	35
1.4.2.5. Troponina C	36
1.4.2.6. Triosa fosfato isomerasa	36
1.4.2.8. Fructosa 1-6 bifosfato aldolasa	37
1.4.2.9. Otros alérgenos	37
1.4.3. Reactividad cruzada	39
1.4.3.1. Reactividad cruzada y tropomiosinas	40
1.4.3.2. Reactividad cruzada y otras proteínas	41
1.4.4. Caracterización de los alérgenos de las diferentes poblaciones	43
1.4.5. Manifestaciones clínicas	44
1.4.5.1. Reacciones por toxicidad relacionadas con las biotoxinas marinas	45
1.4.5.2. Intolerancia alimentaria por liberación de aminas vasoactivas	45
1.4.5.3. Reacciones alérgicas por ingesta	45
1.4.5.4. Reacciones alérgicas por inhalación	46
1.4.5.5. Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas	47
1.4.6. Factores que pueden modificar la respuesta clínica en la alergia a alimentos	47
1.4.7. Controversia sobre el posible efecto de la inmunoterapia frente a ácaros en la alergia a marisco	48

1.4.8. El efecto del calor y el cocinado en los alimentos como alérgenos	49
1.4.8.1. El efecto del calor y el cocinado en la alergia a gamba	50
1.4.9. Diagnóstico	51
1.4.9.1. Las cuatro dimensiones del diagnóstico de alergia ¹	51
1.4.9.2. Historia clínica	52
1.4.9.3. Detección de IgE específica	52
1.4.10. Tratamiento	56
1.4.10.1. Recomendaciones actuales	56
1.4.10.2. Futuras terapias	56
2. Hipótesis y objetivos	59
2.1. Hipótesis	61
2.2. Objetivos	61
2.2.1. Objetivo principal	61
2.2.2. Objetivos secundarios	61
3. Material y Métodos	63
3.1. Diseño del estudio	65
3.2. Sujetos del estudio	65
3.2.1. Criterios de inclusión	65
3.2.2. Criterios de exclusión	65
3.3. Variables clínicas y demográficas	65
3.4. Obtención de extractos alérgicos	67
3.4.1. Cuantificación del contenido en proteína de los extractos y rendimiento	68
3.4.2. Identificación de alérgenos en los extractos	68
3.5. Pruebas cutáneas intraepidérmicas	69
3.5.1. Pruebas cutáneas de diagnóstico habitual	69
3.5.2. Pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba preparados para el estudio	70
3.6. Análisis de las muestras de sueros	70
3.6.1. Detección de IgE específica a gambas y ácaros mediante ImmunoCAP®	70
3.6.2. Detección de IgE específica mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	71
3.6.3. Obtención de perfiles proteicos y alérgicos	72
3.6.4. Análisis de reactividad cruzada entre ácaros y gamba	73
3.7. Cronograma	74

3.8. Aspectos éticos	74
3.9. Análisis estadístico	74
4. Resultados	75
4.1. Características clínicas de la población estudiada	77
4.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas	79
4.2.1. Pruebas cutáneas de diagnóstico habitual	79
4.2.2. Pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba preparados específicamente para el estudio	80
4.3. Extractos alergénicos	81
4.3.1 Análisis de los extractos	81
4.3.2. Identificación de proteínas en los extractos	83
4.4. IgE específica mediante enzoinmunoensayo	86
4.4.1. IgE específica a gamba	86
4.4.1. IgE específica a Pen a 1	86
4.5. IgE específica mediante ELISA	87
4.5.1. Resultados de las determinaciones de IgE específica medidas por ELISA	87
4.5.2. Medición de IgE específica a <i>D. pteronyssinus</i> y a <i>S. melantho</i> en diluciones de sueros de los grupos SME ⁻ DPT ⁺ , SME ⁺ DPT ⁻ y SME ⁺ DPT ⁺	91
4.5.2.1. Reactividad IgE específica a <i>D. pteronyssinus</i>	91
4.5.2.1. Reactividad IgE específica a <i>S. melantho</i>	91
4.6. Perfiles proteicos y alergénicos	92
4.6.1. Grupo SME ⁺ DPT ⁺	92
4.6.2. Grupo SME ⁺ DPT ⁻	93
4.6.3. Grupo SME ⁻ DPT ⁺	95
4.6.4. Grupo SME ⁻ DPT ⁻	96
4.7. Análisis de reactividad cruzada entre gamba y ácaros	96
4.7.1 ELISA de competición	96
4.7.1.1. Grupo SME ⁺ DPT ⁺ con fase sólida <i>S. melantho</i> cruda	97
4.7.1.2. Grupo SME ⁺ DPT ⁻ con fase sólida <i>S. melantho</i> cruda	98
4.7.1.3. Grupo SME ⁺ DPT ⁺ con fase sólida <i>D. pteronyssinus</i>	98
4.7.1.4. Grupo SME ⁻ DPT ⁺ con fase sólida <i>D. pteronyssinus</i>	100
4.7.2. Inmunoblots de inhibición	101
4.7.2.1. Grupo SME ⁺ DPT ⁺	101
4.7.2.2. Grupo SME ⁺ DPT ⁻	102

5. Discusión	103
5.1. Problemas en el diagnóstico de la alergia a gamba	105
5.2. Relación entre ácaros y gambas	107
5.2.2. Reactividad cruzada entre gamba y ácaros	109
5.2.3. Relación entre los diferentes patrones de sensibilización y la clínica	110
5.3. Relevancia clínica	110
5.4. Limitaciones del estudio	111
5.5. Líneas de futuro	111
6. Conclusiones	113
7. Bibliografía	117
8. Anexos	133

RESUMEN DE LA TESIS EN CASTELLANO

Introducción

La alergia a marisco es una de las principales causas de alergia a alimentos en adultos, y es una causa frecuente de anafilaxia. Se estima que tiene una prevalencia mundial del 5.4%. Está establecido que la tropomiosina es el alérgeno mayor de la gamba, y se considera un panalérgeno, responsable de la gran reactividad cruzada entre crustáceos y ácaros del polvo doméstico. El perfil de sensibilización alérgica a la gamba de los pacientes puede ser diferente según sea el clima y la exposición a ácaros a los que se vean sometidos. En la actualidad el diagnóstico de alergia a gambas incluye la realización de pruebas intraepidérmicas, determinaciones de IgE específicas y pruebas de provocación oral controlada.

Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la presencia de reactividad cruzada entre ácaros y gamba en nuestra población.

Métodos

Se reclutaron pacientes con pruebas cutáneas positivas a gamba y se clasificaron en función de las manifestaciones clínicas. Se prepararon extractos alérgicos de varias especies de ácaros y gambas, y se cuantificó el contenido proteico. Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas y determinación de IgE específica por absorbancia a todos los extractos, y de IgE específica a gamba y Pen a 1 por enzimoimmunoensayo. Mediante SDS-PAGE y *Western blot* se obtuvieron los perfiles proteicos y alérgicos, y se realizaron ELISA de competición y *Western blot* de inhibición para valorar la reactividad cruzada entre ácaros y gamba.

Resultados

De los 117 pacientes incorporados al estudio, 99 (84.6%) se clasificaron como alérgicos a gamba. Las principales manifestaciones clínicas fueron urticaria/angioedema (42.4%) y anafilaxia (34.4%). El 73.7% de los pacientes alérgicos a gamba también eran alérgicos a ácaros. En los extractos estudiados se detectaron varias proteínas comunes: tropomiosina, paramiosina, arginina quinasa, triosa-fosfato isomerasa y proteína de choque térmico. La determinación de IgE específica a gamba, a Pen a 1 y a los extractos nuevos no presentó diferencias estadísticamente significativas entre alérgicos y no alérgicos. Se demostró reactividad cruzada entre ácaros y gamba, siendo los ácaros el sensibilizador primario.

RESUMEN DE LA TESIS EN CASTELLANO

Conclusión

Este es el primer estudio realizado en Barcelona que demuestra la existencia de reactividad cruzada entre los ácaros del polvo doméstico y las gambas, siendo los ácaros los responsables de la sensibilización primaria. En los extractos de ácaros del polvo doméstico y de gamba estudiados se han hallado proteínas comunes que podrían justificar la reactividad cruzada entre ambos. Las pruebas cutáneas intraepidérmicas a los extractos testados y la determinación de IgE específica a gamba y a Pen a 1, no son capaces de discriminar a los pacientes alérgicos a gamba de los no alérgicos.

RESUMEN DE LA TESIS EN INGLÉS

Background

Shellfish allergy is one of the main causes of food allergy in adults, and often causes anaphylaxis. It is estimated a global prevalence of 5.4%. Tropomyosin is the major allergen in shrimp and it is considered a cross-reactive panallergen, responsible of reactivity between crustaceans and mites. Exposure to mites can modify the divers allergenic profile to shrimp. Currently, shrimp allergy diagnosis include skin prick tests, specific IgE determinations and oral food challenge.

Objectives

The main aim of this study was to evaluate the presence of cross-reactivity between shrimp and house dust mites in our population.

Methods

Patients with positive skin prick test to shrimp were recruited and classified into groups according to the clinics. Different allergenic extracts were prepared from shrimp and house dust mites, and its protein content was achieved. Skin prick tests and specific IgE to shrimp and Pen a 1 was measured. The allergenic profile was studied by means of SDS-PAGE and Western blot. Cross-reactivity was analysed by competition ELISA and Western blot.

Results

117 patients were enrolled, and 99 (84.6%) were classified as allergic to shrimp. The most reported symptoms were urticaria/angioedema (42.4%) and anaphylaxis (34.4%). 73.7% were also allergic to house dust mites. The newly prepared extracts had some proteins in common: tropomyosin, paramyosin, arginine kinase, triose phosphate isomerase and heat shock protein. Specific IgE to shrimp, to Pen a 1, and to the newly extracts did not showed statistical differences between allergic and non-allergic shrimp patients. Cross reactivity between shrimp and mites was demonstrated, with mites acting as a primary sensitizer.

Conclusion

This is the first study performed in Barcelona that demonstrate the cross-reactivity between house dust mites and shrimp allergens. The primary sensitization was due to house dust mites. Cross reactivity could be explained because of the common proteins included in both extracts. Intraepidermal cutaneous test to these extracts, and specific IgE determinations to shrimp and to Pen a 1, fail to discern between shrimp allergic and non-allergic patients.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Árbol taxonómico de las especies comestibles de productos del mar	28
Figura 2. Prevalencia de alergia a marisco en diferentes países del mundo	29
Figura 3. Prevalencia de alergia a marisco en diferentes países de Europa	30
Figura 4. Estructura de la tropomiosina en hélice súper-enrollada	32
Figura 5. Complejo Actina-Troponina-Tropomiosina	32
Figura 6. Estructura proteica de la Arginina Quinasa	34
Figura 7. Representación de la estructura mano-EF	35
Figura 8. Pruebas cutáneas intraepidérmicas	52
Figura 9. Diagrama de barras representativo de los síntomas de los pacientes y su frecuencia expresada en porcentaje	79
Figura 10. Representación gráfica de los rendimientos de los extractos de gambas	82
Figura 11. Valores de absorbancia	89
Figura 12. Reactividad IgE específica frente a <i>D. pteronyssinus</i> en los grupos SME ⁺ DPT ⁺ , SME ⁻ DPT ⁺ y SME ⁺ DPT ⁻	91
Figura 13. Reactividad IgE específica frente a <i>S. Melanthero</i> cruda en los grupos SME ⁺ DPT ⁺ , SME ⁺ DPT ⁻ y SME ⁻ DPT ⁺	91
Figura 14. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME ⁺ DPT ⁺ frente a extracto de gamba	92
Figura 15. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME ⁺ DPT ⁺ frente a extracto de ácaro	93
Figura 16. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME ⁺ DPT ⁻ frente a extracto de gamba	94
Figura 17. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME ⁺ DPT ⁻ frente a extracto de ácaro	94
Figura 18. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME ⁻ DPT ⁺ frente a extracto de ácaro	95
Figura 19. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME ⁻ DPT ⁺ frente a extracto de gamba	95
Figura 20. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME ⁻ DPT ⁻ frente a extracto de gamba y frente a extracto de ácaro	96

	Página
Figura 21. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME ⁺ DPT ⁺ con fase sólida <i>S. melantho</i> cruda	97
Figura 22. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME ⁺ DPT ⁻ con fase sólida <i>S. melantho</i> cruda	98
Figura 23. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME ⁺ DPT ⁺ con fase sólida <i>D. pteronyssinus</i>	99
Figura 24. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME ⁻ DPT ⁺ con fase sólida <i>D. pteronyssinus</i>	100
Figura 25. Inmunoblot de inhibición: Perfil alergénico del grupo SME ⁺ DPT ⁺ frente a extracto de gamba	101
Figura 26. Inmunoblot de inhibición: Perfil alergénico del grupo SME ⁺ DPT ⁻ frente a extracto de gamba	102

Lista de Tablas

Tabla 1. Alérgenos de crustáceos y mariscos con reactividad IgE demostrada	38
Tabla 2. Porcentaje de pacientes sensibilizados a diferentes proteínas	39
Tabla 3. Variables clínicas y demográficas	78
Tabla 4. Resultados destacados de las pruebas cutáneas intraepidérmicas	80
Tabla 5. Resultados de las pruebas cutáneas intraepidérmicas con diferentes extractos de gambas	80
Tabla 6. Concentración de proteína total y rendimiento de los extractos de gamba elaborados	82

	Página
Tabla 7. Alérgenos identificados en el extracto de <i>S. melantho</i> cruda	84
Tabla 8. Alérgenos identificados en el extracto de <i>D. Pteronyssinus</i>	85
Tabla 9. Determinaciones de IgE específica a gamba	86
Tabla 10. Determinaciones de IgE específica a Pen a 1	86
Tabla 11. Valores de las determinaciones de IgE específica a gambas y ácaros medida por ELISA	89
Tabla 12. Tabla de correlaciones de las absorbancias de los extractos	90

1. Introducción

1.1. El Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico comprende todos los procesos encaminados a protegernos frente a antígenos extraños, como bacterias, virus, parásitos, hongos, toxinas y células cancerosas ¹. En términos generales se divide en inmunidad innata, que representa la primera línea de defensa y es independiente del antígeno, y en inmunidad adaptativa que es dependiente y específica de antígeno, a la que pertenecen los linfocitos B y T ¹.

En la respuesta innata ¹⁻³ están implicadas numerosas células, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células asesinas naturales y linfocitos.

Los neutrófilos son células polimorfonucleares, de vida media corta, con enzimas líticas y propiedades fagocitarias.

Los macrófagos son células de vida media más larga, con capacidad de fagocitosis e implicación en la presentación de linfocitos T.

Las células dendríticas participan en las mismas acciones que los macrófagos, y además actúan de mensajeros entre las respuestas innata y adaptativa.

Los mastocitos y basófilos participan en la respuesta inflamatoria aguda, como la que ocurre en alergia. Los basófilos son células que residen en el torrente sanguíneo. Generalmente los mastocitos se hallan en el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos, principalmente en las superficies mucosas, son productores tempranos de citoquinas y funcionan además como células centinela. Los eosinófilos son granulocitos con propiedades fagocitarias y de destrucción de parásitos. Junto a los mastocitos y basófilos, controlan mecanismos asociados a la respuesta alérgica. Las células asesinas naturales tienen un papel fundamental en la defensa frente a tumores y en la destrucción de células infectadas por virus mediante la liberación de perforinas y granzimas que inducen apoptosis, además de ser la fuente de interferón gamma que participa en la presentación de antígenos. Los linfocitos tienen propiedades reguladoras y cada subtipo selectivamente produce citoquinas determinadas que inducen respuestas inmunológicas concretas ¹⁻³.

Las funciones principales de la respuesta inmune adaptativa son el reconocimiento de antígenos extraños, la generación de vías inmunológicas específicas que eliminen patógenos concretos o células infectadas por patógenos, y el desarrollo de memoria inmunológica ⁴.

Las células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T antígeno-específicos, cuya proliferación se activa a través de las células presentadoras de antígenos, y los linfocitos B que se diferencian a células plasmáticas para producir anticuerpos ^{1,3,4}.

INTRODUCCIÓN

Cada célula T expresa en su membrana un receptor único y exclusivo de unión de antígenos, llamado receptor de célula T, y tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse si recibe la señal adecuada. Se dividen en células T citotóxicas (Tc), que están implicadas en la destrucción de células infectadas o de células tumorales, y en células T colaboradoras (Th), a su vez con varios subtipos, siendo Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (T reg) las más importantes.

La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de interferón-gamma (IFN- γ), que activa la función bactericida de los macrófagos y potencia la inmunidad frente a virus y patógenos intracelulares.

La respuesta Th2 se identifica por la liberación de interleucinas (IL) de tipo 4, 5 y 13 (IL-4, IL-5 e IL-13), implicadas en el desarrollo de inmunoglobulinas E (IgE) y en el reclutamiento de mastocitos y eosinófilos, esenciales en la respuesta a parásitos. Las IgE se asocian a las reacciones alérgicas, y un desbalance de la producción de citoquinas Th2 está asociado al desarrollo de condiciones atópicas.

La respuesta Th17 se determina por la producción de IL-17, relacionada con mecanismos inflamatorios.

Las células T reg limitan y suprimen la respuesta inmunológica, controlando respuestas aberrantes a antígenos propios y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, ayudan a la resolución de las respuestas inmunes normales, y tienen un papel fundamental en el desarrollo de tolerancia inmunológica frente a antígenos externos, como los alimentos.

Tras una respuesta inmunológica, la mayoría de las células T citotóxicas y de células T colaboradoras mueren, quedando un remanente de células T de memoria ^{1,3-5}.

Las células B pueden reconocer antígenos sin la participación de las células presentadoras de antígenos, sólo por la expresión de receptores en su membrana. Su función principal es la producción de anticuerpos frente a antígenos extraños, para lo cual necesitan diferenciarse, bien a células plasmáticas, que mueren por apoptosis tras eliminar el agente inductor de la respuesta inmune, o bien, a células B de memoria, que no se destruyen y continúan expresando receptores de unión a antígenos, por lo que pueden desencadenar una rápida respuesta en caso de nueva exposición al antígeno. Las células B producen 5 tipos principales de anticuerpos, Inmunoglobulinas (Ig) de diferentes tipos, que son, IgA, IgD, IgG, IgM, e IgE, esta última implicada en las respuesta a infecciones parasitarias y en las reacciones de alergia ^{1,3-5}.

Los defectos o fallos en el funcionamiento de la inmunidad innata o adaptativa pueden traducirse en enfermedades, ya sea por reacción inadecuada (en la autoinmunidad), por ineficacia (en las inmunodeficiencias) o por hiperactividad (en las reacciones de hipersensibilidad) ^{1,3,4}.

INTRODUCCIÓN

En los fenómenos de autoinmunidad se produce una pérdida de la homeostasis en la que el organismo promueve una respuesta anormal frente a sus propios tejidos, y destaca la intervención de células T autoreactivas, autoanticuerpos e inflamación ^{1,3}.

Cuando la habilidad de defensa del sistema inmunológico está comprometida hablamos de inmunodeficiencias, que pueden ser primarias, resultado de un defecto genético, o secundarias a infección, malnutrición, autoinmunidad o por tratamientos con fármacos inmunosupresores ^{1,3}.

En líneas muy generales, las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro grupos ^{1,3,5,6}:

- Hipersensibilidad tipo I o inmediata, se trata de una reacción alérgica en la que las células plasmáticas secretan IgE. Los anticuerpos IgE se unen a los receptores de mastocitos y basófilos, de manera que tras la nueva exposición al antígeno (que en este caso recibe el nombre de alérgeno) se provoca su degranulación, secretando mediadores activos como histamina, leucotrienos y prostaglandinas.
- Hipersensibilidad tipo II o citotóxica, que ocurre cuando anticuerpos de tipo IgG e IgM se unen a partículas celulares del paciente, provocando lisis y muerte celular.
- Hipersensibilidad tipo III, en la que IgG e IgM se unen a proteínas solubles formando inmunocomplejos que se depositan en los tejidos y activan el complemento, cascadas inflamatorias, reclutamiento de neutrófilos y degranulación mastocitaria.
- Hipersensibilidad tipo IV o celular, se trata de una reacción independiente de anticuerpos, en la que se produce una hiperestimulación de células T, monocitos y macrófagos, con liberación de citoquinas que provocan inflamación, muerte celular y daño tisular.

1.2. Alérgenos

El término alérgeno se utiliza para describir aquellos antígenos con inmunogenicidad, es decir, con capacidad para estimular la producción de IgE a través de una respuesta Th2 selectiva en personas genéticamente predispuestas, e inducir una reacción alérgica en personas previamente sensibilizadas ⁷.

El epítipo es la parte de la superficie del antígeno que a nivel atómico interactúa con la IgE ^{7,8}. Cada fuente alérgica contiene diferentes componentes alérgicos y cada uno de ellos tiene varios epítipos. Cada especie presenta epítipos alérgicos especie-específicos, de manera que los anticuerpos generados frente a estas estructuras sólo se unen a epítipos alérgicos de esta especie en concreto. Pero aún así, especies

INTRODUCCIÓN

relacionadas biológicamente pueden presentar proteínas con estructuras similares, por lo que pueden compartir epítomos, dando lugar a fenómenos de reactividad cruzada ⁸.

Los anticuerpos IgE producidos por las células B pueden estar dirigidos frente a epítomos secuenciales, también llamados lineales, que están comprendidos por cadenas de aminoácidos consecutivos de la estructura primaria de la proteína, o frente a epítomos conformacionales, en relación a la estructura terciaria de la proteína, en los que residuos de aminoácidos de diferentes regiones del alérgeno se encuentran espacialmente próximos debido a plegamientos de la proteína ^{9,10}.

Con el fin de conseguir un lenguaje científico global, se ha consensuado que todos los alérgenos reciban un nombre asignado de la misma manera y siempre partiendo del nombre de su fuente en latín. Para ello, la Organización Mundial de la Salud y el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/IUIS, *World Health Organization/International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee*) ¹¹, han establecido que los alérgenos altamente purificados se designen mediante el siguiente algoritmo: las tres primeras letras del género en latín, un espacio, la primera letra del nombre de la especie en latín, un segundo espacio, y finalmente un número arábigo, y de esta manera, por ejemplo, el primer alérgeno del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* se denomina Der p 1. En caso de que dos fuentes tengan la misma denominación, se discriminan añadiendo una o varias letras según sea preciso. Generalmente los alérgenos se numeran en el orden en que se han aislado, aunque existen algunas excepciones, como que habitualmente se asigna el número uno al alérgeno mayor, o que alérgenos estructuralmente homólogos pero de diferentes especies reciben el mismo número, aunque no presenten reactividad cruzada ¹².

1.3. Alergia a Alimentos

La alergia a alimentos mediada por IgE es una respuesta alérgeno específica que consta de dos fases ^{10,13}.

- La primera es la fase de sensibilización, en la que el alimento penetra en el organismo a través del sistema digestivo, la piel o las mucosas, y se pone en contacto con el sistema inmune bajo condiciones de dominancia Th2, promoviendo la generación de anticuerpos IgE específicos ^{10,13}.

- La segunda fase, de inducción, se produce tras un nuevo contacto con el mismo alimento que actúa como alérgeno, uniéndose a sus anticuerpos IgE específicos. A continuación

INTRODUCCIÓN

se produce una liberación de mediadores, como la histamina y los leucotrienos producidos por los basófilos y los mastocitos activados, que generan una respuesta clínica rápida con síntomas diversos de diferente gravedad, como urticaria, picor, sibilantes, disnea, dolor abdominal, anafilaxia o shock anafiláctico. Se necesita la presencia de dos IgE para la unión de cada alérgeno a la célula efectora ^{10,13}.

En la mayoría de países las causas más importantes de muertes por anafilaxia son los fármacos y los alimentos ¹⁴. La tasa de muertes por anafilaxia causada por alimentos oscila entre el 0.03 y 0.3 por millón de habitantes por año, aunque puede existir un sesgo por la proporción de muertes en las que el alérgeno no puede ser identificado ¹⁴. Se ha demostrado que el alimento causante de la anafilaxia cambia en función de los patrones específicos de consumo en los diferentes países ¹⁴.

El diagnóstico de la alergia a alimentos se basa en una historia clínica muy detallada y la realización de pruebas complementarias para detectar las IgE, como las pruebas cutáneas intraepidérmicas (SPT), por lo común conocidas por su nombre en inglés *prick*, y la determinación sanguínea de IgE específica, medida en kilounidades por litro de sangre (KUA/L). En casos seleccionados puede ser necesario realizar pruebas de administración oral controlada ¹³.

La evitación del alimento es la intervención clave en el manejo de la alergia alimentaria, que lleva a la resolución completa o casi completa de los síntomas ¹⁵. Sin embargo, se han realizado pocos trabajos de investigación con esta premisa debido a la dificultad de elaborar ensayos clínicos por cuestiones éticas ¹⁵. Cabe destacar que la falta de evidencia científica no significa que las dietas de eliminación no sean efectivas, sino que cualquier recomendación realizada sobre ellas se basa en la confianza puesta en la opinión y experiencia de expertos ¹⁵. Las restricciones alimentarias tienen como objetivo eliminar los alérgenos culpables, y se deben personalizar a cada patrón específico de alergia individual y según las necesidades de la persona afectada ¹⁵.

La alergia alimentaria supone un profundo impacto psicosocial en los pacientes ^{16,17}. La necesidad de vigilancia constante para evitar los alérgenos y el manejo diario de la alergia alimentaria impacta en las actividades familiares diarias, como en la compra y en la preparación de las comidas, y también en la participación de diferentes eventos sociales ^{16,17}.

La alergia alimentaria puede ocasionar un detrimento en aspectos de la calidad de vida, ya sea en la parte emocional, en el funcionamiento físico e incluso en la calidad de vida

en la escuela ¹⁶. La alergia a alimentos es el origen de múltiples casos de acoso escolar 18–20.

1.4. Alergia a Marisco

Dentro del Reino Animal, los productos del mar que habitualmente se consumen son los pescados, que pertenecen al *Phylum Chordata*, y los mariscos ²¹. Los mariscos incluyen a los crustáceos, que pertenecen al *Phylum Arthropoda*, y a los moluscos, que pertenecen al *Phylum Mollusca* ²¹. Los artrópodos comestibles pertenecen al *subphylum Crustacea*, concretamente al orden *Decapoda*, destacando gambas, langostinos, cangrejos, cigalas y langostas, entre otros ²¹. Otros artrópodos son los arácnidos y los insectos ²¹. Los moluscos incluyen bivalvos lamelibránquios, cefalópodos y gasterópodos ²¹.

Las palabras inglesas *shrimp* y *prawn*, que corresponden a gamba y langostino en castellano, se utilizan indistintamente en la mayoría de los artículos de investigación ²². El término *prawn* se utiliza más en Gran Bretaña, Australia y países de la *Commonwealth*, mientras que el término *shrimp* se usa más en Estados Unidos y Europa ²².

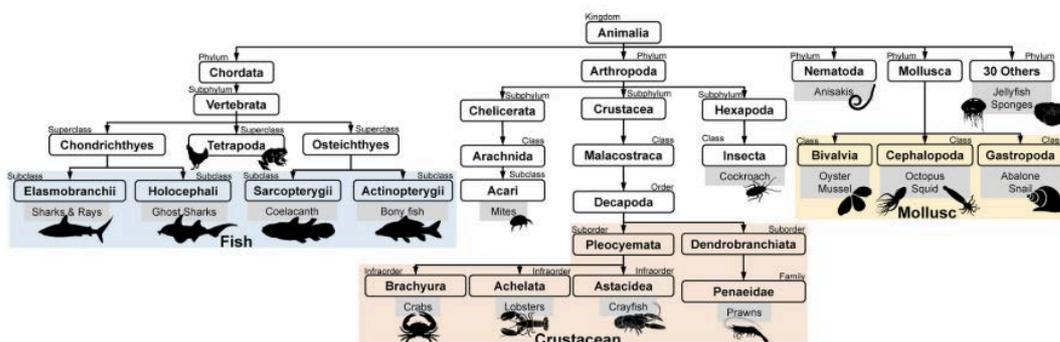


Figura 1. Árbol taxonómico de las especies comestibles de productos del mar.

Se destaca en azul los pescados, en rosa los crustáceos y en amarillo los moluscos ²².

La alergia a marisco es una de las principales causas de alergia a alimentos en adultos, y es una causa frecuente de anafilaxia ²³. Principalmente ocurre por gambas, cangrejo, langosta, almeja, ostra y mejillón ²³. Las alergias a diferentes tipos concretos de marisco pueden reflejar el consumo regional de especies determinadas ²³.

Según el Informe de Consumo Alimentario que genera anualmente el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el consumo doméstico del grupo mariscos-moluscos-crustáceos se ha reducido en los hogares en un 2.8% en el año 2017, con un incremento de precio del 3.5% respecto a 2016 ²⁴. El consumo per cápita es de 6,28 kilos por persona y año, que corresponde a un 6.5% menor al consumo por persona de 2016 ²⁴. Las

comunidades con un mayor consumo relativo son Galicia, Principado de Asturias, Cataluña y Castilla y León ²⁴.

1.4.1. Epidemiología de la alergia a marisco

Se estima que el 2.5% de la población general ha tenido alguna reacción adversa a algún producto del mar, y aunque su prevalencia varía en diferentes países, parece que es más importante en aquellas zonas donde son un alimento básico de la dieta ²². En una revisión sistemática realizada recientemente se observó que la prevalencia global de alergia a marisco varía entre el 0% y el 10.3% en función de los métodos de diagnóstico utilizados ²⁵. La prevalencia mundial aproximada es del 5.4% ²⁶.

En Estados Unidos la prevalencia de alergia a gambas en niños (determinada por serologías) alcanza el 6.1% ²⁷, mientras que en adultos (medida por encuestas poblacionales) oscila entre el 0% ²⁶ y el 2% ²⁸. En Canadá oscila entre el 0.73% y el 1.6% ²⁹.

En Méjico la prevalencia de alergia a productos del mar reportadas por los estudiantes universitarios es del 3.5%, siendo las gambas las más frecuentes de todos ellos, con un 2.8% ³⁰.

Se ha determinado que la prevalencia en Australia es de un 2.4% ²⁶.

En niños asiáticos la alergia a marisco predomina sobre otras causas de alergia alimentaria, y se han calculado prevalencias de 5.23% en Singapur, 5.12% en Filipinas ³¹, y de 0.9% en preescolares ³² y 1.8% en niños y preadolescentes en Hong Kong ³³.

Aunque en el sur de la India el consumo de gambas es muy bajo, la sensibilización alérgica (medida por la determinación de IgE) alcanza el 15.53% ³⁴.

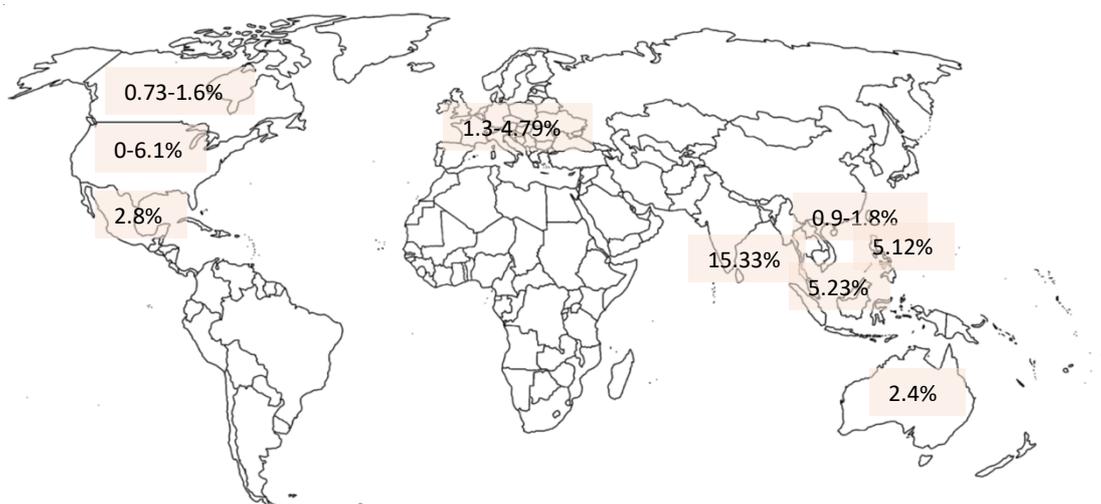


Figura 2. Prevalencia de alergia a marisco en diferentes países del mundo

INTRODUCCIÓN

En Europa se considera que la prevalencia de alergia a gamba oscila entre el 1.3% ³⁵ y el 4.79% ³⁶, con números dispares en función de la población analizada: Utrecht 3.94%, Lodz 4.93%, Sofia 6.27%, Zurich 6.89%, Reykjavik 2.76%, global de Suiza 0%, global de Islandia 2.8%, Noruega 6.3%, Suecia 4.8%, Gran Bretaña 6.2%, Alemania 4.4%, Italia 10.2% y Francia 7% ²⁶.

Se ha determinado que la prevalencia de la alergia a gambas en España es del 4.9% ²⁶, pero con diferencias según la ciudad estudiada, con valores en Madrid del 5.29% ³⁶, en A Coruña del 0.9% ³⁷, y en Barcelona del 5.81% en niños y 14.9% en adultos ³⁸. Según el documento *Alergológica 2015* la alergia a alimentos supone el 52.9% de los motivos de consulta en Alergología en España, y la alergia a marisco es el tercer grupo de alimentos más frecuentemente implicados, tras frutas y frutos secos ³⁹.

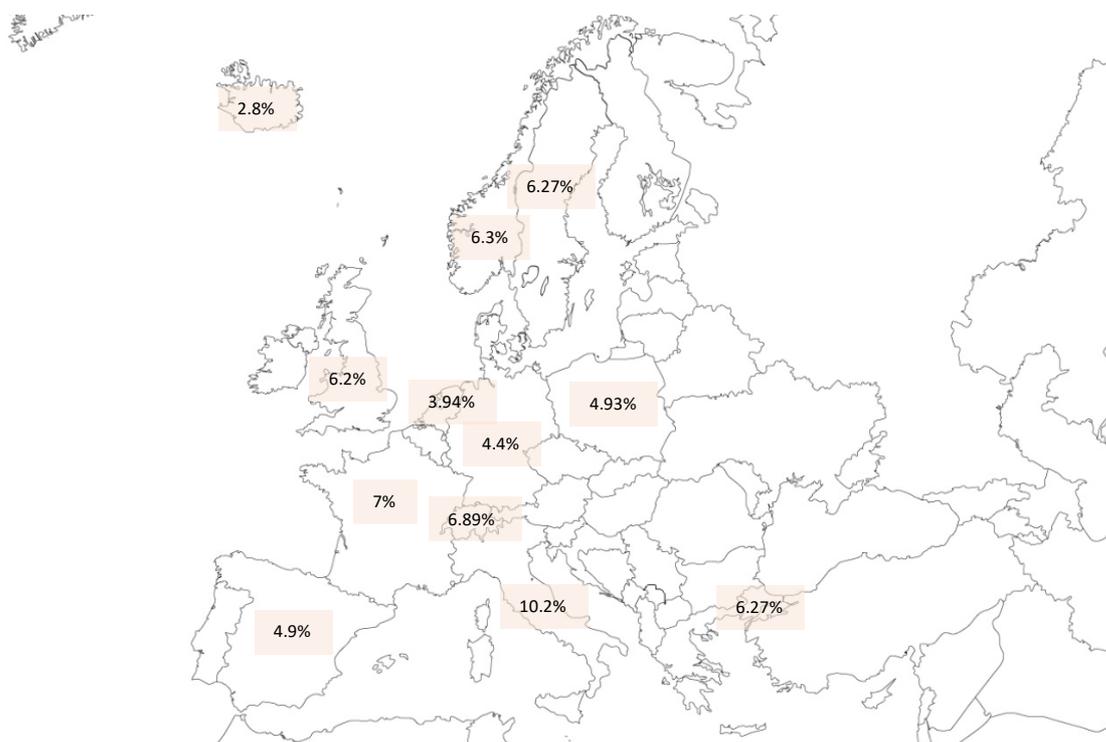


Figura 3. Prevalencia de alergia a marisco en diferentes países de Europa

1.4.2. Alérgenos implicados en la alergia a marisco

Los alérgenos del marisco se encuentran fundamentalmente en las partes comestibles de la carne. Gracias a los avances en la identificación de proteínas y a las técnicas de caracterización de alérgenos, se han podido identificar muchos en las últimas dos

décadas. Habitualmente son proteínas del tejido muscular, del cefalotórax o de las huevas. Sus funciones fisiológicas está relacionadas con la movilidad muscular y el metabolismo energético ²².

1.4.2.1. Tropomiosina

En 1981 se identificó una proteína termoestable de 38 kilodalton (kDa), designada Antígeno-II, que parecía ser la responsable de la alergia a gambas en un paciente que había sufrido numerosos episodios de anafilaxia tras su ingesta ⁴⁰. En los siguientes años se publicaron varios trabajos demostrando que los pacientes con síntomas de hipersensibilidad inmediata tras la ingesta de gamba tenían pruebas cutáneas y determinación de IgE positivas a crustáceos ⁴¹⁻⁴³.

Enseguida empezaron a publicarse diferentes estudios que indicaban que los alérgenos de crustáceos parecían compartir estructuras antigénicas entre sí ^{41,42,44}, e incluso con moluscos ⁴⁵.

En 1989 se aislaron dos proteínas termoestables en extractos de *Penaeus indicus*, que se denominaron Sa-I y Sa-II, con un peso molecular de 8.2 kDa y 34 kDa respectivamente. Compartían el 54% de los epítomos, lo que sugería que Sa-I fuera un fragmento de Sa-II. Las características de Sa-II eran muy similares a las de la proteína aislada en 1981 ⁴⁶.

En 1990, en el '46 Annual Meeting' que se llevó a cabo en Baltimore (Maryland) se presentaron dos comunicaciones de interés. Por un lado, se aislaron diferentes alérgenos de *Penaeus setiferus*, viéndose que la mayoría de los pacientes estaban sensibilizados a dos de ellos ⁴⁷. En el segundo, se elaboraron anticuerpos monoclonales que reconocían epítomos en diferentes proteínas de la gamba ⁴⁸.

Al año siguiente, en el '47 Annual Meeting' de San Francisco (California) se presentó un estudio con la purificación de una proteína que denominaron Pen a bd36K, y se sugería que se trataba del alérgeno mayor de la gamba ⁴⁹.

En el 'International Workshop' celebrado en Viena (Austria) en 1992, el mismo grupo presentó una comunicación con la secuencia de aminoácidos de esta proteína, habiéndose comprobado su semejanza con la tropomiosina de tejido muscular ⁵⁰.

En 1993 se publicó el primer artículo que confirmaba que la proteína Sa-II era la tropomiosina (TM) de la musculatura de las gambas. Se estableció que la tropomiosina era el alérgeno mayor de la gamba y que la gran reactividad cruzada que existía entre los crustáceos se debía a la elevada homología que presentaban sus tropomiosinas. Al haber sido identificada en *Penaeus indicus* se le asignó el nombre de Pen i 1 ⁵¹.

Este hallazgo se confirmó con posteriores aislamientos de la tropomiosina en otras especies de gamba, como *Parapenaeus fissurus* (Par f 1) ⁵², *Penaeus aztecus* (Pen a 1) ⁵³ y *Metapenaeus ensis* (Met e 1) ⁵⁴.

INTRODUCCIÓN

Las tropomiosinas pertenecen a una familia de proteínas de unión a actina que participan en la contracción muscular de vertebrados e invertebrados ⁵⁵. Forman complejos con las troponinas y están implicadas en la regulación de la contracción del músculo estriado mediando la interacción del complejo actina-miosina ⁵⁶⁻⁵⁸. Además de estar presentes en todas las células musculares (músculo esquelético, músculo cardíaco y músculo liso), también pueden encontrarse en otros tejidos, como en el cerebro, en las plaquetas o en los fibroblastos ⁵⁹.

En condiciones fisiológicas la tropomiosina es una proteína α -hélice súper-enrollada homodimérica ⁵⁹, lo que le confiere una gran estabilidad y resistencia al calor y a las altas presiones ^{60,61}.

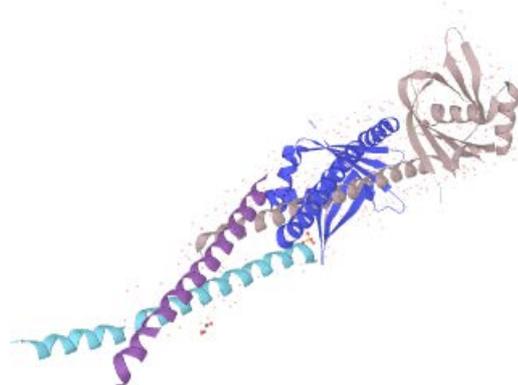


Figura 4. Estructura de la tropomiosina en hélice súper-enrollada ⁶²

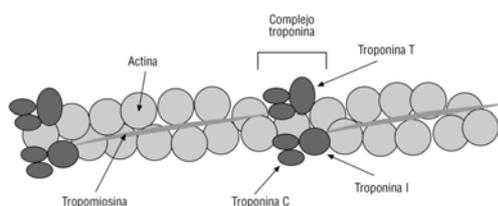


Figura 5. Complejo Actina-Troponina-Tropomiosina ⁶³

Se han realizado múltiples trabajos para estudiar los efectos del calor y la digestión enzimática en las tropomiosinas. Aunque se trata de una proteína altamente estable al calor, varios estudios han demostrado un aumento de la unión de anticuerpos a la tropomiosina tras un tratamiento con altas temperaturas ^{60,61}.

Los estudios de digestión simulada han demostrado que las tropomiosinas son vulnerables a la pepsina gástrica y a la degradación por tripsina, y se especula con la posibilidad de que puede ser un buen método para reducir la alergenicidad de la gambas, manteniendo su inmunogenicidad ^{64,65}.

INTRODUCCIÓN

Aunque las tropomiosinas de los diferentes tejidos son altamente homólogas, se han descrito múltiples isoformas posiblemente relacionadas con la regulación del mecanismo contráctil de los diferentes tipos celulares ⁵⁹.

Se considera que la tropomiosina es un panalérgeno de muchas especies de invertebrados, y se ha identificado como alérgeno mayor en otros crustáceos (langosta, cangrejo, krill), moluscos (mejillón, ostra, vieira, pulpo, calamar, caracol, oreja de mar, caracola, almeja, navaja), cucarachas y ácaros ^{55,60,74–80,66–73}.

Las tropomiosinas de crustáceos presentan una elevada homología en la secuencia de aminoácidos entre sí, hasta el 98%; la homología entre las tropomiosinas de moluscos y crustáceos es de aproximadamente un 65% ⁵⁵; y las tropomiosinas de los vertebrados comparten un 55% de homología en la secuencia ⁵⁵. La tropomiosina de vertebrados no se considera un alérgeno mayor de la carne, porque independientemente del grado de homología, pequeñas diferencias en la secuencias de aminoácidos le confieren una pérdida total de alergenicidad, y además es muy poco estable al calor y a la digestión ^{81,82}. Esto explica porque los alérgicos a gamba no presentan síntomas clínicos en relación a la ingesta de carne ⁸².

La cuantificación de la IgE específica a tropomiosina en pacientes alérgicos a gambas ha demostrado que el 72-98% de pacientes presentan unión IgE al alérgeno purificado ^{83–85}. Los estudios de mapeo de epítomos han puesto en evidencia la presencia de varios epítomos de unión y entrecruzamiento en basófilos de pacientes alérgicos a gambas ^{51,83,86–92}, y aunque se pensó que un mayor reconocimiento de epítomos en los niños se asociaba a una mayor expresión clínica ⁸³, no se ha corroborado en estudios posteriores ^{89,93}.

Parece que, en algunas poblaciones, la presencia de IgE a tropomiosina predice mejor la alergia a gamba que las pruebas cutáneas y la determinación de IgE a gamba ^{85,94,95}.

1.4.2.2. Arginina quinasa

En 2003 se identificó un nuevo alérgeno de gamba en *Penaeus monodon*, siendo una proteína muscular con actividad arginina quinasa (AK), y un tamaño molecular de 40 kDa, que se denominó Pen m 2 ⁹⁶. Se ha descrito como alérgeno en otras especies de gambas, en otros crustáceos como el cangrejo, en cefalópodos, y en otros invertebrados, como ácaros, cucarachas, grillos, gusanos de seda y polillas, con gran homología de secuencia entre ellas ^{97,98,107–110,99–106}.

Se trata de una fosfoquinasa termolábil catalizadora de transferencias reversibles del grupo fosfato en el sistema adenosina difosfato – adenosina trifosfato (ADP-ATP). Está involucrada en la regulación de los niveles de ATP celular y es un enzima esencial en el metabolismo energético de los invertebrados ^{111,112}.

INTRODUCCIÓN

Análisis filogenéticos muestran una homología de secuencia en las arginina quinasa de diferentes especies de hasta el 39%, lo que manifiesta su ancestro común. Sin embargo la organización génica es altamente divergente y variable. La secuencia de aminoácidos comparte una identidad del 54% entre crustáceos y moluscos ¹¹³.

El porcentaje de pacientes alérgicos a gamba que reconocen la arginina quinasa no está bien definido, y oscila entre en 10% ⁹⁹ y un 51% ⁸³ según la serie.

Los estudios de estabilidad térmica demuestran que la arginina quinasa forma agregados a temperaturas superiores a los 44°C ¹¹⁴, y se ha demostrado la pérdida de reactividad IgE tras los tratamientos con calor y cambios en el pH ^{61,114}.



Figura 6. Estructura proteica de la Arginina quinasa ⁶²

La estructura de la gamba consta de dos regiones anatómicas principales: el abdomen, que es la parte que habitualmente se considera comestible e incluye la musculatura abdominal y el intestino, y el cefalotórax, que contiene el cerebro, el corazón, el estómago y la vesícula. En algunos países es frecuente el consumo de partes del cefalotórax. Se ha postulado que alérgenos presentes en el cefalotórax de las gambas pueden ser específicos de esta estructura, y no estar presentes en el tejido muscular o bien, estarlo en muy pequeñas cantidades. Uno de estos alérgenos parece que puede ser la arginina quinasa ¹¹⁵.

1.4.2.3. Cadena ligera de la miosina

La cadena ligera de la miosina (MLC) como alérgeno se identificó en 2008 en *Litopenaeus vannamei*, y se denominó Lit v 3. Forma parte del gran complejo macromolecular de la miosina que participa en la estructura proteica funcional del músculo. Esta proteína multimérica está compuesta por dos cadenas pesadas (de aproximadamente 200 kDa) y cuatro cadenas ligeras (de unos 18-20 kDa cada una).

INTRODUCCIÓN

Las cadenas ligeras pertenecen a la familia de las calmodulinas, y unen calcio a través de su dominio mano-EF ¹¹⁶. Las estructuras mano-EF están formadas por dos hélices alfa (denominadas hélices E y F) conectadas con un bucle capaz de unir iones de calcio, con una configuración tridimensional que recuerda a una mano, como se aprecia en la figura 7 ¹¹⁷.

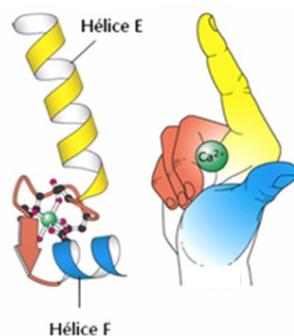


Figura 7. Representación de la estructura mano-EF ¹¹⁸

Hay dos clases de cadenas ligeras de la miosina, la cadena ligera esencial (MLC1 o cadena α) y la cadena ligera reguladora (MLC2 o cadena β) ¹¹⁶. La cadena ligera esencial se ha caracterizado como alérgeno de gambas ⁸⁴ y de cangrejo ¹¹⁹, y la cadena ligera reguladora en langosta ¹²⁰, otras gambas, cangrejos y cucarachas ^{61,84,119,121}.

La cadena ligera de la miosina es una proteína estable al calor y al pH ¹¹⁹. Algunos autores han demostrado unión a IgE sólo en extracto cocinado ⁶¹ y en cambio, otros grupos detectan unión de tipo IgE con extractos de gamba cruda y cocida, e incluso a veces con mayor intensidad en el extracto proteico crudo ¹²¹. Se ha postulado que pueda deberse a la existencia de varias isoformas de proteínas en distintas subespecies de gambas o en diferentes grupos de edad de los pacientes ⁶¹.

Se considera un alérgeno menor, con una frecuencia de sensibilización entre el 19% y el 55% ^{84,93,121}. En alguna ocasión, es la única proteína que los alérgicos reconocen ¹²¹.

1.4.2.4. Proteína sarcoplásmica de unión a calcio

La primera vez que se postuló que la proteína sarcoplásmica de unión a calcio (SCBP) era un nuevo alérgeno de gambas fue en 2008 en *Penaeus monodon* (Pen m 4) ¹²², confirmándose en 2009 al aislarse y secuenciarse en *Litopenaeus vannamei* (Lit v 4) ¹¹⁷. Se trata de una proteína de 20-22 kDa con cuatro dominios en mano-EF de unión a calcio ¹¹⁷.

Se encuentran exclusivamente en invertebrados y parece que, entre otras, tiene funciones análogas a la parvalbúmina de los vertebrados implicadas en la contracción muscular. La identidad de secuencia varía entre las diferentes especies y se han caracterizado

INTRODUCCIÓN

múltiples isoformas ¹²³. Son proteínas resistentes al calor y estables tras cambios en el pH ¹²⁴.

Se ha presentado como alérgeno en gambas y cangrejos, con una alta homología de secuencia entre crustáceos, que puede llegar al 98%, mientras que la homología entre crustáceos y moluscos apenas alcanza el 20% ^{61,84,99,103,117,122,124}.

Aunque se considera un alérgeno menor, la proteína sarcoplásmica de unión a calcio es la responsable del 29 – 50% de las uniones IgE en pacientes alérgicos a gambas de algunas poblaciones ⁸³. Se ha descrito que los niños tienen mayores niveles de anticuerpos IgE, uniones más intensas a los péptidos de gamba y mayor diversidad de epítomos que los adultos ⁸³. Parece que tener unas pruebas positivas a la proteína sarcoplásmica de unión a calcio podría ser importante para predecir la clínica de los pacientes ⁹³.

Al igual que con la tropomiosina, se han identificado varios epítomos de MLC, AK y SCBP, y se ha postulado que puedan usarse en el futuro como herramienta diagnóstica ^{83,89}.

1.4.2.5. Troponina C

La troponina C se describió por primera vez como alérgeno en 2011 en *Crangon crangon* (Cra c 6), al ser reconocida por el 29% de pacientes alérgicos a gamba ⁸⁴. En estudios posteriores se han observado una gran variabilidad de reconocimiento, con valores del 12% ⁸⁴, 17.2% ⁹³, incluso hasta el 33% ¹²⁵.

La troponina, junto a la actina y la tropomiosina, forman los filamentos delgados de las fibras musculares. El complejo de la troponina está formado por tres subunidades, Troponina C, I y T. La troponina C es una proteína de unión a calcio que contiene cuatro dominios mano-EF, de los que dos contienen asas para ligar calcio. Cuando los iones de calcio se unen a la troponina, la posición de la tropomiosina cambia y permite la unión de la actina a la miosina. Se ha demostrado el potencial alergénico de las subunidades C e I ^{126,127}. Se ha identificado como alérgeno en otras gambas ¹²⁸, langosta ¹²⁹, percebe ¹³⁰, cucarachas ¹³¹ y en ácaros de depósito ¹³².

1.4.2.6. Triosa fosfato isomerasa

La triosa fosfato isomerasa (TIM) se considera un alérgeno menor, con una frecuencia de sensibilización del 15% al 23%. Es una proteína de 26-29 kDa con acción enzimática, que se agrupa en dímeros y que participa en el metabolismo energético de la glucosa ⁶¹.

Se ha descrito como alérgeno de gamba ^{61,84}, cefalópodos ¹³³, cucarachas ¹³⁴ y frutas ¹³⁵, aunque no se ha estudiado en detalle la reactividad cruzada que puede existir entre las diferentes especies.

1.4.2.7. Hemocianina

Existen tres categorías de hemocianinas de crustáceos: alfa (α , 1 o A), beta (β , 2 o B) y gamma (γ , 3 o C) ⁹⁹. Se ha descrito como alérgeno en gambas ^{99,136-138}, cangrejos ¹³⁹ y cucarachas ¹⁴⁰.

Se trata de una metaloproteína termoestable de alto peso molecular, que se halla principalmente en la hemolinfa o en el hepatopáncreas, participando en el transporte de oxígeno ⁹⁹. Se sabe que la presencia de fracciones de oligosacáridos en las proteínas alergénicas, así como su patrón de glicosilación, pueden contribuir a su alergenicidad ¹⁴¹. Curiosamente, la hemocianina de gambas está glicosilada ⁹⁹ y esta modificación puede generar cambios en la reactividad IgE de esta glicoproteína ¹⁴².

1.4.2.8. Fructosa 1-6 bifosfato aldolasa

La fructosa 1-6 bifosfato aldolasa (FBPA) fue identificada como alérgeno por primera vez en cucarachas ¹³⁴ y se confirmó como alérgeno de gambas en 2014 ¹⁰³. Se trata de una enzima implicada en la glicolisis, tiene un peso molecular de 42 kDa y es sensible a los tratamientos con calor ^{61,103}.

1.4.2.9. Otros alérgenos

Otras proteínas identificadas en marisco que podrían establecerse como alérgenos son:

- Paramiosina, descrita como alérgeno en la oreja de mar ^{143,144}, en anisakis ¹⁴⁵ y en ácaros del polvo doméstico ¹⁴⁶
- Cadena pesada de la miosina ¹³⁶
- α y β Actina ^{67,101,103}
- Enzima catalizadora de la defosforilación del ATP (ATPasa) del retículo endoplásmico (SERCA) ¹⁰¹
- Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GDPH) ⁶¹
- Titina ⁶¹
- Ubiquitina, polipéptido de 76 aminoácidos, que comparte un alto grado de identidad entre humanos y levaduras (96%), y se postula que podría ser un panalérgeno ¹⁰³
- Enolasa ^{136,147}
- Piruvato quinasa ¹⁴⁸

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Alérgenos de crustáceos y mariscos con reactividad IgE demostrada (adaptado de Kamath et al ⁶¹).

<i>Proteína</i>	<i>Crustáceos</i>	<i>Moluscos</i>	<i>Función biológica</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>	<i>Observaciones</i>
Aldolasa A	x	-	Enzima en la glicólisis	~40	
Arginina quinasa	x	-	Metabolismo energético	38-45	Equivalente a la creatinin quinasa de los vertebrados
β-Enolasa	x	-	Enzima de la glicólisis	~50	
Hemocianina	x	-	Transporte de oxígeno	77	Metaloproteína
Cadena ligera de la miosina 1	x	-	Proteína estructural	17-23	Subunidad del complejo motor actina-miosina
Cadena ligera de la miosina 2	x	-	Proteína estructural	17-23	Subunidad del complejo motor actina-miosina
Proteína relacionada con el desarrollo ovárico	x	-	desconocida	28	Encontrada en huevas
Paramiosina	-	x	Proteína estructural	100	Estructura similar a la tropomiosina
Proteína sarcoplásmica de unión a calcio	x	-	Tampón de iones de calcio	20-24	Dimérica
Triosafosfato isomerasa	x	x	Enzima de la glicólisis	28	Dimérica
Tropomiosina	x	x	Proteína estructural	33-39	
Troponina C	x	-	Proteína estructural	~20	Subunidad del trímero troponina
Troponina I	x	-	Proteína estructural	~30	Subunidad del trímero troponina
Vitelogenina	x	-	Proteína de la yema	18	Encontrada en huevas

Tabla 2. Porcentaje de pacientes sensibilizados a diferentes proteínas.

<i>Proteína</i>	<i>Porcentaje de pacientes sensibilizados</i>
Aldolasa A	<i>sd</i>
Arginina quinasa	10-51% ^{83,99}
β-Enolasa	<i>sd</i>
Hemocianina	<i>sd</i>
Cadena ligera de la miosina	19-55% ^{84,93,121}
Proteína relacionada con el desarrollo ovárico	<i>sd</i>
Paramiosina	<i>sd</i>
Proteína sarcoplásmica de unión a calcio	29-50% ⁸³
Triosafofato isomerasa	15-23% ⁶¹
Tropomiosina	72-98% ⁸³⁻⁸⁵
Troponina C	12-33% ^{84,93,125}
Troponina I	<i>sd</i>
Vitelogenina	<i>sd</i>

sd: sin datos en la actualidad

1.4.3. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada es un fenómeno inmunológico en el que se produce reconocimiento y unión a anticuerpos IgE, e inducción de respuesta inmune frente a moléculas alergénicas similares u homólogas por estructura ⁷. Su definición se basa en el reconocimiento inmunológico: dos alérgenos tienen reactividad cruzada si hay un anticuerpo que reacciona con ambos ¹⁴⁹.

Las proteínas se organizan en varios niveles ⁷:

- estructura primaria constituida por las cadenas de aminoácidos.
- estructura secundaria o pliegues de proteína, en la que los aminoácidos de la secuencia interactúan en general mediante puentes de hidrógeno formando hélices alfa o láminas beta.
- estructura terciaria o dominio estructural, conformando una disposición plegada y completa en tres dimensiones mediada por puentes disulfuro.
- estructura cuaternaria o de superficie, con proteínas formadas por varias cadenas polipeptídicas.

INTRODUCCIÓN

Esta última es la más importante para la unión a anticuerpos, en especial los epítomos, que son la parte de la superficie del alérgeno que a nivel atómico interactúa con la fracción variable de los anticuerpos (fragmento Fab) ⁷.

En Genética, la homología de secuencias se refiere a que las secuencias de dos o más proteínas o ácidos nucleicos guardan similitud por presentar un mismo origen evolutivo, y éstas suelen tener una estructura tridimensional similar ^{150,151}. La similitud expresa el grado de coincidencia entre dos secuencias: cuando es elevada hablamos de analogía, y si existe una coincidencia total hablamos de identidad ^{150,151}.

Se debe considerar la posibilidad de reactividad cruzada entre proteínas cuando existe identidad en seis aminoácidos contiguos o cuando se observa más del 35% de identidad en la secuencia de aminoácidos ¹⁵¹. En general, la reactividad cruzada es excepcional por debajo del 50% de identidad, y en la mayoría de las ocasiones necesita más del 70% ⁷.

La aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de alérgenos ha permitido la caracterización de la estructura primaria de muchos de ellos. Algunos de esos alérgenos, que inicialmente se identificaron en especies concretas, están presentes con ligeras variaciones en especies de plantas o animales aparentemente no relacionadas. La reactividad cruzada entre diferentes alérgenos ocurre debido a la presencia de epítomos compartidos similares o incluso idénticos. De este modo, esos epítomos compartidos pueden ser el origen de la sensibilización y desarrollo de síntomas de alergia, desencadenados por alérgenos que se encuentran tanto en especies cercanas como en especies filogenéticamente alejadas. A estas proteínas se las denomina panalérgenos ⁵⁵.

1.4.3.1. Reactividad cruzada y tropomiosinas

La gran reactividad cruzada entre crustáceos se atribuye clásicamente a la secuencia de aminoácidos altamente conservada de las moléculas de tropomiosina ^{55,152}.

Se ha demostrado que la mayoría de pacientes alérgicos a gambas presentan IgE específicas frente a tropomiosina purificada ^{84,85}. Asimismo, numerosos estudios han investigado el papel de la tropomiosina de crustáceos en otros invertebrados ^{22,153}. Por ejemplo, se ha propuesto que la tropomiosina es un alérgeno a tener en cuenta en los pacientes alérgicos a pescado, ya sean o no alérgicos a marisco a la vez ^{154,155}. Entre los cefalópodos, la identidad de secuencia de las tropomiosinas es muy elevada, superior al 90%, y supone la base de su reactividad cruzada. Pero sólo comparte un 70-82% de identidad de secuencia con las tropomiosinas de otros moluscos, un 63-64% de identidad con las tropomiosinas de crustáceos y un 51-55% de identidad con las humanas ¹⁵⁶.

La exposición y sensibilización a la tropomiosina de gambas puede llevar a la sensibilización a ciertos alérgenos respiratorios ¹⁵⁷ y de igual manera, la sensibilización a la tropomiosina de ácaros puede inducir la sensibilización a alérgenos alimentarios ¹⁵⁸.

INTRODUCCIÓN

En un estudio realizado con pacientes judíos ortodoxos, quienes tienen absolutamente prohibido el consumo de marisco por las leyes de la dieta *Kosher*¹⁵⁹⁻¹⁶¹, se observó que la sensibilización a alérgenos inhalados como los ácaros, podía dar lugar a una sensibilización a la tropomiosina de gamba¹⁶².

La reactividad cruzada entre crustáceos y ácaros del polvo doméstico, así como con insectos, se ha estudiado en profundidad debido a su impacto clínico en los pacientes con sensibilización respiratoria, con el objetivo de resolver la duda de si estos pacientes con alergia respiratoria pueden presentar una reacción alérgica tras exponerse al alimento implicado^{87,147,163-168}.

Es importante diferenciar la sensibilización primaria a ácaros, con la subsiguiente alergia alimentaria a invertebrados comestibles, de la alergia a marisco en pacientes no alérgicos a ácaros del polvo doméstico, ya que la sensibilización a ácaros podría alterar los niveles de IgE específica a ácaros y a gamba, y con ello, quizá alterar el diagnóstico^{23,169}. Se ha descrito un perfil de sensibilización a marisco en el que la tropomiosina está involucrada como panalérgeno, y por ello los pacientes no toleran la mayoría de crustáceos y/o moluscos, siendo la sensibilización selectiva muy poco común^{55,170}. Otro patrón es el que se ha observado en los casos de alergia a ácaros del polvo doméstico, que actúan como agentes de sensibilización primaria, junto con alergia selectiva a algún tipo concreto de moluscos o crustáceos, y en estas situaciones el papel de la tropomiosina es un tema en discusión^{164,171-173}.

1.4.3.2. Reactividad cruzada y otras proteínas

Una parte de los pacientes alérgicos a crustáceos lo son únicamente a gamba o cangrejo. Parece que hay dos posibles explicaciones. Una opción es que estos pacientes tengan regiones de reconocimiento específicas únicamente para las tropomiosinas de gambas o cangrejo¹⁵². La otra posibilidad es la presencia de alérgenos específicos de gambas y de cangrejos. Cabe destacar que tanto las gambas como los cangrejos de río contienen cantidades considerables de proteínas sarcoplásmicas de unión a calcio, mientras que los cangrejos de mar tienen una cantidad muy baja o nula, por lo que puede haber personas con sensibilidad IgE a gambas y cangrejos de río pero no a cangrejo de mar¹²².

Se ha demostrado que las proteínas sarcoplásmicas de unión a calcio tienen una gran prevalencia de unión IgE en niños alérgicos a gambas, y junto a la tropomiosina, son un buen predictor de reactividad clínica a las gambas⁸³. Los niños alérgicos a gambas también muestran sensibilización a hemocianina y enolasa, aunque en menor proporción (33% y 11% respectivamente)¹⁴⁷. Sin embargo, se ha descrito que un 60% de los niños alérgicos a ácaros del polvo doméstico presentan sensibilización a hemocianina, y un

INTRODUCCIÓN

44% a enolasa, sin que se demuestre sensibilización a proteínas sarcoplásmicas de unión a calcio, hecho que confirma que se trata de un alérgeno específico de gamba y no parece tener un papel en la reactividad cruzada entre ácaros y gambas ¹⁴⁷.

La hemocianina se ha implicado en los procesos de reactividad cruzada entre marisco y ácaros ^{99,147} y entre marisco e insectos ¹⁰⁶. La reactividad cruzada mediada por IgE de los pacientes alérgicos a los ácaros del polvo con la hemocianina de las gambas se podría explicar mediante dos teorías: podría ser que los pacientes tuvieran IgE frente a la hemocianina de los ácaros del polvo doméstico, que reaccionaría con la hemocianina de las gambas ⁹⁹, o bien, que los pacientes tuvieran anticuerpos IgE con reactividad cruzada frente a determinantes carbohidratados, responsables de la reactividad cruzada con fracciones de oligosacáridos de la hemocianina de las gambas ¹⁴¹.

También se ha identificado la hemocianina en cucarachas (Per a 3 y Bla g 3) ¹⁴⁰ y se ha descrito que puede ser la responsable de la reactividad cruzada con cucarachas u otros aeroalérgenos de invertebrados, en los niños alérgicos a gambas a los que no se demuestra una sensibilización a tropomiosina ¹⁴⁷.

La enolasa se ha identificado como alérgeno en cucarachas ¹³⁴ y gambas ¹³⁶, y podría tener alguna implicación en la reactividad cruzada entre ambas ¹⁴⁷.

La arginina quinasa también tendría su papel en los fenómenos de reactividad cruzada ⁹⁶. Se ha implicado en la reactividad cruzada con polillas ¹⁰⁸, arañas ¹⁷⁴, y gusanos de seda ¹⁰⁷, y en la reactividad cruzada entre ácaros y gambas en climas húmedos ¹⁰³. Se ha sugerido que se trate de un panalérgeno ^{103,110}.

Parece que la alfa-actinina y la ubiquitina pueden ser parcialmente responsables de la reactividad cruzada entre ácaros y gambas, puesto que son reconocidas por más del 50% de pacientes alérgicos, procedentes de clima continental seco la primera, y de climas más húmedos la segunda ¹⁰³.

El conocimiento molecular de los alérgenos de marisco del que disponemos en la actualidad no es suficiente para realizar un buen diagnóstico y manejo de los pacientes, y quedan muchos interrogantes por resolver ¹⁷⁵. El manejo se dificulta aún más cuando tenemos pacientes alérgicos a tipos concretos de gambas, con tolerancia a otras, en los que desconocemos el alérgeno responsable ¹⁷⁶, y pacientes con alergia a crustáceos con patrones de sensibilización diferentes según toleren moluscos o no ¹⁷⁷.

Estudios muy recientes en los que se utiliza proteómica, herramientas computacionales (bioinformática) y técnicas de detección de anticuerpos, identifican múltiples proteínas nuevas que pueden actuar como alérgenos de marisco y que pueden participar en fenómenos de reactividad cruzada ¹⁷⁵.

1.4.4. Caracterización de los alérgenos de las diferentes poblaciones

En las últimas décadas, hemos sido testigos de la epidemia de alergia, con un notable aumento en la patología respiratoria y cutánea. Desde hace pocos años la prevalencia de la alergia a alimentos se ha incrementado en lo que se denomina la segunda ola de esta epidemia ¹⁷⁸. Como se ha descrito previamente, es bien conocido que existe una relación alérgica entre ácaros y gambas ^{22,153,156}.

El factor clave en la supervivencia y prevalencia de los ácaros es la humedad ambiental relativa ¹⁷⁹.

Se considera clima húmedo cuando la humedad relativa en el interior de las casas es superior al 50% durante más de 4 meses al año ¹⁸⁰.

Los ácaros están presentes en las casas de las zonas geográficas húmedas, mientras que en las zonas de clima seco continental no presentan las condiciones climatológicas favorables para el crecimiento de los ácaros, a menos que la humedad se aumente de manera artificial ¹⁷⁹.

En Madrid, con un clima seco continental, los niveles de ácaros son indetectables en el 83% de las casas ¹⁸¹, y este dato se refleja en la prevalencia de sensibilización a *D. pteronyssinus* entre los asmáticos, ya que allí sólo es de un 9%, pero incluso en algunas comunidades es aún más bajo, como en Castilla la Mancha, con un 6%, y un 0% en Aragón y Ceuta ¹⁸². En cambio, en otras comunidades la sensibilización tiene unos valores muy elevados, del 85% en Cataluña, sólo superada por las Islas Baleares con un 88% y por Asturias con un 100% ¹⁸².

En un estudio publicado en 2008 se determinó que la sensibilización a ácaros entre los pacientes alérgicos a marisco era del 90% en Madrid y del 100% en las Islas Canarias, por lo que era posible que la sensibilización a unos u otros alérgenos de ácaros fueran los responsables de la inducción de la alergia a crustáceos ¹²¹.

Los estudios de prevalencia de la sensibilización a tropomiosina realizados en pacientes alérgicos a ácaros del polvo, dan resultados muy dispares según la localización y plantean que otras proteínas participen en la reactividad cruzada: 10%-18% en Austria ^{183,184}, 9% en Francia ¹⁸³, 10% en Italia ¹⁸³, 18% en Suecia ¹⁸³, 4.3% en la región del sur de Bavaria

INTRODUCCIÓN

(alrededores de Munich) ¹⁸⁴, 31.6% en Singapore ¹⁸⁵, 25% en Perth (Australia) ¹⁸⁶, y 55% en Zimbabwe ¹⁸⁶.

En varios estudios italianos se sugiere que entre sus pacientes, la sensibilización a proteínas de alto peso molecular, como la hemocianina, parecen ser alérgenos importantes en la reactividad cruzada, más que la tropomiosina, la arginina quinasa y la proteína sarcoplásmica de unión a calcio ^{99,187}.

En España ¹⁰³ se describió que en Madrid, caracterizado por un clima continental seco, la α -actinina, la β -actina, la fructosa 1-6 bifosfato aldolasa, la tropomiosina y la SCBP parecían ser las proteínas alérgicas más importantes de la gamba, mientras que en Lugo, una zona de clima húmedo, lo era la ubiquitina. Al comparar el porcentaje de reconocimiento de las proteínas de extracto de ácaro, con peso molecular equivalente en las proteínas identificadas en la gamba, se observó que en el extracto de ácaro, las proteínas más relevantes eran la tropomiosina y la α -actinina en el clima continental seco, y la ubiquitina en la población de clima húmedo. Se realizaron ensayos de inhibición para confirmar que estas proteínas estuvieran implicadas en la reactividad cruzada entre gamba y ácaro. Mediante ensayos de inhibición cruzada se determinó que los ácaros serían el sensibilizante primario en el clima húmedo, mientras que las gambas lo serían en clima continental seco ¹⁰³.

Estos datos se corroboran con un estudio reciente realizado en la costa italiana, donde se describe que la alergia a la gamba está asociada y casi siempre es dependiente de la alergia a ácaros del polvo doméstico, en particular en los pacientes que presentan asma ¹⁸⁸.

Situar el origen geográfico de la población estudiada es crucial puesto que puede producir diferencias en el resultado de las determinaciones de alérgenos mayores ¹⁰³. Los pacientes que viven en lugares distintos con diferentes climas, y por tanto con diferente exposición a ácaros, pueden presentar diferencias en el perfil de sensibilización ¹⁰³.

1.4.5. Manifestaciones clínicas

Las reacciones adversas a los productos del mar se pueden clasificar en tres categorías en función del mecanismo subyacente implicado: las reacciones por toxicidad relacionadas con las biotoxinas marinas, la intolerancia alimentaria por liberación de aminas vasoactivas, y las reacciones inmunológicas, entre las que se incluyen las reacciones alérgicas y las enteropatías ²².

1.4.5.1. Reacciones por toxicidad relacionadas con las biotoxinas marinas

Una causa muy importante de reacciones adversas a los productos del mar son las numerosas toxinas que pueden estar presentes en el pescado y el marisco. Las biotoxinas marinas son muy estables y no se reduce su toxicidad tras la preparación del alimento ²². Destaca la ciguatoxina, porque puede provocar síntomas digestivos, neurológicos y cardiovasculares tan graves que las personas afectadas pueden precisar tratamiento de soporte durante semanas ^{189,190}. La saxitoxina es otra toxina importante, que produce el Envenenamiento Paralítico, en la que los afectados presentan síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea, y parestesias, incluso parálisis muscular ^{191,192}. El ácido okadaico también se incluye en el grupo de las biotoxinas marinas, que origina el Envenenamiento Diarreico, con síntomas predominantemente digestivos, y cuya exposición crónica puede dar lugar a tumores de tracto digestivo ^{193,194}.

1.4.5.2. Intolerancia alimentaria por liberación de aminas vasoactivas

Las aminas biológicas, como la histamina y la tiramina, están presentes de manera fisiológica en el organismo en cantidades muy pequeñas ¹⁹⁵. Se generan en elevadas cantidades durante el procesamiento de los productos del mar como resultado de contaminación microbiana e inadecuadas condiciones de almacenamiento y conservación, y la intoxicación se produce por la ingesta de estos alimentos ¹⁹⁵. Niveles bajos de aminas biógenas no suelen ocasionar problemas, puesto que la amino oxidasa humana es capaz de metabolizarla ¹⁹⁵. El consumo de niveles superiores a 50 mg de histamina puede producir una intoxicación en sujetos sanos, conocida como Escumbroidosis, que puede provocar hormigueo y quemazón peribucal u orofaríngea, exantema, urticaria, cefalea, mareo, picor, náuseas, vómitos, diarrea, palpitaciones y disnea, y que puede confundirse con una reacción alérgica ^{22,195}. La intoxicación por tiramina suele manifestarse con cefalea, náuseas, vómitos e incluso crisis hipertensiva ¹⁹⁵.

1.4.5.3. Reacciones alérgicas por ingesta

Las reacciones alérgicas a invertebrados comestibles pueden presentarse en un amplio rango desde leves, como el síndrome de alergia oral y la urticaria, a graves, como las anafilaxias ¹⁹⁶.

El síndrome de alergia oral está caracterizado por la presencia de síntomas localizados de edema y picor en labios, lengua y mucosa oral ¹⁹⁷. En la urticaria aparecen habones de tamaño variable, pruriginosos y evanescentes, que pueden acompañarse de angioedema por inflamación de mucosas o de capas profundas de la piel ¹⁹⁸. Se define la anafilaxia como una reacción de hipersensibilidad grave sistémica potencialmente mortal,

INTRODUCCIÓN

que se caracteriza por un debut rápido de síntomas, generalmente en los primeros 30 minutos desde la exposición al alérgeno. En la mayoría de los casos los pacientes presentan síntomas cutáneos, como prurito, urticaria y edema, asociados a problemas respiratorios, cardiovasculares y/o digestivos ¹⁹⁹.

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente descritas de la alergia a marisco son el prurito (90%), habones (61%), edema de labios y de lengua (52%), síntomas pulmonares (42%), gastrointestinales (35%) o shock anafiláctico (13%) ²⁰⁰. Algún estudio sugiere que los pacientes que presentan anafilaxia por gamba tienen mayor edad que los pacientes que presentan anafilaxia por otro alimento ²⁰¹.

Según *Alergológica 2015*, el 72.9% de pacientes españoles alérgicos a marisco presentan clínica cutánea, el 31.3% refieren síndrome de alergia oral, un 10.4% síntomas digestivos, el 12.5% han sufrido anafilaxia y en 6.3% desarrollan síntomas respiratorios ³⁹.

Se han descrito casos de anafilaxia por transferencia de antígeno a través de la saliva por un beso ²⁰².

1.4.5.4. Reacciones alérgicas por inhalación

La patología respiratoria derivada de la exposición por vía inhalada puede ser un problema entre los trabajadores de la industria del procesado del marisco. Se han descrito prevalencias dispares, desde el 4% hasta el 45% ^{203,204}. Se postula que se trata de una patología infradiagnosticada, ya sea por falta de conocimiento de los trabajadores o de los médicos, o bien por la dificultad en hallar trabajos alternativos ²⁰³.

Los trabajadores de las plantas de procesado de marisco están expuestos a altos niveles de posibles sensibilizadores como la tropomiosina, la tripsina y endotoxinas ²⁰⁵. En general no se trata de un solo agente, y la exposición simultánea podría afectar a la salud del trabajador ²⁰⁵. Están expuestos a niveles elevados de alérgenos inhalados en todas las zonas de procesado del alimento, en especial en el despiece y en el cocinado ^{205,206}.

Se ha demostrado la presencia de varias proteínas de gamba (tropomiosina y arginina quinasa) como aeroalérgenos de la atmósfera de las plantas de procesado de marisco ^{125,206,207}. También se ha postulado que algunas proteínas de marisco (como la cadena ligera de la miosina) se pueden aerosolizar durante el cocinado contribuyendo a los síntomas respiratorios, y aunque no se ha demostrado su implicación en la patología ocupacional, sí se ha relacionado con asma en niños ¹²¹.

Los síntomas descritos son sibilantes, tos, esputo mucoso, disnea, estornudos, obstrucción nasal, picor de ojos y de manos, dolor torácico ^{23,208-213}.

También se han descrito casos de urticaria de contacto y asma ocupacional en trabajadores de restaurantes de marisco ²¹⁴, y de rinitis y asma ocupacional en trabajadores de acuarios por exposición a la comida para peces ²¹⁵.

1.4.5.5. Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas

El síndrome de enterocolitis inducida por proteínas de alimentos se considera una alergia alimentaria no mediada por IgE, que se caracteriza por la aparición de vómitos repetidos que se inician tras 1-4 horas después de la ingesta, y a menudo se acompañan de otros síntomas como letargia, palidez, flojedad y diarrea. Puede originar deshidratación, hipotensión e incluso shock hipovolémico. La forma crónica se caracteriza por vómitos, diarrea, escasa ganancia ponderal y falta de medro ²¹⁶.

No se conoce bien su fisiopatología, pero se cree que se produce una reacción inmunológica frente a proteínas de los alimentos que origina una inflamación intestinal, con aumento de la permeabilidad e intercambio de fluidos ²¹⁶. En la anatomía patológica de las biopsias de íleon y colon se encuentran signos de inflamación inespecífica ²¹⁶. Se ha observado un aumento de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ²¹⁷, de triptasa y de interleucinas IL-8 e IL-9 ²¹⁸ en el suero de niños afectados.

El diagnóstico se realiza en base a una historia clínica compatible y a la mejoría del paciente tras la retirada del alimento sospechoso ²¹⁹. La determinación de IgE específica se propone en las visitas sucesivas, ya que entre el 2 y el 20% de los pacientes presentan pruebas positivas de manera eventual al alimento o alimentos culpables, y además el 20-40% de ellos presentan a la vez reacciones mediadas por IgE a otros alimentos ²¹⁹.

Las causas más frecuentes son la leche de vaca y la soja, pero los alimentos sólidos también pueden inducirlo ^{220,221}.

En niños, el marisco es responsable de aproximadamente el 13% de las enterocolitis por proteínas ²²². En las series recogidas en adultos con enterocolitis por proteínas se observa que en más de la mitad de ocasiones (55% - 65%) están implicados moluscos o crustáceos, o ambos a la vez ^{223,224}.

1.4.6. Factores que pueden modificar la respuesta clínica en la alergia a alimentos

Existen factores asociados que pueden explicar porqué en el mismo paciente, a veces un alérgeno puede ser tolerado o desencadenar reacciones leves, mientras que en otro momento induce una reacción anafiláctica grave. Cuando estos factores están presentes, las reacciones pueden ser más graves y/o la cantidad de alérgeno necesaria para provocar la reacción puede ser menor ^{199,225}.

INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto una nueva terminología para diferenciar los factores de riesgo para las reacciones anafilácticas, y se han propuesto tres categorías ²²⁶:

- factores potenciadores, con influencia sobre el sistema inmunológico, como el ejercicio físico, las infecciones agudas, la toma de medicamentos (antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la bomba de protones), la ingesta de alcohol, o la menstruación.

- enfermedades concomitantes, como pueden ser el asma, los síndromes de activación mastocitaria y la enfermedad cardiovascular, que están asociadas a reacciones más graves y/o al aumento de mortalidad por la reacción.

- cofactores, sin influencia sobre el sistema inmunológico, como son los factores psicológicos (por ejemplo el estrés emocional).

Aún así, la falta de conocimiento sobre los mecanismos subyacentes limita el uso de una clasificación estricta, y en general se utilizan los términos cofactor o factor potenciador indistintamente ²²⁵.

En el estudio de alergia a marisco se debe tener en cuenta la posible participación de cofactores ¹⁸⁸. Se han publicado casos de anafilaxia dependiente de ejercicio ^{227,228} y casos en los que la anafilaxia parece ser el resultado de un efecto sinérgico a la toma de antiinflamatorios no esteroideos ^{229,230}.

Se ha descrito que estos cofactores están presentes en hasta el 39% de las anafilaxias ²³¹. Por lo tanto, deberíamos dudar antes de considerar que una nueva ingesta del alimento (ya sea accidental del paciente o tras una prueba de provocación controlada) es un diagnóstico definitivo de no alergia, a menos que tengamos en cuenta todos los factores que pueden modificar la alergenicidad del alimento y todas las circunstancias que pueden desencadenar una reacción por alimentos que habitualmente se toleran ²³².

Hay preguntas que permanecen en el aire, con el problema añadido que supone no tener recomendaciones que ofrezcan seguridad a los pacientes ²²⁹. Actualmente, no tenemos una respuesta definitiva a si es seguro comer un alimento que se ha implicado en una reacción, en un paciente que presenta IgE específicas, pero que además afirma que en ocasiones lo ha tolerado entre los diferentes episodios ²²⁹.

1.4.7. Controversia sobre el posible efecto de la inmunoterapia frente a ácaros en la alergia a marisco

La inmunoterapia con extractos de ácaros del polvo doméstico es un método eficaz para el tratamiento de la alergia respiratoria y la mayoría de los extractos para su administración contienen altas concentraciones de alérgenos de los grupos 1 y 2, aunque

pueden contener pequeñas cantidades de otras moléculas sensibilizantes, incluyendo al grupo 10. Este es el motivo por el que está abierto el debate de si la inmunoterapia puede inducir una sensibilización clínica relevante a la tropomiosina ^{233,234}.

Se ha descrito la inducción de alergia a gambas en pacientes que estaban en tratamiento con inmunoterapia a ácaros del polvo doméstico, principalmente en base a un estudio en el que uno de 17 pacientes con ITE a ácaros desarrolló IgE a tropomiosinas y agravamiento de sus síntomas previos de alergia oral con gambas ²³⁵.

Pero por otro lado se han publicado artículos en los que no se demuestra una nueva sensibilización a tropomiosina durante la inmunoterapia con ácaros ^{234,236} e incluso se ha descrito una mejoría en la tolerancia a las gambas tras seguir un tratamiento de inmunoterapia a ácaros con elevada cantidad de tropomiosina, en un paciente que previamente presentaba anafilaxia al comerlas ²³⁷.

Los últimos trabajos publicados hacen hincapié en que la inmunoterapia frente a ácaros del polvo doméstico no induce una sensibilización a tropomiosina que sea clínicamente relevante, y que en todo caso, lo más probable es que se pueda mejorar los síntomas de la alergia alimentaria ²³³. También se ha sugerido que el efecto de la inmunoterapia en la inducción de alergia o tolerancia puede depender del nivel de tropomiosina que contengan los extractos para la inmunoterapia ¹⁷⁸. Se postula que los niveles de IgE específica frente a Der p 10 y Pen a 1 pueden ser marcadores útiles para monitorizar a estos pacientes ²³³.

1.4.8. El efecto del calor y el cocinado en los alimentos como alérgenos

Cada alimento está compuesto por una mezcla de proteínas alergénicas que difieren en sus características físico-químicas, en la estabilidad al calor y la digestión, y en el potencial para inducir sensibilización IgE y reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE ⁹.

El cocinado puede alterar la estructura de los alérgenos debido a que provoca desnaturalización de las proteínas, agregación proteica y modificaciones químicas ⁹, lo que puede producir el enmascaramiento o desenmascaramiento de epítomos alergénicos ²³⁸. Como consecuencia, puede reducirse o aumentarse el reconocimiento alergénico, potencialmente alterando la alergenicidad del alimento implicado ²³⁸.

Por un lado, el tratamiento de los alimentos puede disminuir la alergenicidad de las proteínas de muchas maneras, por ejemplo, por la destrucción de epítomos conformacionales (con efecto limitado en los epítomos secuenciales), y por las reacciones químicas entre las proteínas, las grasas y los azúcares de los alimentos, dando lugar a una baja disponibilidad de las proteínas para el sistema inmune ^{9,239}.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, el procesado de los alimentos también podría aumentar la alergenicidad de las proteínas, bien por la formación de neoepítomos, o bien por el descenso de la digestibilidad proteica en el estómago y la conservación de epítomos alergénicos que interaccionarían con el sistema inmune en el intestino^{7,9,82,112}. El aumento de la reactividad IgE de los extractos cocinados puede explicarse por el cocinado en presencia de azúcares exógenos o endógenos, que lleva a la formación de productos con glicosilaciones complejas debido a la reacción de *Maillard*²⁴⁰. Los alérgenos glicosilados tienen uniones a IgE más potentes^{241,242}.

1.4.8.1. El efecto del calor y el cocinado en la alergia a gamba

La gran mayoría de publicaciones hacen hincapié en que se produce un marcado aumento de la reactividad IgE tras el cocinado de crustáceos^{61,92,240,243}, y se ha descrito que los extractos cocinados presentan uniones IgE más fuertes que los extractos crudos^{92,243}. Se han detectado alérgenos de las gambas en el agua de cocción de las mismas²⁴⁴.

En los análisis de reactividad IgE se observa una gran disparidad de resultados en el extracto crudo, en diferentes publicaciones se ha postulado que entre el 30%⁶¹ y el 90%¹¹² de pacientes reconocen la tropomiosina del extracto crudo, mientras que en general todos llegan a la conclusión de que la gran mayoría reconocen la del extracto cocinado^{61,112}.

No obstante, algunos trabajos han sugerido que los extractos de gamba cocida presentan menores uniones IgE que los extractos de gamba cruda²⁴⁵ y otros prueban que los crustáceos son alergénicos tanto crudos como cocinados, lo que es de gran importancia porque se consumen de ambas maneras^{238,246,247}. En estos trabajos se demuestra que la mayoría de pacientes (90%) tienen uniones IgE a tropomiosina tanto en extracto crudo como cocinado, demostrando su resistencia al calor¹¹².

En los análisis SDS-PAGE de los extractos crudos se detectan bandas de proteínas que se corresponden a arginina quinasa, tropomiosina, cadena ligera de la miosina, proteína sarcoplásmica de unión a calcio y troponina C²⁴³. Sin embargo, los extractos cocinados muestran diferencias importantes, con una pérdida de proteínas de alto peso molecular (se ha demostrado la pérdida de hemocianina y arginina quinasa), un aumento de bandas de bajo peso molecular y agregados de proteínas^{61,92,243,248}. La aparición de estos nuevos fragmentos proteicos, sumados a los alérgenos nativos, pueden producir un efecto inductor de la reactividad IgE de los pacientes^{61,82,248}.

En la mayoría de trabajos se demuestra que la banda de la tropomiosina suele persistir tras el cocinado²⁴³, pero algunos autores defienden que el calor puede producir un profundo efecto en el reconocimiento de la tropomiosina, lo que podría tener implicaciones

en su detección y cuantificación en los alimentos procesados ⁶⁰. En estudios basados en la purificación de tropomiosinas se propone que la alta temperatura por sí sola no altera demasiado la reactividad IgE de esta proteína, a menos que esté en presencia de otras proteínas o de azúcares ⁹. Ante la diversidad de resultados, es obvio que se precisan más estudios para caracterizar las múltiples variantes de tropomiosina que se forman con el calor y con los diferentes procesos de cocinado ⁶⁰.

El estudio del impacto del calor en otras proteínas, como la cadena ligera de la miosina, de momento ha obtenido resultados heterogéneos ^{61,121}. Como se ha comentado previamente, en diferentes publicaciones se ha demostrado unión a IgE sólo en extracto cocinado ⁶¹ o bien en ambos ²⁴⁶, o incluso de mayor intensidad en el extracto proteico crudo ¹²¹. Se ha postulado que estos resultados dispares se deban a la existencia de varias isoformas de proteínas en distintas subespecies de gambas o a factores relacionados con los pacientes, como el grupo etario ⁶¹.

1.4.9. Diagnóstico

1.4.9.1. Las cuatro dimensiones del diagnóstico de alergia ²⁴⁹

La primera dimensión es la sensibilidad diagnóstica, la habilidad para identificar más del 95% de pacientes con alergia a una fuente alérgica en concreto. En este punto, la presencia de reactividad cruzada entre las diferentes especies de gamba permite un diagnóstico más sencillo, porque no es necesario testarlas todas. Por otro lado, el hecho de que exista un porcentaje de pacientes alérgicos a gamba sin sensibilización a tropomiosina implica que vale la pena buscar otros alérgenos para obtener una mayor sensibilidad diagnóstica.

La segunda dimensión es la habilidad para distinguir los sujetos que desarrollan sintomatología alérgica de entre todos sujetos sensibilizados, diferenciándolos de aquellos que no presentan reactividad clínica. Este punto plantea la duda de si todos los pacientes con pruebas positivas a gamba deben evitar su ingesta.

La tercera dimensión es la habilidad para distinguir entre las fuentes alérgicas que pueden o no inducir síntomas. En el caso de la alergia a marisco, siempre se ha asumido que se debe evitar el consumo de todas las especies de invertebrados.

La cuarta dimensión es la habilidad para distinguir entre las diferentes rutas de exposición a un alérgeno, generalmente la vía oral y la vía respiratoria, tanto para la sensibilización como para la inducción de síntomas. La reactividad cruzada entre ácaros y gambas se ha atribuido a la tropomiosina. No se sabe con certeza si la tropomiosina de ácaros (Der p

10) es relevante en la alergia respiratoria a ácaros, pero *a priori* es un alérgeno demasiado grande para ser aerotransportado ²⁴⁹.

1.4.9.2. Historia clínica

El diagnóstico de la alergia alimentaria requiere una historia clínica detallada, que incluya datos sobre todos los alimentos sospechosos, la forma de preparación, el tiempo que tardan los síntomas en aparecer tras la ingesta, la duración y gravedad de la clínica y el tratamiento precisado para la remisión ¹³. También es importante añadir si los síntomas reaparecen con la reexposición al alimento, e interrogar sobre la presencia de cofactores que potencien la reacción, como el ejercicio, el alcohol o los antiinflamatorios no esteroideos ¹³.

1.4.9.3. Detección de IgE específica

1.4.9.3.1. Pruebas cutáneas

Se ha descrito que los pacientes con alergia a gambas presentan el menor ratio de pruebas cutáneas intraepidérmicas positivas con respecto a pacientes alérgicos a otros alimentos ²⁵⁰. La sensibilidad de los extractos comerciales que disponemos en la actualidad es baja y su contenido en alérgenos altamente variable y heterogéneo ²⁵¹. Se ha demostrado que algunos extractos incluso carecen de alérgenos mayores de gamba ²⁵¹. Tampoco está claro si el extracto debe obtenerse del alimento crudo o cocinado ^{61,121,246}. Además, frecuentemente dentro de un mismo grupo alimentario las pruebas cutáneas tienen una alta tasa de positividad, probablemente debido a los fenómenos de reactividad cruzada ²⁵². Para aumentar la precisión del diagnóstico se ha propuesto incluir las pruebas cutáneas intraepidérmicas con el alimento en fresco y de la manera que indujo la reacción, crudo o cocinado ^{82,243,253}.

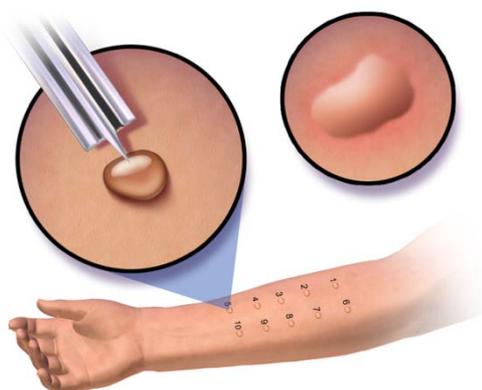


Figura 8. Pruebas cutáneas intraepidérmicas ²⁵⁴

1.4.9.3.2. Estudio *in vitro*

Desde hace muchos años se ha intentado mejorar el diagnóstico *in vitro* para la alergia a gambas, puesto que ya en la década de los años ochenta se comprobó que la intensidad de los síntomas clínicos tras la ingesta correlacionaba mejor con la determinación de IgE específicas que con las pruebas intraepidérmicas ⁴³.

Se han determinado niveles de IgE umbrales a partir de los cuales la probabilidad de reacción clínica es muy elevada, para alérgicos a cacahuete, pescado, leche, huevo, avellana y apio nabo ²⁵⁵⁻²⁵⁸. Se han intentado buscar estos valores umbrales en los pacientes alérgicos a gambas, pero los valores de IgE específica a gamba en pacientes tolerantes y reactivos no muestran diferencias, incluso a veces son menores en los alérgicos ²⁵⁸.

Parece que el mapeo de epítomos tiene potencial para convertirse en una herramienta adicional para el diagnóstico de la alergia a alimentos ⁸. Los pacientes con provocaciones positivas a gamba en general presentan un mayor y más intenso reconocimiento de epítomos a diferentes alérgenos de gamba y podrían utilizarse como biomarcadores predictivos de reactividad clínica en pacientes sensibilizados a gamba ⁸⁹.

Para el diagnóstico de la alergia a gamba se dispone de la determinación de IgE específica a gamba por enzimoimmunoensayo mediante UNICAP™ de *Thermo Fischer Scientific* ^{®259}.

La introducción de las técnicas de diagnóstico molecular ha abierto un nuevo campo en el estudio de alergia, con la esperanza de aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas ²⁶⁰.

En un trabajo publicado en 2011 se objetivó que la sensibilidad del diagnóstico *in vitro* realizado con un panel de alérgenos era comparable a la del extracto completo de gamba (97%) ⁸⁴. En el 75% de pacientes la sensibilidad de las dos técnicas combinadas era similar, o incluso mayor con los alérgenos aislados, que con el extracto natural de gamba ⁸⁴.

Posteriormente se ha sugerido que la determinación de la tropomiosina predice mejor la reactividad clínica que las pruebas cutáneas intraepidérmicas y la IgE específica al extracto completo de gamba ^{85,94}, pero la determinación de tropomiosina no puede ser el único ensayo diagnóstico utilizado, porque pueden estar implicados otros alérgenos de la gamba ¹⁰³.

Se ha descrito que la sensibilización conjunta a tropomiosina y proteína sarcoplásmica de calcio está asociada a una respuesta clínica positiva a la gamba ⁹³.

Es posible que los pacientes sensibilizados a gamba que no reaccionen a tropomiosina presenten reactividad mediada por IgE a otros alérgenos de gamba, como la cadena ligera

INTRODUCCIÓN

de la miosina, la arginina quinasa, la proteína sarcoplásmica de unión a calcio, o a otras proteínas ¹⁰³. La inclusión de otros alérgenos de gamba para la detección de IgE puede aumentar la especificidad del diagnóstico en la sensibilización a gamba, especialmente en los pacientes con tropomiosina negativa ^{103,147}.

Como se ha comentado previamente, el perfil de sensibilización de las poblaciones estudiadas puede ser diferente según sea el clima y la exposición a ácaros a la que se vea sometida ¹⁰³.

Parece que en la costa mediterránea de Italia los factores que se asocian a alergia a gamba son la presencia de elevada IgE frente a ácaros del polvo doméstico junto con IgE positiva frente a Der p 1, Der p 2, Der p 10, Pen a 1, arginina quinasa y gamba ¹⁸⁸.

En Galicia, una zona con una elevada presión ambiental a ácaros del polvo doméstico ²⁶¹, la tropomiosina parece ser un marcador de gravedad en la alergia a gamba, ya que la determinación de IgE específica a Pen a 1 es mayor en los pacientes con reacciones graves que en los pacientes con reacciones leves o con síndrome de alergia oral ¹⁶⁴.

Se ha descrito que los pacientes alérgicos a gamba sin sensibilización a ácaros del polvo se pueden diagnosticar, con un 100% de sensibilidad, si presentan determinaciones de IgE específica a gamba superiores a 3.55 (KUA/L), y con un 100% de especificidad, si la IgE específica a Der p 10 es superior a 3.98 (KUA/L) ¹⁶⁹. En estos pacientes parece que la determinación de IgE específica a Pen a 1 tiene una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85.7% para diagnosticar a los pacientes alérgicos a gamba ¹⁶⁹.

En el diagnóstico por componentes se caracteriza el perfil de reactividad de cada paciente mediante alérgenos puros, obtenidos por purificación desde su fuente natural (designados por el prefijo "n") o bien por tecnología de ADN recombinante (designados por el prefijo "r") ²⁶².

En la actualidad, para el diagnóstico molecular de la alergia a gamba se dispone comercialmente de la determinación de tropomiosina (rPen a 1) mediante UNICAP™ y la determinación de tropomiosina (nPen m1), arginina quinasa (nPen m 2) y proteína sarcoplásmica de unión a calcio (nPen m 4) mediante ISAC™, ambas de *Thermo Fischer Scientific*®²⁵⁹.

El conocimiento de todos los alérgenos implicados en las reacciones será beneficioso para realizar estudios longitudinales que evalúen su potencial reactividad cruzada con otros alérgenos ¹⁴⁷. Además, el uso de alérgenos recombinantes será útil para identificar correctamente las proteínas alergénicas y sus epítomos, para describir adecuadamente el perfil alérgico frente al que un paciente concreto está sensibilizado, y en un futuro permitirá el diseño de inmunoterapia a la carta ¹²¹.

En estudios de investigación se han identificado varios epítomos de tropomiosina, MLC, AK y SCBP, y se ha postulado que puedan usarse en el futuro como herramienta diagnóstica ^{83,89,93}.

1.4.9.3.3. Diagnóstico genético

Se han publicado varios estudios que identifican regiones de HLA que podrían estar asociadas a alergia a gambas, pero no coinciden entre ellos ^{91,263}. Los autores atribuyen las diferencias a que la genética implicada en la alergia a alimentos es más complicada que la mera presencia de un alelo HLA concreto que tenga capacidad para unirse a un epítomo determinado, y además parece que la modulación de la expresión de los genes relacionados con el HLA podría tener también un papel en la etiología de ciertas alergias alimentarias ²⁶³.

1.4.9.3.4. Pruebas de provocación oral

Se ha establecido que para realizar un diagnóstico definitivo se deben realizar provocaciones orales, asumiendo la inversión de tiempo y el riesgo de reacciones ²⁵². Durante el proceso, se administran dosis progresivamente ascendentes de alimentos a intervalos de tiempo concreto, generalmente cada 15-30 minutos, aunque se debe ajustar a la historia clínica del paciente ¹⁵. Las provocaciones se pueden realizar de manera abierta, con el alimento visible, o enmascaradas, con el alimento oculto, ya sea sólo para el paciente (simple ciego), o para el paciente y el médico (doble ciego) ¹⁵. Se han publicado dos métodos de enmascaramiento de gamba para estudios de investigación: con helado de vainilla y saborizante de uva ²⁶⁴, y con helado de chocolate y vainilla, polvo de cacao y extracto de vainilla ⁸⁹.

Datos derivados de *EuroPrevall* ²⁶⁵ confirman que la dosis de proteína umbral que provoca reacciones en el 10% de la población (ED₁₀) es cien veces mayor para gamba que para otros alimentos, por lo que parece que, con respecto a otros grupos alimentarios, los pacientes alérgicos a gamba precisan cantidades mucho mayores de alérgeno para obtener respuestas positivas en las provocaciones, ²⁵⁸. Este dato indica que quizá las trazas que se puedan encontrar en productos manufacturados pueden suponer menor peligro para el paciente que el equivalente para otros alimentos como el cacahuete, la avellana, el apio nabo o el pescado ²⁵⁸.

Ahora bien, como se ha tratado con anterioridad, en casi el 40% de las anafilaxias están implicados los cofactores ²³¹. Asumir que un paciente tolera definitivamente un alimento al que está sensibilizado tras una provocación controlada puede ser equívoco si no se consideran todos los elementos que pueden influir en la alergenicidad del alimento, así como en las circunstancias que pueden actuar como factores potenciadores de la reacción ²³².

1.4.10. Tratamiento

1.4.10.1. Recomendaciones actuales

Como se ha explicado al inicio del texto, la evitación del alimento es el primer paso en el manejo de la alergia alimentaria ¹⁵. En la actualidad, la mayoría de pacientes alérgicos a gamba reciben la recomendación de evitar todos los crustáceos ²⁶⁶, e incluso a veces se recomienda evitar todo el marisco ²⁶⁷. Es preciso mejorar el diagnóstico de nuestros pacientes para que en el futuro las restricciones alimentarias se dirijan a eliminar los alérgenos culpables, y se puedan personalizar a cada patrón específico de alergia individual y según las necesidades de la persona afectada ¹⁵.

1.4.10.2. Futuras terapias

1.4.10.2.1. Producción de gambas hipoalérgicas

Los alimentos hipoalérgicos son aquellos en los que su capacidad alérgica se ha reducido por la alteración de la estructura de los epítomos responsables, reduciendo el riesgo de reacción cuando son consumidos por pacientes alérgicos ²⁶⁶. Aunque se trata de trabajos que necesitan confirmación, parece que los tratamientos con radiaciones ionizantes ²⁶⁸, la catálisis de reacciones oxidativas mediante tirosinasa ²⁶⁹, los ultrasonidos de alta intensidad ²⁷⁰ y la hidrólisis por proteasas ²⁷¹ reducen la alergenicidad de los extractos de gamba.

1.4.10.2.2. Inmunoterapia

En la bibliografía encontramos numerosos trabajos con protocolos de inmunoterapia en diferentes alimentos, básicamente huevo, leche, cacahuete y trigo ^{272,273}, pero no hay ninguno realizado con pacientes alérgicos a marisco. Se han publicado estudios realizados en ratones con inmunoterapia con péptidos epitópicos ^{90,274,275} e inmunoterapia con tropomiosinas hipoalérgicas ^{276,277} con resultados prometedores. Se trata de un

INTRODUCCIÓN

campo interesante, ya que se ha demostrado que en pacientes alérgicos a otros alimentos, su calidad de vida aumenta cuando alcanzan la fase de mantenimiento de la inmunoterapia, con un incremento adicional tras 6 meses de tratamiento ²⁷⁸.

1.4.10.2.3. Otras terapias

- Probióticos:

Durante las últimas dos décadas se ha estudiado intensamente el rol de los probióticos como moduladores de la respuesta inmune, incluyendo la respuesta alérgica ^{279,280}. Se ha descrito que en algunos modelos murinos de alergia a gamba, concretamente en ratones sensibilizados a tropomiosina, los tratamientos orales con probióticos son capaces de inducir una respuesta T reguladora, asociando una disminución de la producción de citoquinas TH2 y suprimiendo la respuesta inflamatoria intestinal, con la consecuencia de que los ratones están protegidos frente a las reacciones anafilácticas ²⁸¹⁻²⁸⁴.

- Hierbas chinas:

Se ha especulado con la posibilidad de que el uso de preparados de hierbas chinas pueda mejorar la tolerancia a los alérgenos alimentarios, pero su eficacia no ha sido demostrada ²⁸⁵.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

La sensibilización alérgica a ácaros del polvo doméstico puede relacionarse con el desarrollo de alergia alimentaria a gamba

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo principal

Evaluar la presencia de reactividad cruzada entre ácaros y gamba en nuestra población

2.2.2. Objetivos secundarios

Definir las características clínicas y analíticas de la población sensibilizada a gamba

Detallar las características de los pacientes alérgicos y no alérgicos a gamba de nuestra población.

Establecer la utilidad de diferentes extractos de gambas en el estudio de los pacientes con alergia a gamba.

Evaluar la relación entre los niveles de IgE específica a gamba y las manifestaciones clínicas en los pacientes con alergia a gamba

3. Material y Métodos

3.1. Diseño del estudio

Estudio observacional descriptivo realizado en la Sección de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona.

3.2. Sujetos del estudio

Los sujetos del estudio fueron todos los pacientes atendidos de manera consecutiva en la Sección de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona que tuvieran una prueba cutánea intraepidérmica positiva al extracto de gamba utilizado habitualmente en la batería de alérgenos alimentarios.

3.2.1. Criterios de inclusión

Se invitó a participar en el estudio a pacientes mayores de edad que, en el marco de un estudio alergológico por cualquier causa, presentaran pruebas cutáneas positivas a gamba realizadas mediante extracto comercial para prueba cutánea intraepidérmica (Extracto de gamba *Parapenaeus spp.* 1.5 mg/ml, Laboratorios Leti, Madrid, España), y cuyo lugar de residencia habitual hubiera sido siempre el área metropolitana de Barcelona.

3.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron a los pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión o que se negaron a participar en el estudio.

3.3. Variables clínicas y demográficas

Los datos de los participantes se recogieron mediante entrevista clínica, incluyendo la edad, el género y el lugar de residencia.

Se consideró paciente alérgico a gamba a todos aquellos que presentaban historia clínica inequívoca de reacciones tras la ingesta de gamba y una prueba cutánea intraepidérmica positiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

En base a la clínica presentada se definieron los siguientes grupos:

- Anafilaxia (AF): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de anafilaxia o shock anafiláctico ^{199,286}, con necesidad de tratamiento con adrenalina en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.
- Síntomas respiratorios (RES): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de broncoespasmo de inicio súbito en los 30 primeros minutos tras la ingesta de gamba con necesidad de tratamiento por vía inhalada o por vía parenteral en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.
- Síntomas cutáneos (CUT): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de prurito, urticaria y/o angioedema de inicio súbito en los 30 primeros minutos tras la ingesta de gamba en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.
- Síntomas digestivos (DIG): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de dolor abdominal, diarrea, náuseas y/o vómitos de inicio súbito en los 30 primeros minutos tras la ingesta de gamba en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.
- Síndrome de alergia oral (SAO): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de picor orofaríngeo y/o edema labial o lingual de inicio súbito en los 30 primeros minutos tras la ingesta de gamba en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.
- Síntomas respiratorios por inhalación de vapor de cocción (INH): pacientes que hubieran presentado al menos un episodio de broncoespasmo de inicio súbito en los 30 primeros minutos tras la exposición a vapores de cocción de gamba con necesidad de tratamiento por vía inhalada o por vía parenteral en los últimos 6 meses, o más de un episodio durante el año anterior a la inclusión.

Los pacientes que hubieran tenido diferentes episodios con diversidad de manifestaciones clínicas se agruparon en las categorías anteriores, en base a los síntomas de mayor gravedad, siendo el proceso más grave la anafilaxia, seguida por los síntomas respiratorios, cutáneos, digestivos y por último, el síndrome de alergia oral, quedando aparte los síntomas por inhalación de vapores.

Se consideró *paciente tolerante a gamba* a aquellos con un resultado de prueba cutánea intraepidérmica positiva a gamba pero que referían ingesta habitual de alimento, con una frecuencia igual o superior a 2 veces en el último mes sin asociar síntomas.

Se consideró *paciente alérgico a ácaros del polvo doméstico* a aquellos que referían síntomas inequívocos de alergia respiratoria por exposición a polvo doméstico y presentaba pruebas cutáneas positivas a los ácaros del polvo.

Se consideró la presencia de cofactor cuando en la entrevista clínica el paciente refería haber asociado algún cofactor conocido en la reacción, como la realización de ejercicio, la ingesta de alcohol o la toma de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Se consideró cofactor negativo cuando el paciente negaba la asociación, no lo recordaba, o no lo podía identificar claramente.

El número de episodios se definió en tres grupos: 1 episodio, varios episodios (si el paciente había presentado de 2 a 5) y múltiples episodios (si el número de episodios era superior a 5).

La edad de debut de los síntomas se clasificó en tres grupos: infancia (si el primer episodio había ocurrido antes de los 11 años), adolescencia (si la clínica se inició entre los 12 y los 17 años), y adultos (con un debut a los 18 años o más).

3.4. Obtención de extractos alérgicos

Se prepararon 8 extractos alérgicos a partir de cuatro especies de gamba diferentes, tanto en crudo como cocidas. Las especies de gambas utilizadas fueron: *Parapenaeopsis stylifera*, *Penaeus vannamei*, *Solenocera melantho*, y mezcla de 4 especies (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*). Para cada extracción se utilizaron 25 gramos (g) de producto, comprado en un mercado local. La preparación de los extractos cocidos se realizó mediante cocción de cada grupo por separado en agua hirviendo durante 10 minutos.

Se prepararon 3 extractos alérgicos a partir de 3 especies de ácaros diferentes: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*. Para cada extracción se utilizaron 25 g de producto de cultivo propio de ácaros (*Laboratorio Inmunotek*, Madrid).

La extracción de todos los alérgenos se realizó mediante triturado, homogeneización y posterior incubación en agitación continua, con tampón fosfato salino (PBS) 0.01 molar (M) pH 7.2, a una relación peso/volumen (p/v) 1/20, a 4 grados centígrados (°C) durante 18 horas. Tras la incubación, se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, desechando el precipitado. Este sobrenadante se clarificó mediante filtración por vacío a través de filtros de membrana de acetato de

celulosa de tamaño de poro decreciente: 1 micrómetro (μm), 0.7 μm , 0.45 μm y 0.2 μm (Sartorius Stedim Biotech S.A.).

Una vez filtrados se procedió a su concentración y posterior diálisis mediante ultrafiltración tangencial (UFT), utilizando membranas de polietersulfona Omega (*Cassette TFF* serie T, Pall Life Sciences[®]) de tamaño de poro de 5 kDa para los extractos de gamba y membranas de tripa polietersulfona Omega (*Cassette TFF* serie T, Pall Life Sciences[®]) de tamaño de poro de 3.5 kDa para los extractos de ácaros.

Las diálisis se realizaron con 7 volúmenes de agua destilada. Los extractos alergénicos dializados obtenidos fueron liofilizados en viales y conservados a 4° C hasta su utilización.

3.4.1. Cuantificación del contenido en proteína de los extractos y rendimiento

La concentración de proteína total en los extractos se determinó mediante la técnica de Bradford²⁸⁷, extrapolándose los valores de absorbancia obtenidos a una longitud de onda de 595 nanómetros (nm), en una recta estándar de albúmina de suero bovina (*Sigma-Aldrich*[®], Madrid, Spain). Se calculó el rendimiento de los diferentes extractos alergénicos mediante la cuantificación de sus contenidos en proteína partiendo de 25 g de materia prima (ratio 1:10).

3.4.2. Identificación de alérgenos en los extractos

Las proteínas contenidas en los extractos nativos de *Dermatophagoides pteronyssinus* y de *Solenocera melantho* cruda fueron identificadas mediante espectrometría de masas LC-ESI-MS/MS por la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Para ello, las muestras fueron previamente precipitadas con metanol/cloroformo para eliminar cualquier sustancia interferente incompatible con el análisis. Posteriormente, se procedió a la reducción (50 mM tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato, TCEP), alquilación y digestión de las proteínas con tripsina (1:20 enzima/proteína). El digerido se limpió con una columna de extracción en fase sólida SEP-PAK C18 (Waters Corporation[®], Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Finalmente, los péptidos se separaron según su polaridad, mediante cromatografía líquida de 90 minutos, en columna de fase reversa C-18, y fragmentados en espectrómetro de masas TRIPLE-TOF (5600 TRIPLE-TOF, AB Sciex[®], Framingham, Massachusetts, Estados Unidos).

Los datos obtenidos se contrastaron en la base de datos de *Decapoda* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), utilizando el motor de búsqueda MASCOT. El límite establecido para considerar válida la identificación de una proteína fue la obtención de un puntaje proteico mínimo de 20, y la identificación con un mínimo de 2 péptidos.

Las proteínas identificadas se contrastaron con las bases de alérgenos de *Allergome*²⁸⁸ y de la Organización Mundial de la Salud y el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/UIS)¹¹.

3.5. Pruebas cutáneas intraepidérmicas

Las pruebas se realizaron siguiendo los estándares europeos²⁸⁹. En todos los casos se realizaron pruebas cutáneas de control para excluir interferencia de medicaciones y descartar dermatografismo. Para el control positivo se utilizó un extracto comercial de dihidrocloruro de histamina 10 microgramos por mililitro (mg/ml) (Laboratorios Leti, Madrid, España). Para el control negativo se empleó un extracto comercial compuesto por fenol al 0.5% y glicerol (E-422) al 50%, fosfato monosódico dihidrato, fosfato disódico dodecahidrato, cloruro sódico y agua para inyectables (Laboratorios Leti, Madrid, España). La lectura se realizó tras 15-20 minutos, y se consideró que una prueba era positiva si el diámetro mayor de la pápula generada era superior o igual a 3 milímetros.

3.5.1. Pruebas cutáneas de diagnóstico habitual

Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas con baterías estándar de alérgenos que incluían: ácaros del polvo doméstico prevalentes en nuestra zona (*D. pteronyssinus* y *D. farinae*)⁹⁵, hongos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*), epitelios de gato y perro, pólenes de olivo (*Olea europaea*), ciprés (*Cupressus sempervivens*), plátano de sombra (*Platanus acerifolia*), abedul (*Betula*), malezas (*Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*), gramíneas (*Phleum*, *Cynodon*, *Phragmites*), leche, huevo, avellana, almendra, garbanzo, melocotón, manzana, maíz, lechuga, kiwi, judía verde, harina de trigo, gamba, merluza, mostaza y anisakis (Laboratorios Leti, Madrid, España).

3.5.2. Pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba preparados para el estudio

A un grupo de pacientes se les realizó una batería de pruebas cutáneas intraepidérmica frente a extractos de diferentes especies de gambas cocidas (*Solenocera melantho*, *Parapenaeopsis stylifera*, *Penaeus vannamei*), y de mezcla de cuatro especies de gamba crudas y cocidas (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*), reconstituidos en tampón fosfato salino (PBS) 0.01M pH 7.2, glicerol 50%, Fenol 0.4%), con una concentración de proteína final de 2 mg/ml. A algunos pacientes se les realizaron pruebas intraepidérmicas con el extracto comercial de gamba de ALK® (*Parapenaeus longirostris*) y de Immunotek® (*Solenocera melantho*, 2mg/ml).

3.6. Análisis de las muestras de sueros

Se extrajo muestra de sangre de 30 ml a todos los pacientes. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el suero sobrenadante, desechándose el precipitado. Los sueros se codificaron y se congelaron a -20°C hasta el momento de la realización del estudio in vitro.

3.6.1. Detección de IgE específica a gambas y ácaros mediante ImmunoCAP®

Se determinaron las IgE específicas a Pen a 1 (tropomiosina de *Penaeus aztecus*, con el código f351), a gamba (se trata de una mezcla de cuatro especies diferentes de gamba: *Pandalus borealis*, *Penaeus monodon*, *Metapenaeopsis barbata* y *Metapenaeus joyneri*, con el código f24), y a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*, código d1, y *Dermatophagoides farinae*, código d2).

El sistema ImmunoCAP (Thermo Fischer Scientific®)²⁵⁹ mide la IgE específica a alérgenos en suero o plasma por enzoinmunoensayo. Cada alérgeno está codificado mediante letras y números. El resultado es cuantitativo con un rango entre 0 y 100 KUA/L (kilo unidades de anticuerpos específicos contra alérgeno). Se consideran positivos los valores superiores a 0.1 KUA/L.

3.6.2. Detección de IgE específica mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se determinaron las IgE específicas mediante ELISA a *Parapenaeopsis stylifera* cruda y cocida (PS Cru y PS Coc), *Penaeus vannamei* cruda y cocida (PV Cru y PV Coc), *Solenocera melantho* cruda y cocida (SME Cru y SME Coc), mezcla de 4 especies crudas y cocidas (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*) (Mix Cru y Mix Coc), *Dermatophagoides pteronyssinus* (DPT), *Dermatophagoides farinae* (DF) y *Blomia tropicalis* (BT).

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas multipocillo de alta afinidad (*Greiner Bio One*[®], Baden-Württemberg, Alemania). Las placas fueron sensibilizadas durante 16 horas a 4°C con 1 microgramo (µg) de proteína del extracto alergénico, en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6. Una vez sensibilizadas, las placas se lavaron con PBS 0.01M, Tween 20 0.25% (PBS-T) y se incubaron con sueros de pacientes sensibilizados, a una dilución 1/4 en PBS-T, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente, se incubaron 2 horas con anticuerpos IgG de ratón anti-IgE humana conjugados con peroxidasa (*SouthernBiotech*[®], Alabama, Estados Unidos), a una dilución 1:2000 en PBS-T-suero de ternera fetal 5%. Para el revelado se utilizó o-fenilendiamina 0.017 M (*Sigma-Aldrich*), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.3% en tampón citrato/fosfato pH 5. Las reacciones enzimáticas se detuvieron adicionando ácido clorhídrico 1 normal (HCl 1N, un equivalente por litro) realizándose posteriormente las lecturas de absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (*Biotek Synergy Mx*[®], Vermont, Estados Unidos).

Para la realización del resto del estudio, a partir de los datos obtenidos por ELISA, se seleccionaron 20 pacientes según su sensibilización a gamba (*Solenocera melantho* cruda) y a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y se catalogaron en cuatro grupos con las siguientes características:

- 5 pacientes con IgE positiva a gamba y a ácaros: grupo SME⁺DPT⁺
- 5 pacientes con IgE positiva a gamba e IgE negativa a ácaros: grupo SME⁺DPT⁻
- 5 pacientes con IgE negativa a gamba e IgE positiva a ácaros: grupo SME⁻DPT⁺
- 5 pacientes con IgE negativa a gamba y a ácaros: grupo SME⁻DPT⁻

Los ensayos de ELISA de competición se realizaron en placas multipocillo de alta afinidad (*Greiner Bio One*[®], Baden-Württemberg, Alemania) sensibilizadas durante 16 horas a 4°C

con 1 µg de proteína del extracto alergénico, en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6. Una vez sensibilizadas, las placas se lavaron con PBS 0.01M, Tween 20 0.25% (PBS-T) y se incubaron con diferentes concentraciones de competidor y mezclas de sueros de pacientes sensibilizados. Tras la incubación durante 16 horas a 4°C, se lavaron las placas nuevamente y se incubaron con anticuerpos IgG de ratón anti-IgE humana conjugados con peroxidasa (*SouthernBiotech*[®], Alabama, Estados Unidos), a una dilución 1:2.000, en PBS-T-suero de ternera fetal 5%. Para el revelado, se utilizó o-fenilendiamina 0.017M (*Sigma-Aldrich*[®]), H₂O₂ 0.3% en tampón citrato/fosfato pH 5. Las reacciones enzimáticas se detuvieron adicionando HCl 1N, realizándose posteriormente una lectura de absorbancia a 492 nm, en un espectrofotómetro (*Biotek Synergy Mx*[®], Vermont, Estados Unidos).

3.6.3. Obtención de perfiles proteicos y alergénicos

Los perfiles proteicos y alergénicos de los extractos se obtuvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e inmunodetección (*Western blot*) con los sueros humanos, con IgE específica a alérgenos de *S. melantho* cruda o *D. pteronyssinus*.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida *Mini-PROTEAN*[®] *TGX Stain-Free*[™] (*BioRad*[®], California, Estados Unidos), en condiciones no reductoras, según el procedimiento descrito por Laemmli²⁹⁰. Para ello, se cargaron 10 µg por pocillo de las muestras, diluidas en un volumen igual de tampón de carga (Tris-HCl 0.5 milimolar (mM) pH 6.8, dodecilsulfato sódico (SDS) 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%). Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial *Precision Plus Protein All Blue Standards* (*BioRad*[®]). La presencia de bandas se puso de manifiesto mediante la tinción de los geles con colorante *Coomassie* (*GelCode*[™] *Blue Stain Reagent*, *ThermoFisher Scientific*[®], Massachusetts, Estados Unidos) incubando los geles en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los ensayos de *Western blot*, se realizaron mediante la transferencia de las proteínas, previamente sometidas a electroforesis, a una membrana de nitrocelulosa (*BioRad*[®]). Como patrón de bandas se utilizó el marcador comercial *Precision Plus Protein WesternC Standards* (*BioRad*[®]). La transferencia se realizó a un voltaje constante (300 milivoltios, mV) durante 17 minutos. Posteriormente, se realizó una tinción con rojo *Ponceau* (*Sigma-Aldrich*[®]) con el fin de confirmar la transferencia de las proteínas a las membranas. Tras

decolorar con PBS-Tween 20 0.25% (PBS-T), las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) 5% PBS-T a 25°C durante 1 hora. Las membranas se incubaron con los sueros en PBS-T – albúmina de suero bovino, BSA 1%, durante 18 horas a 4°C en agitación constante. Tras el lavado de las membranas con PBS-T, se incubaron con anticuerpos de ratón anti-IgE humana, conjugados a peroxidasa (*SouthernBiotech*[®], Alabama, Estados Unidos), a una dilución 1:2000 en PBS-T - BSA 5% durante 1 hora a 25°C. Para la visualización del marcador se utilizó estreptactina conjugada con peroxidasa a una dilución 1:5000 (*Precision Protein StrepTactin HRP conjugate*, BioRad[®]). Las membranas se revelaron con el kit comercial *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham[®], GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

3.6.4. Análisis de reactividad cruzada entre ácaros y gamba

Se llevaron a cabo análisis de reactividad mediante ELISA de competición y *Western blot* de inhibición.

Todos los ensayos de ELISA de competición se realizaron en placas multipocillo de alta afinidad (*Greiner Bio One*[®], Baden-Württemberg, Alemania) sensibilizadas durante 16 horas a 4°C con 1 µg de proteína del extracto alergénico, en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6. Una vez sensibilizadas, las placas se lavaron con PBS 0.01M, Tween 20 0.25% (PBS-T) y se incubaron durante 16 horas a 4°C con diferentes concentraciones de competidor y mezclas de sueros de pacientes sensibilizados. Posteriormente se lavaron las placas nuevamente y se incubaron con anticuerpos IgG de ratón anti-IgE humana conjugados con peroxidasa (*SouthernBiotech*[®], Alabama, Estados Unidos), a una dilución 1:2000 en PBS-T-suero de ternera fetal 5%. Para el revelado se utilizó o-fenilendiamina 0.017M (*Sigma-Aldrich*[®]), H₂O₂ 0,3% en tampón citrato/fosfato pH 5. Las reacciones enzimáticas se detuvieron adicionando HCl 1N, realizándose posteriormente una lectura de absorbancia a 492 nm, en un espectrofotómetro (*Biotek Synergy Mx*[®], Vermont, Estados Unidos). Se utilizó *S. melantho* cruda (SME) o *D. pteronyssinus* como fase sólida y como competidores.

Los ensayos de *Western blot* de inhibición IgE fueron realizados incluyendo una etapa previa de incubación de los sueros con 10 µg del extracto competidor, en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los sueros se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, con el que se incubaron las membranas. Se prepararon inmunoblots de 9 carriles usando sueros de 5 pacientes

SME⁺DPT⁺ o SME⁺DPT⁻ (carriles 1 a 5), una mezcla de sueros SME⁻DPT⁻ (carril 6), una mezcla de sueros SME⁺DPT⁺ (carril 7), mezcla de sueros SME⁺DPT⁺ sin extracto para el control negativo (carril 8), y mezcla de sueros SME⁻DPT⁺ sin extracto para el control positivo (carril 9). Se realizaron previamente sin inhibición, y posteriormente incluyendo una etapa previa de incubación con DPT como competidor.

3.7. Cronograma

Se inició el estudio en septiembre de 2015 y se finalizó en septiembre de 2018.

3.8. Aspectos éticos

El estudio obtuvo la aprobación del Comité Ético del Hospital Clínic de Barcelona. Los pacientes recibieron información sobre el estudio y firmaron un consentimiento informado.

3.9. Análisis estadístico

Se realizó estudio estadístico descriptivo de las características poblacionales más relevantes. Se determinó la existencia de diferencias poblacionales utilizando Chi-cuadrado para las variables nominales y numéricas discretas, ANOVA para las variables continuas con distribución normal, y U-Mann Whitney para el resto de variables continuas. En caso de encontrar varias relaciones con diferencias estadísticamente significativas, se realizaría análisis multivariante para determinar la relevancia de dichas asociaciones. Todos los cálculos se llevaron a cabo con el paquete de software estadístico SPSS (IBM, Armonk, NY, EEUU) en su versión 20.

4. Resultados

4.1. Características clínicas de la población estudiada

Se incluyeron 117 pacientes en el estudio de los que 69 eran mujeres (representando el 59%), con una edad mediana de 42 años (rango intercuartílico 34-52), y se clasificaron como alérgicos a gamba a 99 pacientes (84.6%), entre las que había 60 mujeres (60.6%). Los pacientes referían haber presentado diferentes cuadros clínicos en relación a la ingesta de gamba: 34 reseñaban haber presentado anafilaxia o shock anafiláctico (AF), 4 relataban episodios de broncoespasmo tras la ingesta de gamba (RES), 52 habían tenido episodios de prurito, urticaria y/o angioedema (CUT), 10 tuvieron dolor abdominal, diarrea, náuseas y/o vómitos (DIG), 40 describían episodios de picor orofaríngeo y/o edema labial o lingual (SAO) y 12 habían tenido episodios de broncoespasmo por exposición a vapores de cocción de gamba (INH). Algunos pacientes habían presentado más de un tipo de reacción.

De entre los 99 pacientes alérgicos a gamba, 44 (44.4%) referían haber tenido de 2 a 5 episodios de síntomas alérgicos, 40 (40.4%) habían presentado más de 5 episodios, y 15 (15.2%) referían un único episodio de alergia. Con respecto al debut de los síntomas, 50 pacientes (50.5%) habían iniciado la clínica en la edad adulta, 12 pacientes (12.1%) en la infancia y 11 en la adolescencia (11.1%). No eran capaces de concretar el momento de inicio de la clínica 26 pacientes (26.3%).

En cuanto a los cofactores, de los 99 pacientes alérgicos a gamba, 19 (19.2%) refirieron la asociación clara de alguno que pudiera potenciar la reacción clínica, y los responsables fueron por orden descendente los fármacos AINE (10 pacientes), el alcohol (7 pacientes), el ejercicio (1 paciente), y la combinación de ejercicio y alcohol (1 paciente).

Los valores clínicos y demográficos se encuentran resumidos en la tabla 3.

Se agruparon a los pacientes en grupos en función de la gravedad de los síntomas presentados, y se distribuyeron en:

- Anafilaxia (AF): con un total de 34 pacientes, que representaban el 34% del total.
- Síntomas respiratorios (RES): 1 paciente (1%).
- Síntomas cutáneos (CUT): 42 pacientes (43%).
- Síntomas digestivos (DIG): 4 pacientes (4%).
- Síndrome de alergia oral (SAO): 17 pacientes (17%).
- Síntomas respiratorios por inhalación de vapor de cocción (INH): 1 paciente (1%).

En la Figura 9 se puede observar la distribución de los síntomas clínicos.

Tabla 3. Variables clínicas y demográficas

Pacientes incluidos (pruebas cutáneas a gamba positivas)		117
Mujeres		69 (59%)
Edad		42 (34-52)
Alergia Gamba		99 (84.6%)
Características de la población con alergia a gamba (n=99)		
Mujeres		60 (60.6%)
Edad		42 (34-53)
Manifestación clínica	Anafilaxia	34 (34.4%)
	Broncoespasmo	1 (1%)
	Urticaria / Angioedema	42 (42.4%)
	Digestivo	4 (4%)
	SAO	17 (17.2%)
	Inhalada	1 (1%)
Debut de los síntomas	Infancia	12 (12.1%)
	Adolescencia	11 (11.1%)
	Adulto	50 (50.5%)
	Desconocido	26 (26.3%)
Número de episodios	Único	15 (15.1%)
	Varios	44 (44.5%)
	Múltiples	40 (40.4%)
Cofactores		19 (19.2%)
Tipo de cofactor	AINE	10 (10.1%)
	Alcohol	7 (7.1%)
	Ejercicio	1 (1%)
	AINE y Ejercicio	1 (1%)

Los valores se expresan en mediana (rango intercuartílico) para las variables continuas y en número absoluto (porcentaje) para el resto de variables. Los valores porcentuales de las variables de presentación clínica y cofactores se calculan sólo sobre los pacientes alérgicos. La manifestación clínica hace referencia a la más grave de las referidas. AINE: Antiinflamatorio no esteroideo; SAO: Síndrome de alergia oral.

RESULTADOS

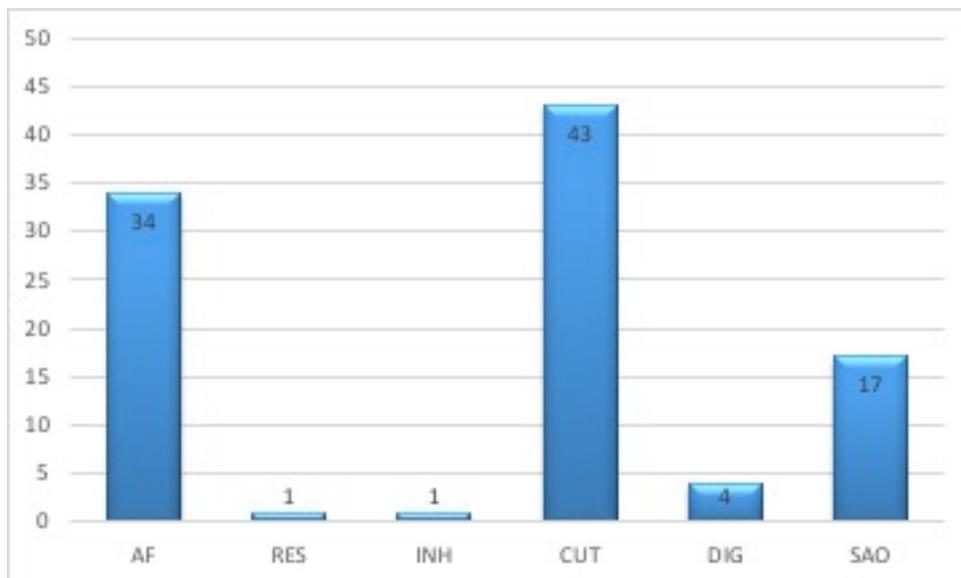


Figura 9. Diagrama de barras representativo de los síntomas de los pacientes y su frecuencia expresada en porcentaje. AF: anafilaxia; RES: síntomas respiratorios; INH: síntomas respiratorios por inhalación de vapores de cocción; CUT: síntomas cutáneos; DIG: síntomas digestivo; SAO: síndrome de alergia oral.

4.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas

4.2.1. Pruebas cutáneas de diagnóstico habitual

Del total de los pacientes, 85 (72.6%) se consideraron alérgicos a ácaros del polvo doméstico. De ellos, 48 pacientes (41%) presentaban además sensibilización a otros alérgenos respiratorios, y 3 pacientes tenían alergia respiratoria sin sensibilización a ácaros.

Entre los pacientes alérgicos a gamba el 73.7% eran alérgicos a ácaros del polvo, siendo la única sensibilización en el 47.5%, mientras que dos pacientes estaban sensibilizados a otros alérgenos respiratorios que no fueran ácaros. De todos los sujetos incluidos en el estudio, 26 (22.2%) estaban sensibilizados a anisakis. Un 19.2% de los pacientes alérgicos a gamba tenían alergia a otros alimentos, de etiología variada: alimentos vegetales (13%) y cefalópodos y bivalvos (3%). Se destacan los datos más importantes en la tabla 4.

RESULTADOS

Tabla 4. Resultados destacados de las pruebas cutáneas intraepidérmicas

	Alérgicos (n=99)	Tolerantes (n=18)	Significación
TC gamba Leti®	99 (100%)	18 (100%)	
TC ácaros	73 (73.7%)	12 (66.6%)	0.806
TC anisakis	22 (22.2%)	4 (22.2%)	0.601

Los valores se expresan en número absoluto (porcentaje). TC: pruebas cutáneas intraepidérmicas.

4.2.2. Pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba preparados específicamente para el estudio

Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas con extractos preparados específicamente para el estudio, procedentes de diferentes especies de gambas (*Solenocera melantho*, *Parapenaeopsis stylifera*, *Penaeus vannamei*), y con extractos de mezcla de cuatro especies de gamba crudas y cocidas (*Parapenaeopsis spp.*, *Parapenaeus spp.*, *Solenocera spp.* y *Trachipenaeus spp.*). También se testaron los extractos comerciales de ALK® e Inmunotek®.

Se realizaron las pruebas cutáneas intraepidérmicas con estos extractos a 32 pacientes. El extracto que obtuvo más positividad fue el de *P. stylifera* (62.5%), y el que tuvo más resultados negativos fue el de ALK® (65.4%). En la tabla 5 se recoge el desglose de resultados de las pruebas cutáneas realizadas.

Tabla 5. Resultados de las pruebas cutáneas intraepidérmicas con diferentes extractos de gambas

N=32	Positivas	Negativas	No realizadas
Mix cocido	18 (56.3%)	14 (43.8%)	0
Mix crudo	18 (56.3%)	14 (43.8%)	0
<i>Solenocera melantho</i>	19 (59.4%)	13 (40.6%)	0
<i>Parapenaeopsis stylifera</i>	20 (62.5%)	12 (37.5%)	0
<i>Penaeus vannamei</i>	17 (53.1%)	15 (46.9%)	0
Inmunotek®	10 (38.5%)	16 (61.5%)	8
ALK®	9 (34.6%)	17 (65.4%)	8

Los valores se expresan en número absoluto (porcentaje).

4.3. Extractos alergénicos

4.3.1 Análisis de los extractos

Los extractos alergénicos se identificaron según su origen: *Parapenaeopsis stylifera* cruda (PS cruda), *Parapenaeopsis stylifera* cocida (PS cocida), *Penaeus vannamei* cruda (PV cruda), *Penaeus vannamei* cocida (PV cocida), *Solenocera melantho* cruda (SME cruda), *Solenocera melantho* cocida (SME cocida), mezcla de 4 especies crudas (Mix crudo), mezcla de 4 especies cocidas (Mix Cocido), *Dermatophagoides pteronyssinus* (DPT), *Dermatophagoides farinae* (DF) y *Blomia tropicalis* (BT).

Se calcularon los rendimientos de cada extracto, expresados en relación a la materia prima (MP) inicial a partir de la que se obtienen, que era 25 g de gamba para cada uno (tabla 6). El mayor rendimiento se obtuvo de los extractos de las gambas crudas, destacando PV cruda, de la que partiendo de una cantidad inicial de 25 mg se obtuvieron 1189.75 mg de proteína total, lo que proporcionalmente corresponde a un rendimiento de 4.759. En segundo y tercer lugar se situaron: los extractos de SM cruda, de la que se obtuvo 603.7 mg de proteína total (rendimiento de 2.4148), y de PS cruda (553 mg de proteína obtenida, con un rendimiento de 2.215). El menor rendimiento se obtuvo con el extracto Mix cocido (202 mg de proteína total obtenida, que corresponde un rendimiento de 0.08). En la figura 10 se representa en columnas los rendimientos de los extractos crudos y cocinados.

RESULTADOS

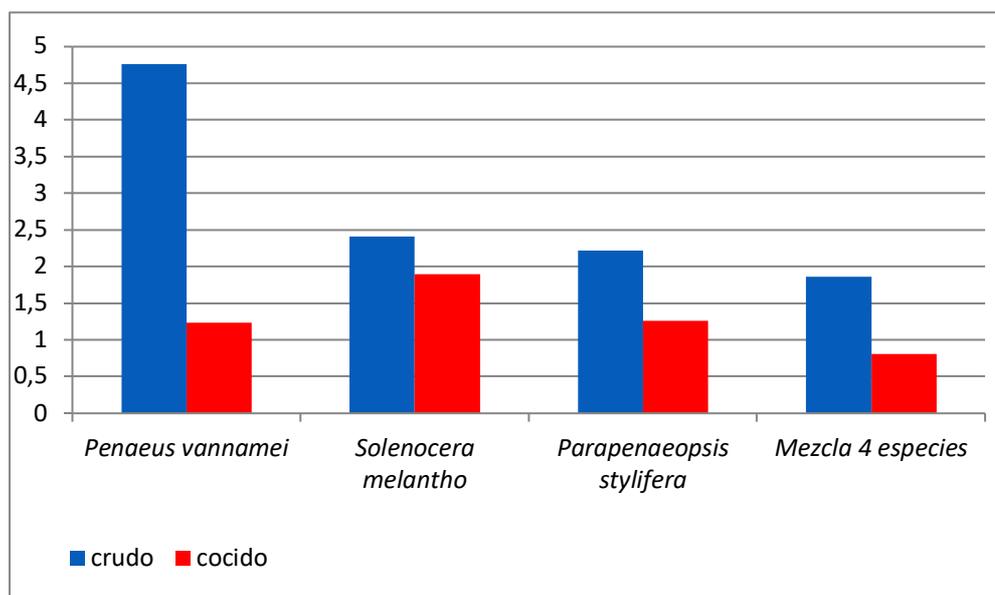


Figura 10. Representación gráfica de los rendimientos de los extractos de gambas.

Tabla 6. Concentración de proteína total y rendimiento de los extractos de gamba elaborados.

Extracto	Volumen inicial (ml)	Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	Proteína total (mg)	Rendimiento vs MP
<i>Parapenaeopsis stylifera</i> cruda	500	1.107,5	553,75	2,215
<i>Parapenaeopsis stylifera</i> cocida	500	631,1	315,55	1,2622
<i>Penaeus vannamei</i> cruda	500	2.379,5	1.189,75	4,759
<i>Penaeus vannamei</i> cocida	500	618,4	309,2	1,2368
<i>Solenocera melantho</i> cruda	500	1.207,4	603,7	2,4148
<i>Solenocera melantho</i> cocida	500	948,8	474,4	1,8976
Mezcla 4 especies crudas	500	929,2	464,6	1,8584
Mezcla 4 especies cocidas	500	404	202	0,808

ml: mililitros; $\mu\text{g/ml}$: microgramos por mililitro; mg: miligramos; vs: frente a; MP: materia prima

4.3.2. Identificación de proteínas en los extractos

Las proteínas contenidas en los extractos nativos de *D. pteronyssinus* y de *S. melantho* cruda fueron identificadas mediante espectrometría de masas y se contrastaron con las bases de alérgenos de *Allergome*²⁸⁸ y de WHO/UIS¹¹.

En ambos extractos se detectaron proteínas comunes: Tropomiosina, Paramiosina, Arginina quinasa, Triosa-fosfato isomerasa y Proteína de choque térmico.

En el extracto de DPT se identificaron otras proteínas. Las que están incluidas en las bases de datos de WHO/UIS son: Cisteína proteasa (Der p 1), Proteína transportadora de colesterol (Der p 2), Tripsina (Der p 3), Amilasa (Der p 4), Quimotripsina (Der p 6), Proteína de aumento de permeabilidad bacteriana (Der p 7), Glutación transferasa (Der p 8), Serina proteasa colagenolítica (Der p 9), Proteína transportadora de ácidos grasos (Der p 13), Apolipoforina (Der p 14), Proteína similar a quitinasa (Der p 15), proteína de unión a quitina (Der p 18), Der p 21 (de función desconocida), Dominio de proteína similar a peritrofina (Der p 23), Proteína de unión a ubiquinol-citocromo c reductasa (Der p 24), Der p 36 (de función desconocida) y Dominio de proteína similar a *Petrotrophic* (Der p 37).

Aparte de las proteínas comunes a DPT, en el extracto de SME se identificaron las siguientes proteínas identificadas en WHO/UIS: Proteína sarcoplásmica de unión a calcio, Cadenas ligeras de la miosina, Troponina C y Troponina I.

En ambos extractos se hallaron otras proteínas que no están incluidas como alérgenos en las bases de datos de WHO/UIS.

En las tablas 7 y 8 se recoge la lista de proteínas identificadas en cada extracto, resaltando en color verde los alérgenos que son comunes para ambos.

RESULTADOS

Tabla 7. Alérgenos identificados en el extracto de *S. melantho* cruda

Alérgenos específicos de gamba (WHO/IUIS) identificados en el extracto	Tropomiosina
	Arginina quinasa
	Proteína sarcoplásmica de unión a calcio
	Cadenas ligeras de la miosina
	Troponina C
	Triosafosfato isomerasa
	Troponina I
Otros alérgenos identificados en el extracto	Paramiosina
	Hemocianina
	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
	Aldolasa
	Vitelogenina
	Proteína de choque térmico
	Ciclofilina
14-3-3	

Se destaca en verde los alérgenos comunes identificados en el extracto de *D. pteronyssinus* y *S. melantho* cruda.

RESULTADOS

Tabla 8. Alérgenos identificados en el extracto de *D. pteronyssinus*

Alérgenos específicos de <i>D. pteronyssinus</i> (WHO/IUIS) identificados en el extracto	Cisteína proteasa (Der p 1)
	Proteína transportadora de colesterol (Der p 2)
	Tripsina (Der p 3)
	Aamilasa (Der p 4)
	Der p 5 (función desconocida)
	Quimotripsina (Der p 6)
	Proteína de aumento de permeabilidad bacteriana (Der p 7)
	Glutación transferasa (Der p 8)
	Serina proteasa colagenolítica (Der p 9)
	Tropomiosina (Der p 10)
	Paramiosina (Der p 11)
	Proteína transportadora de ácidos grasos (Der p 13)
	Apolipoporfina (Der p 14)
	Proteína similar a quitinasa (Der p 15)
	Proteína de unión a quitina (Der p 18)
	Arginina quinasa (Der p 20)
	Der p 21 (función desconocida)
	Dominio de proteína similar a peritrofina (Der p 23)
	Proteína de unión a ubiquinol-citocromo c reductasa (Der p 24)
	Der p 36 (función desconocida)
Dominio de proteína similar a <i>Petrotrophic</i> (Der p 37)	
Otros alérgenos identificados en el extracto	Aldehído deshidrogenasa (Der f 10)
	Similar a gelsolina (Der f 16)
	Triosafofato isomerasa (Der f 25)
	Proteína de choque térmico (Der f 28)
	Proteína similar a cadena pesada de la ferritina (Der f 30)
	Der f 32 (función desconocida)
	Enolasa alfa
	Tiorredoxina peroxidasa
Factor de elongación traslacional 2	

Se destaca en verde los alérgenos comunes identificados en el extracto de *D. pteronyssinus* y *S. melantho* cruda.

4.4. IgE específica mediante enzoinmunoensayo

4.4.1. IgE específica a gamba

Se realizaron las determinaciones de IgE específica a 112 pacientes, de los cuales 96 eran alérgicos. El mediana de la IgE a gamba en el total de pacientes fue de 0.82 (RI 0.3-3.45), y en los alérgicos 0.96 (RI 0.3-4.03), sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los no alérgicos (Tabla 9).

De los pacientes alérgicos a gamba, el 89.6% tenían IgE específica a gamba positiva, y de los no alérgicos, eran el 81.2%, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9. Determinaciones de IgE específica a gamba

	Total (n=112)	Alérgicos (n=96)	No alérgicos (n=16)	p
IgE específica a Gamba	0.82 (0.3-3.45)	0.96 (0.3-4.03)	0.49 (0.13-1.34)	0.858
IgE específica a gamba positiva	99 (88.4%)	86 (89.6%)	13 (81.2%)	0.39

Se expresan los valores en mediana (rango intercuartílico) y valor absoluto (porcentaje). p: resultado del valor estadístico adecuado para cada comparación

4.4.1. IgE específica a Pen a 1

Se realizaron las determinaciones de IgE específica a 105 pacientes, de los cuales 91 eran alérgicos. El mediana de la IgE a gamba en el total de pacientes fue de 0.00 (RI 0-0.12), y en los alérgicos 0.00 (RI 0-0.14). (Tabla 10)

De los pacientes alérgicos a gamba, el 28.6% tenían IgE específica a Pen a 1 positiva, y de los no alérgicos, eran el 14.3%, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Determinaciones de IgE específica a Pen a 1

	Total (n=105)	Alérgicos (n=91)	No alérgicos (n=14)	p
IgE específica a Pen a 1	0 (0-0.12)	0 (0-0.14)	0 (0-0.05)	0.204
IgE específica a Pen a 1 positiva	28 (26.7%)	26 (28.6%)	2 (14.3%)	0.34

Se expresan los valores en mediana (rango intercuartílico) y valor absoluto (porcentaje). p: resultado del valor estadístico adecuado para cada comparación

Todos los pacientes con determinaciones de IgE a Pen a 1 positivas tenían a su vez IgE específica a gamba positiva.

No se determinaron diferencias significativas en cuanto a los valores de IgE específica a Pen a 1 en función de la gravedad de los síntomas clínicos, ni entre los pacientes con anafilaxia frente a los pacientes con otras manifestaciones clínicas.

Entre los 83 pacientes alérgicos a ácaros, se cuantificaron 75 (90.4%) con IgE específica positiva a gamba, y entre los 19 no alérgicos a ácaros, se hallaron 15 pacientes con IgE positiva a gamba (78.9%), sin diferencias estadísticamente significativas.

4.5. IgE específica mediante ELISA

4.5.1. Resultados de las determinaciones de IgE específica medidas por ELISA

Se realizaron determinaciones de IgE específica mediante ELISA para los 8 extractos preparados para el estudio (PS, PV, SME y mix gambas, en crudo y cocido) en los 117 pacientes incluidos, y para *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *Blomia tropicalis* en 67 pacientes.

S. melantho cruda fue el extracto más reconocido por el total de pacientes (35.9%), y por el total de pacientes alérgicos (39.4%), y además fue el que obtuvo el valor numérico más alto de absorbancia (4.042). El extracto Mix cocido fue el de menor reconocimiento, tanto por el total de pacientes (16.2%), como por los alérgicos (16.2%). Los valores de IgE específica medida por absorbancia a los 8 extractos de gamba testados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre alérgicos y tolerantes.

En la figura 11 se representan los valores de absorbancia para cada extracto de gamba testado.

En la tabla 11 se reflejan las lecturas detalladas de las IgE específica medidas por absorbancia.

En el anexo 1 se pueden consultar las tablas de resultados de IgE específica a gamba y Pen a 1 por ImmunoCAP™, junto con el resultado de las absorbancias obtenidas por cada paciente para cada extracto.

RESULTADOS

De los pacientes alérgicos a gamba, el 27.3% reconoció *D. pteronyssinus* y el 28.3% *D. farinae* por absorbancia, y únicamente el 6% de pacientes reconocían *Blomia tropicalis*. El extracto que obtuvo el valor numérico más alto de absorbancia fue *D. farinae* (0.58). Los valores de IgE específica medida por absorbancia a los 3 extractos de ácaros testados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre alérgicos y no alérgicos a gamba.

El estudio estadístico de correlaciones de la determinación de IgE por absorbancia (tabla 12), demostró que el extracto de *S. melantho* cruda era el que tenía una correlación más elevada con el resto de extractos (valores superiores a 0.9 para todos los extractos). Los extractos de *P. vannamei* cruda y cocida fueron los que tuvieron una menor correlación entre ellos (0.771).

Los extractos de los ácaros *Dermatophagoides* presentaron una correlación muy alta entre ellos (0.921) y muy baja con los extractos de gamba y *Blomia*. El extracto de *Blomia* mostró correlaciones negativas con los extractos de gambas.

Tabla 11. Valores de las determinaciones de IgE específica a gambas y ácaros medida por ELISA

	Total (n=117)		Alérgicos (n=99)		Tolerantes (n=18)		Significación
	Positivo	Valor	Positivo	Valor	Positivo	Valor	
<i>P. styliifera</i>	Cruda	33 (28.2%)	0.041 (0-0.2)	30 (30.3%)	0.042 (0-0.22)	3 (16.7%)	0.0085 (0-0.064)
	Cocida	22 (18.8%)	0.021 (0-0.088)	19 (19.2%)	0.022 (0-0.092)	3 (16.7%)	0.01 (0-0.11)
<i>P. vannamei</i>	Cruda	32 (27.4%)	0.041 (0-0.28)	30 (30.3%)	0.04 (0.009-0.31)	2 (11.1%)	0.043 (0-0.12)
	Cocida	25 (29.9%)	0.05 (0.004-0.4)	32 (32.3%)	0.053 (0.005-0.42)	3 (16.7%)	0.02 (0-0.11)
<i>S. melantho</i>	Cruda	42 (35.9%)	0.081 (0.017-0.53)	39 (39.4%)	0.1 (0.018-0.54)	3 (16.7%)	0.05 (0.013-0.11)
	Cocida	34 (29.1%)	0.056 (0.012-0.26)	31 (31.3%)	0.057 (0.012-0.32)	3 (16.7%)	0.048 (0.01-0.09)
Mezcla 4 especies	Cruda	26 (22.2%)	0.029 (0-0.19)	24 (24.2%)	0.029 (0-0.21)	2 (11.1%)	0 (0-0.82)
	Cocida	19 (16.2%)	0.015 (0-0.091)	16 (16.2%)	0.018 (0-0.092)	3 (16.7%)	0 (0-0.1)
<i>D. pteronyssinus</i>	Cruda	32 (27.4%)	0.32 (0.028-1.59)	27 (27.3%)	0.31 (0.019-1.46)	5 (27.8%)	1.09 (0.19-2.23)
	Cocida	35 (29.9%)	0.58 (0.04-2.11)	28 (28.3%)	0.56 (0.03-1.85)	7 (38.9%)	1.11 (0.3-2.71)
<i>B. tropicalis</i>		7 (6%)	0.03 (0.016-0.084)	4 (4%)	0.03 (0.015-0.068)	3 (16.7%)	0.13 (0.02-0.29)

Los valores se expresan en mediana (rango intercuartílico) para las variables continuas y en número absoluto (porcentaje) para el resto de variables.

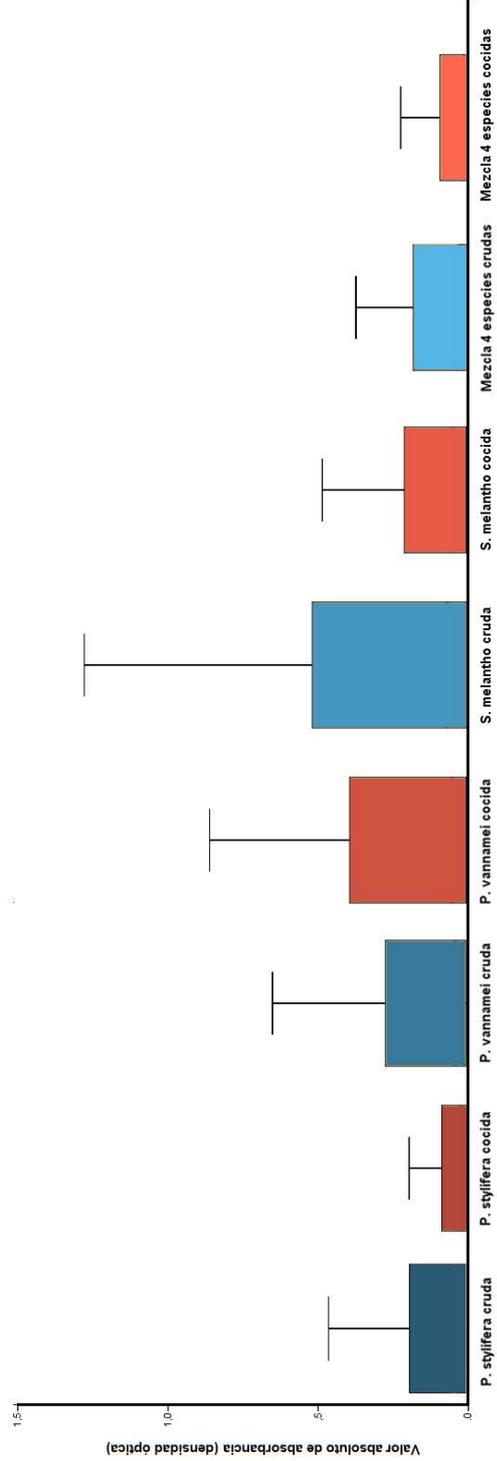


Figura 11. Valores de absorbancia para los distintos extractos específicamente desarrollados para este estudio

Tabla 12. Tabla de correlaciones de las absorbancias de los extractos

<i>P. styliifera</i> cruda	<i>P. styliifera</i> cocida	<i>P. vannamei</i> cruda	<i>P. vannamei</i> cocida	<i>S. melantho</i> cruda	<i>S. melantho</i> cocida	Mezcla 4 especies crudas	Mezcla 4 especies cocidas	<i>D. pteronyssinus</i> 0,407	<i>D. farinae</i> 0,256	<i>B. tropicalis</i> -0,064
	0,906	0,953	0,876	0,985	0,921	0,979	0,898			
<i>P. styliifera</i> cocida		0,809	0,945	0,949	0,993	0,862	0,999	0,383	0,158	-0,056
<i>P. vannamei</i> cruda			0,771	0,913	0,808	0,981	0,803	0,406	0,298	-0,055
<i>P. vannamei</i> cocida				0,918	0,947	0,832	0,935	0,367	0,147	0,001
<i>S. melantho</i> cruda					0,964	0,957	0,942	0,397	0,221	-0,059
<i>S. melantho</i> cocida						0,864	0,989	0,379	0,151	-0,059
Mezcla 4 especies crudas							0,855	0,380	0,271	-0,056
Mezcla 4 especies cocidas								0,392	0,171	-0,060
<i>D. pteronyssinus</i>	0,407	0,406	0,367	0,397	0,379	0,380	0,392		0,921	0,429
<i>D. farinae</i>	0,256	0,298	0,147	0,221	0,151	0,271	0,171			0,470
<i>B. tropicalis</i>	-0,064	-0,055	0,001	-0,059	-0,059	-0,056	-0,060		0,429	0,470

4.5.2. Medición de IgE específica a *D. pteronyssinus* y a *S. melantho* en diluciones de sueros de los grupos SME⁻DPT⁺, SME⁺DPT⁻ y SME⁺DPT⁺

A partir de los datos obtenidos por ELISA, se seleccionaron 20 pacientes según su sensibilización a gamba (*Solenocera melantho* cruda) y a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*), y se catalogaron en cuatro grupos en función de su reactividad frente a ácaros y/o gamba, tal y como consta en Material y Métodos (apartado 3.6.3).

En los grupos SME⁻DPT⁺, SME⁺DPT⁻ y SME⁺DPT⁺ se realizó la determinación de IgE específica a *D. pteronyssinus* y *S. melantho* (medida por absorbancia) en diluciones progresivas de suero.

4.5.2.1. Reactividad IgE específica a *D. pteronyssinus*

Los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁻DPT⁺ presentaron una curva de reactividad IgE específica con un descenso progresivo y superponible. El grupo SME⁺DPT⁻ no presentó reactividad IgE específica a ácaro (Figura 12).

4.5.2.1. Reactividad IgE específica a *S. melantho*

Los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁺DPT⁻ presentaron una curva de reactividad IgE específica con un descenso progresivo, pero de menor intensidad en el grupo SME⁺DPT⁻. El grupo SME⁻DPT⁺ no presentó reactividad IgE específica a gamba (Figura 13).

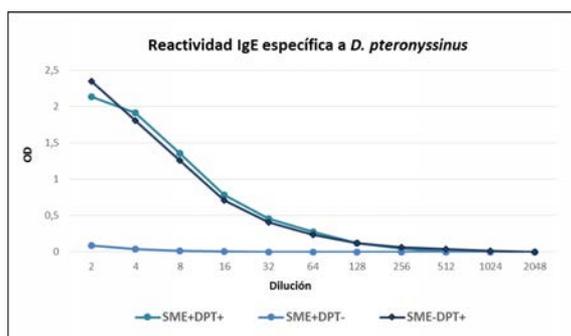


Figura 12. Reactividad IgE específica frente a *D. pteronyssinus* en los grupos SME⁺DPT⁺, SME⁻DPT⁺ y SME⁺DPT⁻.
OD: densidad óptica.

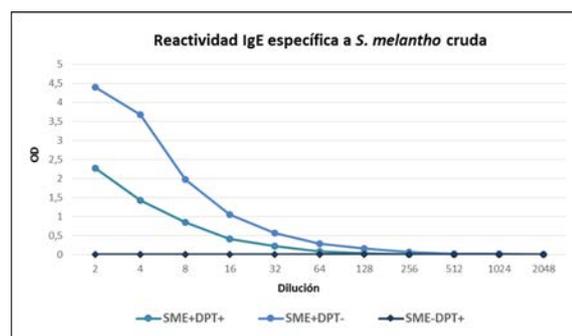


Figura 13. Reactividad IgE específica frente a *S. melantho* cruda en los grupos SME⁺DPT⁺, SME⁺DPT⁻ y SME⁻DPT⁺.
OD: densidad óptica.

4.6. Perfiles proteicos y alergénicos

Los perfiles proteicos y alergénicos de los extractos se obtuvieron mediante electroforesis (SDS-PAGE) e inmunodetección (*Western blot*) con los sueros de los pacientes de los grupos SME⁺DPT⁺, SME⁺DPT⁻, SME⁻DPT⁺ y SME⁻DPT⁻.

Se realizaron ensayos con extracto de gamba (SME) y de ácaro (DPT) para 5 pacientes de cada grupo descrito.

4.6.1. Grupo SME⁺DPT⁺

En los inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁺DPT⁺ se reconocieron proteínas de diferente tamaño al enfrentar los sueros a extracto de gamba y de ácaro.

Al enfrentarlos a extracto de gamba (Figura 14) los pacientes presentaban IgE específicas a proteínas de tamaño: 35-36 kDa (flecha naranja), 17 kDa (flecha verde), y 75kDa (flecha azul).

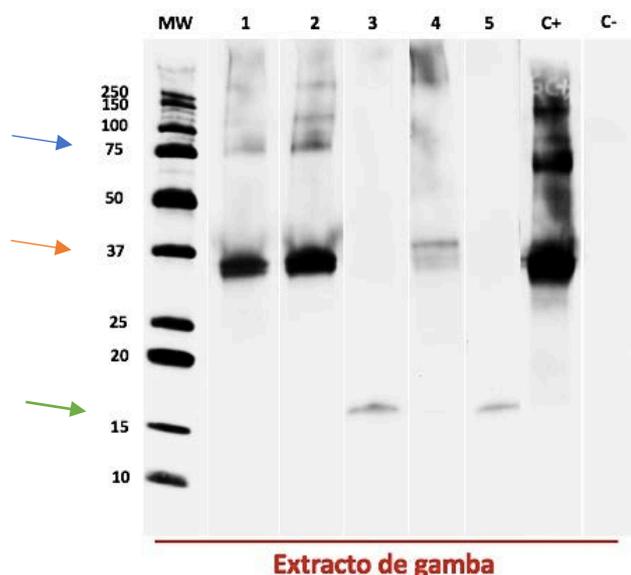


Figura 14. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME⁺DPT⁺ frente a extracto de gamba.

MW: peso molecular. Carriles (C) 1: suero de paciente 10. 2: suero de paciente 30. 3: suero de paciente 35. 4: suero de paciente 39. 5: suero de paciente 41. C+ control positivo. C- control negativo.

RESULTADOS

Al enfrentar los sueros a extracto ácaro (Figura 15) los pacientes presentaron IgE específicas a proteínas de 15 kDa (línea negra), 20-22 kDa (línea verde), 25 kDa (línea naranja) y 55 kDa (línea azul).

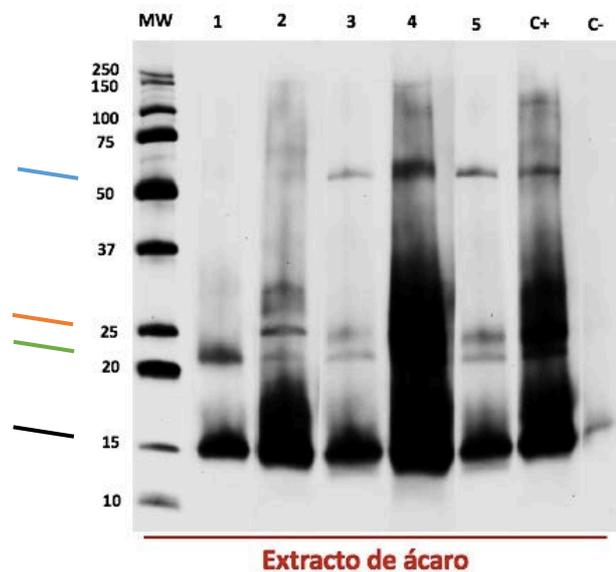


Figura 15. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME⁺DPT⁺ frente a extracto de ácaro. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 10. 2: suero de paciente 30. 3: suero de paciente 35. 4: suero de paciente 39. 5: suero de paciente 41. C+ control positivo. C- control negativo.

4.6.2. Grupo SME⁺DPT⁻

En el resultado del inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁺DPT⁻ se observó reconocimiento únicamente frente a extracto de gamba, y se reconocen proteínas de 36-37 kDa (flecha naranja), 28-30 kDa (flecha negra) y de 70-75 kDa (flecha azul) (Figura 16).

RESULTADOS

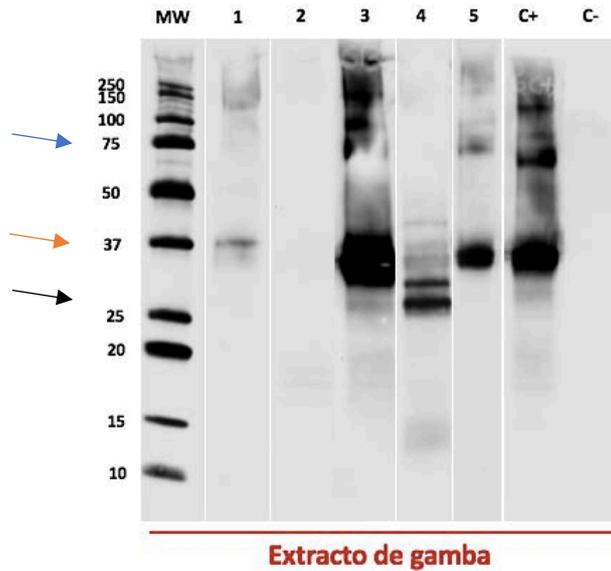


Figura 16. Inmunoblot: Perfil alergénico del grupo SME⁺DPT⁻ frente a extracto de gamba. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 3. 2: suero de paciente 7. 3: suero de paciente 32. 4: suero de paciente 53. 5: suero de paciente 59. C+ control positivo. C- control negativo.

Los pacientes del grupo SME⁺DPT⁻ no presentaron IgE específica a ninguna proteína al enfrentarlos a extracto de ácaros (Figura 17).

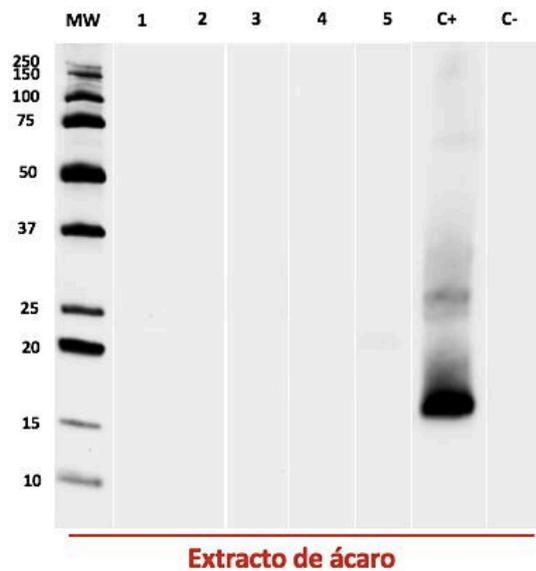


Figura 17. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME⁺DPT⁻ frente a extracto de ácaro. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 3. 2: suero de paciente 7. 3: suero de paciente 32. 4: suero de paciente 53. 5: suero de paciente 59. C+ control positivo. C- control negativo.

RESULTADOS

4.6.3. Grupo SME-DPT⁺

En el inmunoblot de los pacientes del grupo SME-DPT⁺ hubo reconocimiento únicamente en la exposición frente a ácaros (Figura 18).

Se reconocen las proteínas de tamaños 15 kDa (línea negra), 25 kDa (línea naranja), 55 kDa (línea roja), 70 kDa (línea morada), 85-90 kDa (línea azul) y 110 kDa (línea fucsia).

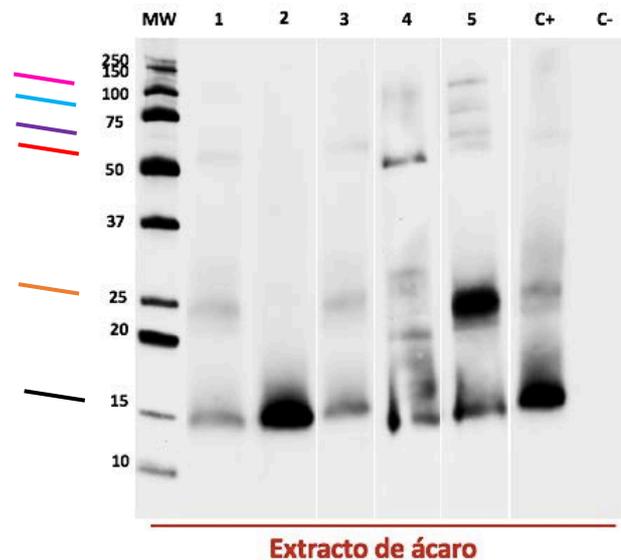


Figura 18. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME-DPT⁺ frente a extracto de ácaro. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 13. 2: suero de paciente 17. 3: suero de paciente 42. 4: suero de paciente 44. 5: suero de paciente 56. C+ control positivo. C- control negativo.

Los pacientes del grupo SME-DPT⁺ no mostraron reconocimiento de proteínas al enfrentarlos a extracto de gamba (Figura 19).

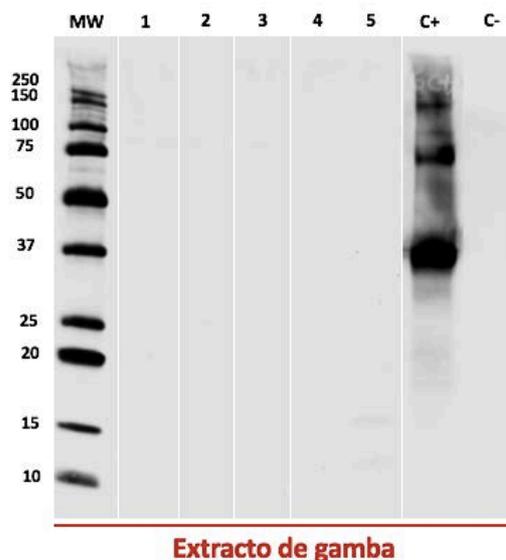


Figura 19. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME-DPT⁺ frente a extracto de gamba. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 13. 2: suero de paciente 17. 3: suero de paciente 42. 4: suero de paciente 44. 5: suero de paciente 56. C+ control positivo. C- control negativo.

4.6.4. Grupo SME⁻DPT⁻

En el inmunoblot del grupo SME⁻DPT⁻ no se reconocieron proteínas ni frente a gamba ni frente a ácaro. (Figura 20)

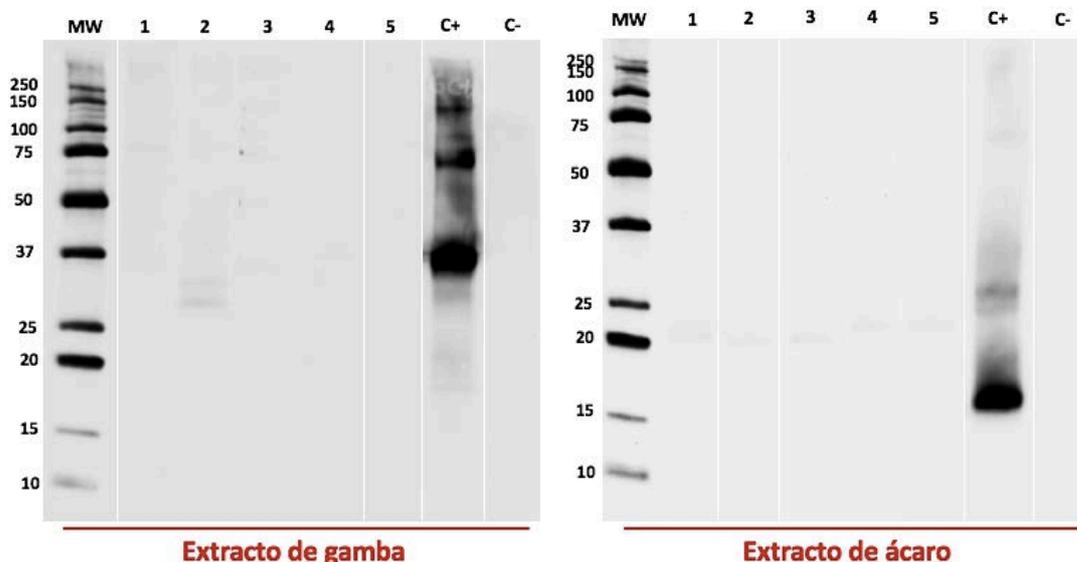


Figura 20. Inmunoblot: Perfil alergénico grupo SME⁻DPT⁻ frente a extracto de gamba y frente a extracto de ácaro. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 1. 2: suero de paciente 6. 3: suero de paciente 22. 4: suero de paciente 36. 5: suero de paciente 37. C+ control positivo. C- control negativo.

4.7. Análisis de reactividad cruzada entre gamba y ácaros

Para el análisis de la reactividad cruzada se utilizaron los mismos grupos que para el análisis de los perfiles proteicos: SME⁺DPT⁺, SME⁺DPT⁻ y SME⁻DPT⁺, y se realizaron ensayos ELISA de competición e Inmunoblots de inhibición.

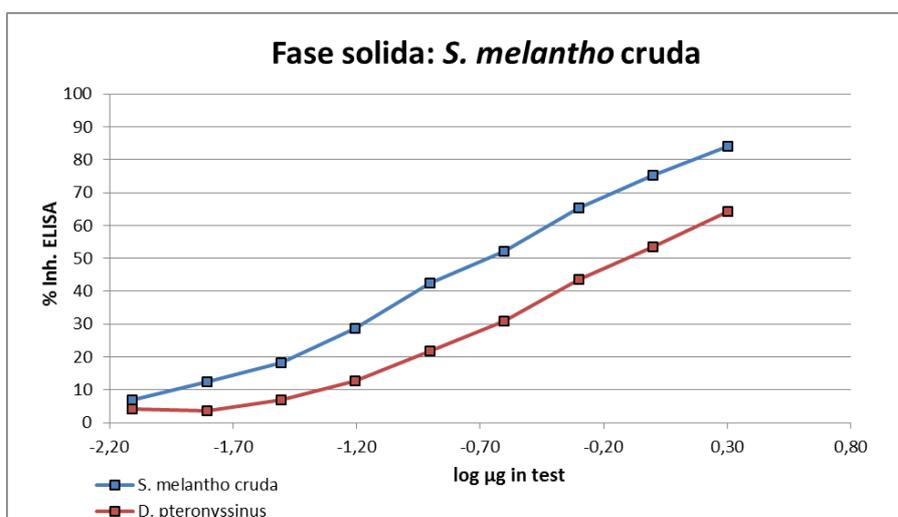
4.7.1 ELISA de competición

Se realizaron diferentes ensayos ELISA de competición, utilizando *S. melantho* cruda (SME) o *D. pteronyssinus* (DPT) como fase sólida y como competidores. Como fase sólida se utilizó SME en los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁺DPT⁻, y DPT en los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁻DPT⁺.

4.7.1.1. Grupo SME⁺DPT⁺ con fase sólida *S. melantho* cruda

A medida que aumentaba la concentración de competidor SME, mayor era la inhibición en el ELISA (línea azul). Al aumentar la concentración del competidor DPT también se producía inhibición en el ELISA, pero para inhibir el 50% de las uniones IgE se necesitaba una concentración 4.55 veces mayor de competidor (50% inhibición: 0.923 vs 0.203 μg) (Figura 21).

Pool SME⁺ DPT⁺ (dilución 1/4)



Competidor	50% Inhibición (μg)	R ²
<i>S. melantho</i> cruda	0,203	0,995
<i>D. pteronyssinus</i>	0,923	

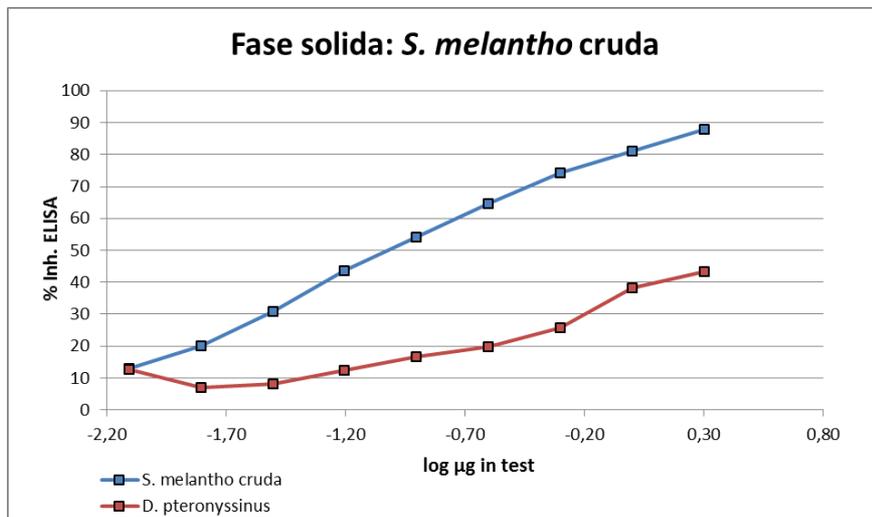
Figura 21. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME⁺DPT⁺ con fase sólida *S. melantho* cruda. R²: coeficiente de regresión lineal.

RESULTADOS

4.7.1.2. Grupo SME⁺DPT⁻ con fase sólida *S. melantho* cruda

A medida que aumentaba la concentración de competidor SME, mayor era la inhibición en el ELISA (línea azul). La línea roja muestra como al aumentar la concentración del competidor DPT también se producía inhibición en el ELISA, pero para inhibir el 50% de las uniones IgE se necesitaba una concentración 138 veces mayor de competidor (50% inhibición: 14.910 vs 0.108 µg; línea roja) (Figura 22).

Pool SME⁺ DPT⁻ (dilución 1/10)



Competidor	50% Inhibición (µg)	R2
<i>S. melantho</i> cruda	0,108	0,996
<i>D. pteronyssinus</i>	14,910	

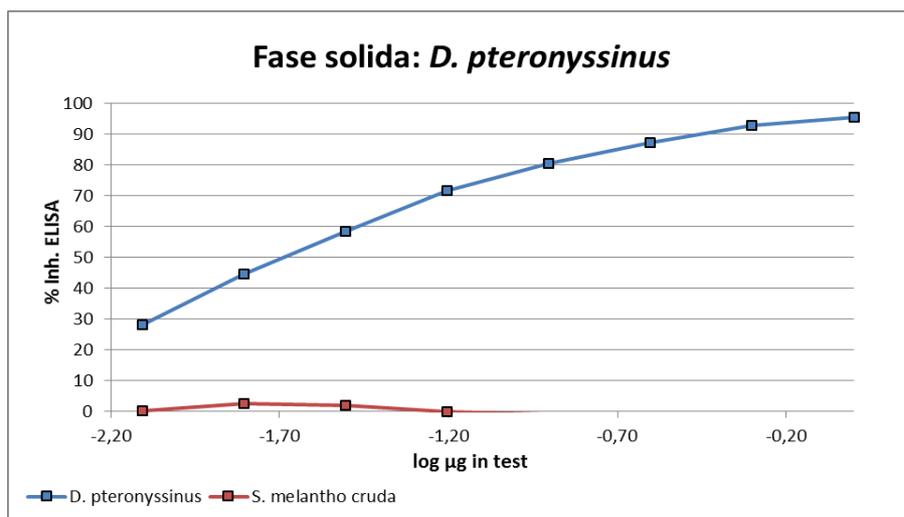
Figura 22. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME⁺DPT⁻ con fase sólida *S. melantho* cruda. R²: coeficiente de regresión lineal.

RESULTADOS

4.7.1.3. Grupo SME⁺DPT⁺ con fase sólida *D. pteronyssinus*

A medida que aumentaba la concentración del competidor DPT, mayor era la inhibición en el ELISA (línea azul). El competidor SME no inhibía la unión de IgE específica al ácaro (línea roja) (Figura 23).

Pool SME⁺ DPT⁺ (dilución 1/6)



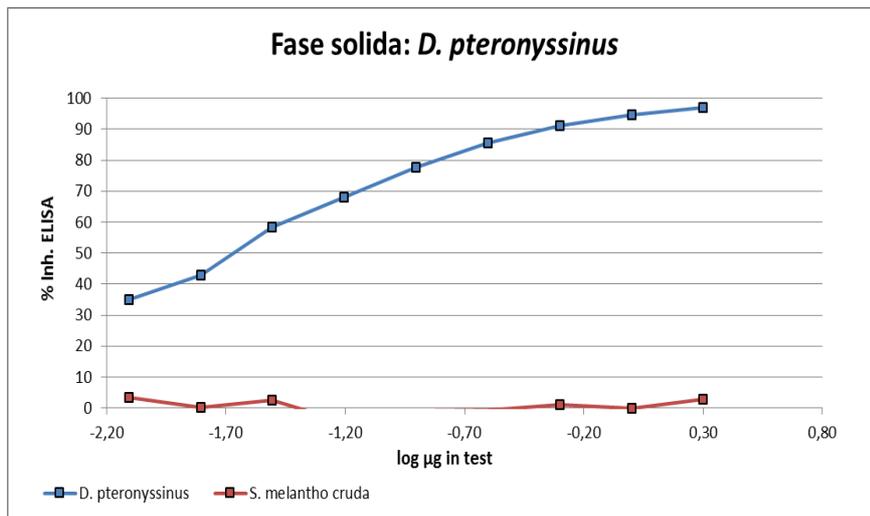
Competidor	50% Inhibición (μg)	R2
<i>D. pteronyssinus</i>	0,020	0,960
<i>S. melantho cruda</i>	ND	

Figura 23. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME⁺DPT⁺ con fase sólida *D. pteronyssinus*. R²: coeficiente de regresión lineal.

4.7.1.4. Grupo SME⁻DPT⁺ con fase sólida *D. pteronyssinus*

A medida que aumentaba la concentración del competidor DPT, mayor era la inhibición en el ELISA (línea azul). El competidor SME no inhibía la unión de IgE específica al ácaro (línea roja). (Figura 24).

Pool SME⁻ DPT⁺ (dilución 1/6)



Competidor	50% Inhibición (µg)	R2
<i>D. pteronyssinus</i>	0,019	0,976
<i>S. melantho cruda</i>	ND	

Figura 24. Análisis de reactividad cruzada en el grupo SME⁻DPT⁺ con fase sólida *D. pteronyssinus*. R²: coeficiente de regresión lineal.

4.7.2. Inmunoblots de inhibición

Para analizar la unión IgE a proteínas de extracto de gamba se realizaron inmunoblots de inhibición en pacientes con IgE positiva a gamba y a ácaros (SME⁺DPT⁺) y en pacientes con IgE específica a gamba pero no a ácaros (SME⁺DPT⁻).

4.7.2.1. Grupo SME⁺DPT⁺

En el inmunoblot del grupo SME⁺DPT⁺ sin fase previa de inhibición se reconocieron proteínas 36 kDa (flecha naranja), 17 kDa (flecha verde), 75 kDa (flecha azul) y de 110 kDa (flecha fucsia). A realizar el inmunoblot de inhibición con la etapa previa de competidor DPT no se modificó el resultado (Figura 25).

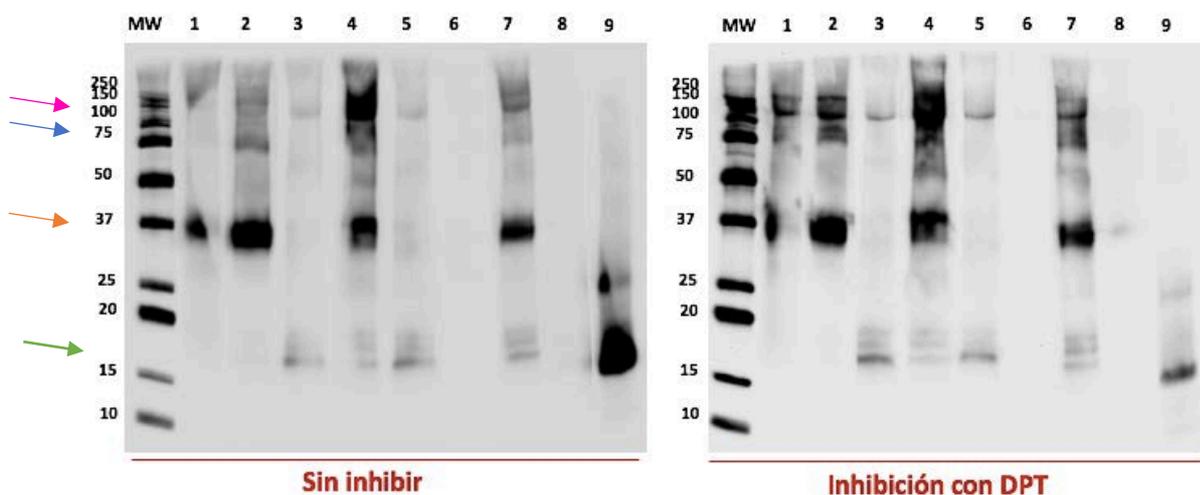


Figura 25. Inmunoblot de inhibición: Perfil alergénico del grupo SME⁺DPT⁺ frente a extracto de gamba. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 10. 2: suero de paciente 30. 3: suero de paciente 35. 4: suero de paciente 39. 5: suero de paciente 41. 6: control negativo 1 (mezcla de sueros SME⁻DPT⁻). 7: mezcla de sueros SME⁺DPT⁺. 8: control negativo 2 (mezcla de sueros SME⁺DPT⁺ sin extracto). 9: control positivo (mezcla de sueros SME⁻DPT⁻ con extracto DPT).

RESULTADOS

4.7.2.2. Grupo SME⁺DPT⁻

En el inmunoblot del grupo SME⁺DPT⁻ sin fase previa de inhibición (Figura 26) se reconocen proteínas de 36-37 kDa (flecha naranja), 28-30 kDa (flecha negra), 70-75 kDa (flecha azul) y 150 kDa (flecha en verde claro). Realizando el inmunoblot de inhibición con la etapa previa de competidor DPT se obtuvo el mismo resultado.

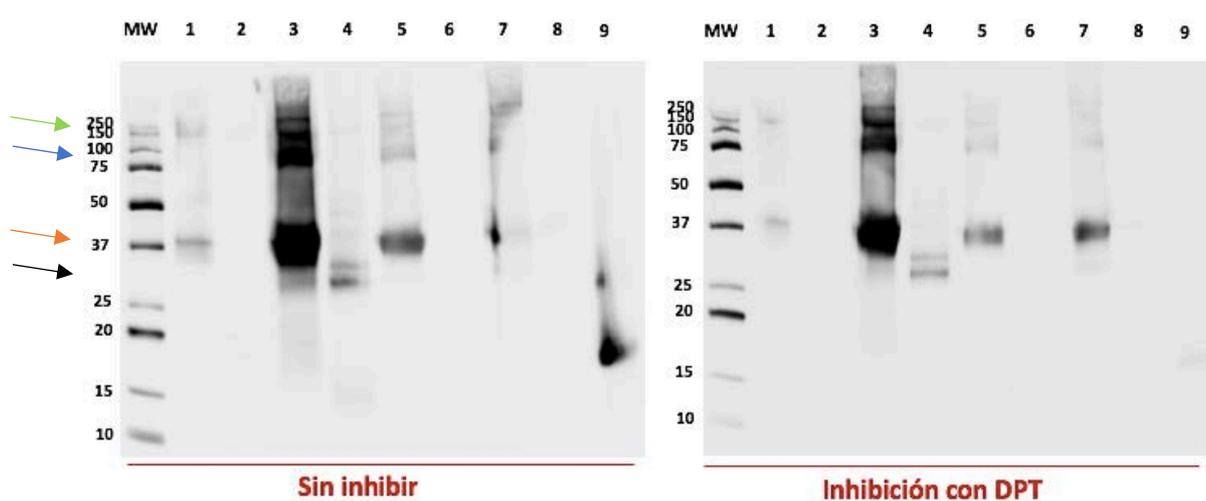


Figura 26. Inmunoblot de inhibición: Perfil alérgico del grupo SME⁺DPT⁻ frente a extracto de gamba. MW: peso molecular. 1: suero de paciente 3. 2: suero de paciente 7. 3: suero de paciente 32. 4: suero de paciente 53. 5: suero de paciente 59. 6: control negativo 1 (mezcla de sueros SME⁻DPT⁻). 7: mezcla de sueros SME⁺DPT⁻. 8: control negativo 2 (mezcla de sueros SME⁺DPT⁻ sin extracto). 9: control positivo (mezcla de sueros SME⁻DPT⁺ con extracto DPT).

5. Discusión

La alergia es una enfermedad compleja que ha presentado un aumento progresivo de su incidencia en los países desarrollados ¹⁷⁸. En las últimas décadas se ha producido un aumento notable de la patología respiratoria y cutánea, pero además, la prevalencia de la alergia a alimentos se ha incrementado rápidamente desde hace unos años ¹⁷⁸. Entre los alimentos más frecuentemente implicados destaca la alergia a marisco, cuya prevalencia mundial aproximada es del 5.4% ²⁶.

En nuestro estudio hemos incluido una cantidad elevada de pacientes comparados con otros trabajos, que generalmente no superan los 70 pacientes ^{84,121,291}. Esto nos permite aumentar la potencia estadística y mejorar el conocimiento sobre la alergia a gamba. Durante todo el estudio se han empleado unos criterios clínicos muy estrictos para la identificación de los diferentes tipos de reacciones. Nuestra muestra está formada únicamente por adultos, lo que limita las conclusiones a esta población.

5.1. Problemas en el diagnóstico de la alergia a gamba

La alergia a alimentos supone un desafío para los alergólogos ²⁴⁹. Las primeras pruebas complementarias que se suelen realizar en el estudio de alergia son las pruebas cutáneas intrapídicas, pero presentan una baja especificidad para diagnosticar la alergia a alimentos. En nuestro trabajo, el uso de los extractos comerciales a gamba y extractos preparados específicamente para la realización de estas pruebas, han generado resultados dispares. En el mejor caso las positividades cutáneas sólo alcanzaron el 62.5% (*P.stylifera*), pero a veces las positividades eran aún menores. Resultados parecidos se habían reflejado previamente, al comparar los resultados con 5 extractos comerciales diferentes en pacientes alérgicos a gamba, obteniendo reacciones cutáneas muy poco homogéneas ²⁵¹.

Ante la baja utilidad de las pruebas cutáneas intraepidérmicas para el diagnóstico, se estudió el rendimiento diagnóstico de las determinaciones de IgE específicas a gamba y a Pen a 1. Entre los alérgicos a gamba, el 89.6% tenían IgE positiva a gamba y el 28.6% tenían IgE positiva a Pen a 1. Este dato difiere del que se ha encontrado en otras poblaciones, donde el porcentaje de pacientes alérgicos a gamba que presentan además IgE específica a tropomiosina suele ser muy elevado, como ocurre en Madrid, en cuya población se ha descrito que entre el 78% ¹⁰³ y el 98% ⁸⁵ de pacientes alérgicos a gambas presentan IgE específica a tropomiosina.

DISCUSIÓN

Las determinaciones de IgE específica a Pen a 1 de nuestros pacientes que habían tenido anafilaxia no mostraron diferencias significativas frente al resto de síntomas. De hecho, el 60% no reconocían Pen a 1. Este último dato se había sugerido previamente en otro estudio mediterráneo, en el que observaban una baja reactividad IgE frente a tropomiosina, y alta para otros alérgenos ¹⁸⁷. Pero en cambio, difiere de los datos que se han publicado de pacientes de Galicia, una zona que comparte con Barcelona una elevada presión ambiental a ácaros del polvo doméstico ²⁶¹, donde los individuos con reacciones alérgicas graves por ingesta de gamba tienen determinaciones de IgE específica a Pen a 1 mayores que los que presentan reacciones leves, y por esta razón se considera un marcador de gravedad clínica, conclusión que no se puede extraer de nuestra población.

En la búsqueda de pruebas para mejorar el diagnóstico de alergia a gamba, realizamos determinaciones de IgE específica a los extractos preparados especialmente para este estudio, pero tras el análisis de los 117 pacientes incluidos, los valores obtenidos no eran capaces de discriminar entre pacientes tolerantes y alérgicos en función de la presentación clínica. El extracto *S. melantho* cruda fue el más reconocido por el total de pacientes (35.9%), y por el total de pacientes alérgicos (39.4%). Además de obtener el valor numérico más alto por densidad óptica medida por absorbancia, era a su vez el que presentaba mejor correlación con el resto de extractos de forma global, por lo que se eligió a *S. melantho* cruda (SME) para realizar el resto de ensayos.

En este estudio se ha incluido un número elevado de pacientes adultos de la misma ciudad, todos con sensibilización cutánea positiva a extracto comercial de gamba, y con diversas manifestaciones clínicas, desde anafilaxia hasta tolerancia al alimento. Tras el análisis de los datos y considerando todos los puntos comentados previamente, podemos afirmar que, ni la medida de IgE específica mediante UNICAP ni las lecturas de los ELISA de los extractos preparados, nos sirven para diferenciar a nuestros pacientes sensibilizados en alérgicos o tolerantes. Desde nuestro punto de vista, actualmente el diagnóstico de alergia a gamba no está completamente resuelto, y será necesario encontrar pruebas complementarias que nos permitan mejorarlo.

5.2. Relación entre ácaros y gambas

Múltiples estudios han valorado la existencia de una relación estrecha entre algunas proteínas de ácaros y gambas, y se ha apuntado que esta asociación podría influir en el desarrollo de la sensibilización frente a ellos ^{23,87,147,163–169}. En estos trabajos se enfatiza que el perfil de sensibilización de alergia a gambas de la población puede variar en función del clima y la exposición a ácaros que presente ¹⁰³. Hasta ahora, en España se han estudiado con detenimiento las características de la población de Madrid y Galicia ¹⁰³, pero no se había estudiado a la población residente en Barcelona, por lo que creemos que era fundamental estudiar el comportamiento de los pacientes con alergia a ácaros y gamba de nuestra región geográfica.

Tras la entrevista clínica y las pruebas intraepidérmicas con extracto comercial de ácaro, establecimos que la mayoría de los pacientes alérgicos a gamba eran también alérgicos a ácaros del polvo (73.7%). Entre los alérgicos a ácaros, el 90.4% tenían IgE específica positiva a gamba, pero sin diferencias estadísticamente significativas frente a los no alérgicos. A pesar de este elevado porcentaje de solapamiento, al medir la IgE específica por absorbancia sólo una tercera parte de los pacientes alérgicos a gamba mostraban positividad a los extractos de ácaros preparados expresamente para este trabajo.

Datos previos de otros trabajos habían establecido cierta correlación entre la ausencia de reactividad cruzada y la positividad a Pen a 1 medida por UniCAPTM, proponiendo un punto de corte en la determinación de Pen a 1 que ayudaría en el diagnóstico de los pacientes con alergia a gamba no sensibilizados a ácaros ¹⁶⁹. Sin embargo, en nuestra población la alergia a gamba y la alergia a ácaros no se relacionaron con la positividad a IgE específica de gamba, ni con la positividad a IgE específica de Pen a 1. De hecho, el valor más elevado de Pen a 1 obtenido por UniCAPTM era de un paciente tolerante a gamba y alérgico a ácaros.

5.2.1. Identificación de proteínas comunes en ácaros y gambas

Para determinar la presencia de proteínas comunes en ácaros y gambas estudiamos las características de los extractos que se habían preparado para el estudio.

Se analizaron mediante espectrometría de masas y las proteínas obtenidas se contrastaron con la bases de alérgenos *Allergome* ²⁸⁸ y de WHO/UIS ¹¹. Se identificaron varias proteínas comunes en los dos extractos, que podrían ayudar a comprender la

DISCUSIÓN

reactividad cruzada entre gambas y ácaros *Dermatophagoides*, entre las que destacaban la Tropomiosina, Paramiosina, Arginina quinasa, Triosa-fosfato isomerasa y Proteína de choque térmico.

Adicionalmente, en el extracto de *S. melantho* cruda también se identificaron la Proteína sarcoplásmica de unión a calcio, Cadenas ligeras de la miosina, Troponina C y Troponina I, todas ellas consideradas alérgenos de gamba ²⁹².

Para identificar el perfil proteico y alergénico de los pacientes, se realizaron inmunoblots con los sueros de los grupos SME⁺DPT⁺, SME⁺DPT⁻, SME⁻DPT⁺ y SME⁻DPT⁻, con extracto de gamba (SME) y de ácaro (DPT) para 5 pacientes de cada grupo descrito.

En el inmunoblot con los sueros procedentes de los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁺DPT⁻ frente a gamba (Figuras 14 y 16), se reconocieron proteínas de tamaño similar, destacando en ambos la de peso equivalente a 36 kDa que corresponde a tropomiosina, y la de 75 kDa que corresponde a hemocianina. Simultáneamente, en el inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁺DPT⁺ frente a extracto de gamba (Figura 14) se observó el reconocimiento a proteínas de tamaño coincidente con el de la cadena ligera de la miosina (17 kDa), mientras que en el inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁺DPT⁻ frente a extracto de gamba (Figura 16) destaca el reconocimiento de una proteína de 28-30 kDa que corresponde al peso molecular de la troponina y la triosa fosfato isomerasa.

En el inmunoblot con los sueros procedentes de los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁻DPT⁺ frente a ácaros (Figuras 15 y 18, respectivamente) se observa un gran reconocimiento de proteínas. En común se distinguen reconocimientos a proteínas de 15 kDa, que coincide con el peso molecular de las proteínas del grupo 2, de 25 kDa que podría corresponder con diversas proteínas (como Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 13 o Der p 23), y de 55 kDa, correspondiente a amilasa.

Al mismo tiempo, en el inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁺DPT⁺ frente a extracto de ácaro (Figura 15) se observó un reconocimiento a proteínas de 20-22 kDa (corresponden a proteínas del grupo 22). Por su lado, en el inmunoblot de los pacientes del grupo SME⁻DPT⁺ frente a extracto de ácaro (Figura 18) se reconocen proteínas de alto peso molecular (quitinasa, paramiosina).

En los todos ensayos con los sueros de pacientes DPT⁺ frente a ácaros se identificaron proteínas correspondientes a 15 kDa (Figuras 15 y 19), pero no se identificaron proteínas de peso molecular alrededor de 36 kDa.

5.2.2. Reactividad cruzada entre gamba y ácaros

En los ensayos ELISA de inhibición realizados en los grupos SME⁺DPT⁺ y SME⁺DPT⁻, con fase sólida *S. melantho* cruda (Figuras 21 y 22) se observó que la inhibición de las uniones IgE era mayor cuanto mayor era la concentración de competidor SME. Cuando el competidor era DPT, también se detectó que el ácaro inhibía la unión de la IgE específica a la gamba, lo que confirmó que ácaros y gambas comparten proteínas comunes. Ahora bien, en el grupo SME⁺DPT⁺ la concentración de competidor DPT debía ser mucho mayor para inhibir las mismas uniones, lo que indica que tenía una afinidad menor para *S. melantho* cruda.

Analizando en conjunto los resultados obtenidos de los sueros SME⁺DPT⁺, ya fuera en fase sólida *S. melantho* cruda o fase sólida *D. pteronyssinus* (Figuras 21 y 23), se pudo concluir que existen proteínas de los sueros que se unen a DPT y a SME, pero siendo mucho más afines a DPT, de lo que se dedujo que probablemente el sensibilizador primario eran los ácaros.

Los sueros SME⁺DPT⁻ en fase sólida *S. melantho* cruda (Figura 22), a pesar de ser intrínsecamente negativos a DPT, también respondían frente al competidor DPT, aunque en menor medida que la de los sueros SME⁺DPT⁺. Este comportamiento indicaba la existencia de proteínas de los sueros que se unían a DPT y a SME, y por ende, que los pacientes con sensibilización a gamba sí presentan reactividad cruzada con ácaros.

En el ensayo opuesto, realizado con los sueros SME⁻DPT⁺ en fase sólida *D. pteronyssinus* (Figura 24), se observó la falta de reacción frente al competidor SME. Este resultado indicó que el extracto de gamba no inhibía la unión específica al ácaro, y por lo tanto, los pacientes únicamente sensibilizados a ácaros no presentaban reactividad cruzada con la gamba.

Para analizar la unión IgE a proteínas de extracto de gamba se realizaron inmunoblots de inhibición en pacientes SME⁺DPT⁺ y SME⁺DPT⁻. En ninguno de los dos grupos la inhibición con DPT alteró el reconocimiento de proteínas de los sueros, por lo que no nos aportaba información sobre los alérgenos que pudieran estar implicados en la reacción. Sería preciso aumentar el número de ensayos para obtener conclusiones.

5.2.3. Relación entre los diferentes patrones de sensibilización y la clínica

Por último, se quiso valorar si los resultados obtenidos en los análisis anteriores se podían utilizar para poder relacionarlos con manifestaciones clínicas concretas, pero no se demostró que hubiera un patrón de reconocimiento de proteínas específico con unas manifestaciones clínicas concretas.

Por ejemplo, en el grupo SME⁺DPT⁺ los pacientes cuyos sueros correspondían a los carriles 4 y 5 presentaron perfiles muy distintos de inmunoblot, pero ambos pacientes tenían IgE específicas positivas a gamba (11.3 KUA/L y 3.35 KUA/L respectivamente), IgE negativas a Pen a 1, y ambos referían tolerar la ingesta de gambas (Figuras 14 y 15). En el carril 1 del grupo SME⁺DPT⁻ se analizó el suero de un paciente que había presentado múltiples anafilaxias, y reconocía una proteína que por tamaño correspondía a la tropomiosina. En el estudio analítico presentaba determinación de IgE positiva a gamba (2.11) pero negativa a Pen a 1 (Figura 16).

El paciente correspondiente al carril 3 del grupo SME⁺DPT⁻ refería tolerancia a la ingesta de gamba y en el patrón de inmunoblot de su suero se apreciaba reconocimiento a una proteína de 36-38 kDa, probablemente la tropomiosina. En el estudio analítico presentaba valores elevados de IgE específica a gamba (30.9 KUA/L) y a Pen a 1 (24.2 KUA/L) (Figura 16). El inmunoblot de su suero era prácticamente idéntico al del paciente del carril 4 del grupo SME⁺DPT⁺, que refería tolerancia habitual a la ingesta de gamba, y tenía valores de IgE específica a gamba positivos (11.3 KUA/L), pero negativos a Pen a 1 (Figura 14).

5.3. Relevancia clínica

Este es el primer estudio realizado en nuestra zona que describe la existencia de reactividad cruzada entre ácaros y gambas, y que determina que el responsable de la sensibilización primaria son los ácaros.

Clásicamente, se ha atribuido la responsabilidad de la reactividad cruzada entre ácaros y gambas a la tropomiosina^{55,152}, pero a la luz de los datos obtenidos en nuestro estudio, y en consonancia con otros trabajos realizados en esta dirección^{164,171-173}, parece que, en poblaciones con elevada presión ambiental de ácaros, el papel de la tropomiosina puede estar limitado, mientras que otros alérgenos adquieren relevancia en esta relación, definiendo un patrón más selectivo de alergia alimentaria.

5.4. Limitaciones del estudio

En nuestro estudio no realizamos pruebas de provocación oral, pero los criterios clínicos para agrupar a los pacientes por síntomas eran muy estrictos, y se ha descrito que de esta manera es muy poco probable que suponga un sesgo ¹⁸⁷. A pesar de que se considera que las pruebas de provocación oral son el patrón oro de diagnóstico de la alergia alimentaria, también tienen sus limitaciones en cuanto a validez diagnóstica. Sabemos que la dosis de proteína umbral (ED_{10}) es cien veces mayor para la gamba que para otros alimentos ²⁶⁵. Ahora bien, por un lado, está descrito que los cofactores pueden estar implicados hasta en el 40% de las reacciones, y que actúan disminuyendo el umbral de tolerancia al alimento; y por otro, los alérgenos pueden modificarse según el cocinado. Ante una prueba de provocación negativa podemos concluir que un paciente tolera el alimento a pesar de estar sensibilizado, y exponerlo a un riesgo de reacción ²³².

5.5. Líneas de futuro

El siguiente paso será la realización de ensayos dot-blot para describir los alergogramas de nuestros pacientes. Es posible que en nuestra zona participe la ubiquitina como alérgeno relevante para la reactividad cruzada, como ocurre en zonas de clima atlántico con elevada presión ambiental de ácaros y gran consumo de marisco ¹⁰³.

6. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado la existencia de reactividad cruzada entre los ácaros del polvo doméstico y la gamba en nuestra población.
2. En nuestra población el responsable de la sensibilización primaria son los ácaros del polvo doméstico.
3. En los extractos de ácaros del polvo doméstico y de gamba estudiados se han hallado proteínas comunes que podrían justificar la reactividad cruzada entre ambos.
4. En nuestra población las pruebas cutáneas intrapidérmicas a los extractos testados y la determinación de IgE específica a gamba y a Pen a 1, no son capaces de discriminar a los pacientes alérgicos a gamba de los no alérgicos.
5. Ninguna de las variables estudiadas se asocia a manifestaciones clínicas determinadas.

7. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2018;14((Suppl 2): 49).
2. Turvey SE, Broide DH. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S24-S32.
3. Labrador M, Martínez L. *Compendio Iconográfico de Inmunología.* Mataró: MRA Ediciones; 2005.
4. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2):33-40.
5. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;Feb(2 Suppl2):S73-S80.
6. Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med.* 2003;139(8):683-693.
7. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:228-238.
8. Lin J, Sampson HA. The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9(4):357-363.
9. Nowak-Węgrzyn A, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9(3):234-237.
10. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol Int.* 2015;64(4):332-343.
11. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page. <http://www.allergen.org/>. Accessed September 11, 2018.
12. Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TAE. Allergen Nomenclature. *Bull World Health Organ.* 1986;64(5):767-770.
13. Waserman S, Bégin P, Watson W. IgE-mediated food allergy. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2018;14((Suppl 2): 55).
14. Pouessel G, Turner PJ, Worm M, et al. Food-induced fatal anaphylaxis: from epidemiological data to general prevention strategies. *Clin Exp Allergy.* 2018.
15. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy.* 2014;69(8):1008-1025.
16. Cummings AJ, Knibb RC, King RM, Lucas JS. The psychosocial impact of food allergy and food hypersensitivity in children, adolescents and their families: A review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2010;65(8):933-945.
17. Feng C, Kim J-H. Beyond Avoidance: the Psychosocial Impact of Food Allergies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;Sept.
18. Lieberman JA, Weiss C, Furlong TJ, Sicherer M, Sicherer SH. Bullying among pediatric patients with food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010;105(4):282-286.
19. Polloni L, Gini G, Fiore G, et al. Bullying risk in students with food allergy: Schoolteachers' awareness. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(2):225-226.
20. Muraro A, Polloni L, Lazzarotto F, et al. Comparison of bullying of food-allergic versus healthy schoolchildren in Italy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):749-751.
21. Catalogue of Life. <http://www.catalogueoflife.org/>. Accessed August 24, 2018.
22. Ruethers T, Taki AC, Johnston EB, et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Mol Immunol.* 2018;100(Aug):28-57.
23. Popescu F-D. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol.* 2015;5(2):31.
24. Informe de consumo de alimentación en España 2017. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/>. Accessed October 6, 2018.
25. Moonesinghe H, Mackenzie H, Venter C, et al. Prevalence of fish and shellfish allergy: A systematic review. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2016;117(3):264-272.e4.
26. Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, Van Ree R, Lidholm J. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: A EuroPrevall analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2010;65(9):1182-1188.
27. McGowan EC, Peng R, Salo PM, Zeldin DC, Keet CA. Changes in Food-specific IgE Over Time in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4(4):713.
28. Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(1):159-165.

BIBLIOGRAFÍA

29. Ben-Shoshan M, Harrington DW, Soller L, et al. A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(6):1327-1335.
30. Domínguez-García MV, Flores-Merino M V, Puente-Fernández C, Morales-Romero J, Bedolla-Barajas M. Self-reported prevalence of clinical features of allergy to nuts and seeds , and seafood in university students. *Asia Pac Allergy.* 2018;8(2):1-9.
31. Shek LP-C, Cabrera-Morales EA, Soh SE, et al. A population-based questionnaire survey on the prevalence of peanut, tree nut, and shellfish allergy in 2 Asian populations. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(2):324-331.e7.
32. Leung TF, Yung E, Wong YS, Lam CWK, Wong GWK. Parent-reported adverse food reactions in Hong Kong Chinese pre-schoolers: Epidemiology, clinical spectrum and risk factors. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(4):339-346.
33. Ho MHK, Lee SL, Wong WHS, Patrick IP, Lau YL. Prevalence of self-reported food allergy in Hong Kong children and teens -a population survey. *Asian Pacific J Allergy Immunol.* 2012;30(4):275-284.
34. Mahesh PA, Wong GWK, Ogorodova L, et al. Prevalence of food sensitization and probable food allergy among adults in India: The EuroPrevall INCO study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2016;71(7):1010-1019.
35. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A. Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(8):992-1007.
36. Burney PGJ, Potts J, Kummeling I, et al. The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(3):365-371.
37. Rico M. Estudio de alergia al marisco en el área sanitaria de A Coruña. *Tesis M Rico.* 2006.
38. Sánchez-López J, Gázquez V, Rubira N, et al. Food allergy in Catalonia: Clinical manifestations and its association with airborne allergens. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017;45(1):48-54.
39. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel J, Chivato T, investigators participating in the National Survey of the Spanish Society of Allergology and Clinical Immunology Alergológica 2015. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(3):151-164.
40. Hoffman DR, Day EDJ, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy.* 1981;47:17-22.
41. Waring NP, Daul CB, DeShazo RD, McCants B, Lehrer SB. Hypersensitivity Reactions to Ingested Crustacea: Clinical Evaluation and Diagnostic Studies in Shrimp - Sensitive Individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76(3):440-445.
42. Lehrer SB. The complex nature of food antigens: studies of cross-reacting crustacea allergens. *Ann Allergy.* 1986;57(4):267-272.
43. Daul C, Morgan JE, Waring N-P, McCants M, Hughes J, Lehrer SB. Immunologic evaluation of shrimp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;80:716-722.
44. Halmeppuro L, Salvaggio JE, Lehrer SB. Crawfish and lobster allergens: Identification and structural similarities with other crustacea. *Int Arch Allergy Immunol.* 1987;84(2):165-172.
45. Lehrer S, McCants M. Reactivity of IgE antibodies with crustacea and oyster allergens: Evidence for common antigenic structures. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;80:133-139.
46. Nagpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Subba Rao P V. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83:26-36.
47. Morgan JE, Daul CB, Lehrer SB, M E. Characterization of important shrimp allergens by immunoblot analysis. Abstract from "46 Annual Meeting" held in Baltimore, Maryland. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85(1, part 2):170.
48. Daul CB, Morgan JE, Lehrer SB, English M. Production of murine monoclonal (MAb) antibodies to shrimp antigens. Abstract from "46 Annual Meeting" held in Baltimore, Maryland. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85(1, part 2):276.
49. Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. Isolation and characterization of an important 36 KD shrimp allergen. Abstract from "47 Annual Meeting" held in San Francisco, California. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87(1, part 2):192.
50. Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. *Common Crustacea Allergens: Identification of B Cells Epitopes with the Shrimp Specific Monoclonal Antibodies.* (Kraft D, Sehon A, eds.). Boca Ratón, Florida: CRC Press; 1993.
51. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Rao P V. Identification of tropomyosin as

BIBLIOGRAFÍA

- the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J Immunol.* 1993;151(10):5354-5363.
52. Lin R, Shen H-D, Han S-H. Identification and characterization of a 30 kd major allergen from *Parapenaeus fissurus*. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;92:837-845.
 53. Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;105(1):49-55.
 54. Leung PSC, Chu KH, Chow K, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:882-890.
 55. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin : An Invertebrate Pan-Allergen. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;119:247-258.
 56. Oguchi Y, Ishizuka J, Hitchcock-DeGregori S, Ishiwata S, Kawai M. The role of trpomyosin domains in cooperative activation of the actin-myosin interaction. *J Mol Biol.* 2011;414(5):667-680.
 57. Behrmann E, Müller M, Penczek PA, Mannherz HG, Manstein DJ, Raunser S. Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex. *Cell.* 2012;150(2):327-338.
 58. Nevzorov IA, Levitsky DI. Tropomyosin: double helix from the protein world. *Biochem.* 2011;76(13):1507-1527.
 59. Lees-Miller JP, Helfman DM. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays.* 1991;13(9):429-437.
 60. Kamath SD, Rahman AMA, Komoda T, Lopata AL. Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies. *Food Chem.* 2013;141(4):4031-4039.
 61. Kamath SD, Rahman AMA, Voskamp A, et al. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(5):1144-1155.
 62. UniProt. <https://www.uniprot.org/>. Accessed December 2, 2018.
 63. Bardají A. El papel de las troponinas en el diagnóstico y el pronóstico de los síndromes coronarios agudos. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2005;5:19-25.
 64. Liu G-M, Huang Y-Y, Cai Q-F, Weng W-Y, Su W-J, Cao M-J. Comparative study of in vitro digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between Grass prawn (*Penaeus monodon*) and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Soc Chem Ind.* 2011;91:163-170.
 65. Gámez C, Zafra MP, Sanz V, et al. Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin. *Food Chem.* 2015;173:475-481.
 66. Yadzir ZHM, Misnan R, Bakhtiar F, Abdullah N, Murad S. Tropomyosin, the major tropical oyster *Crassostrea belcheri* allergen and effect of cooking on its allergenicity. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2015;11(1):30.
 67. Mohamad Yadzir ZH, Misnan R, Bakhtiar F, Abdullah N, Murad S. Tropomyosin and actin identified as major allergens of the carpet clam (*Paphia textile*) and the effect of cooking on their allergenicity. *Biomed Res Int.* 2015;2015:13-18.
 68. Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, et al. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(5 Pt 1):948-953.
 69. Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1998;7(1):12-20.
 70. Leung PS, Chen YC, Chu KH. Seafood allergy: tropomyosins and beyond. *J Microbiol Immunol Infect.* 1999;32(3):143-154.
 71. Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross- reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:329-337.
 72. Asturias J a, Gómez-Bayón N, Arilla MC, et al. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *J Immunol.* 1999;162(7):4342-4348.
 73. Leung PSC, Chen YC, Gershwin ME, Wong SH, Kwan HS, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(5):847-852.
 74. Jeong KY, Hwang H, Lee J, et al. Allergenic characterization of tropomyosin from the

BIBLIOGRAFÍA

- dusky brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(4):680-685.
75. Jeong KY, Yum H-Y, Lee I-Y, et al. Molecular Cloning and Characterization of Tropomyosin, a Major Allergen of *Chironomus kiiensis*, a Dominant Species of Nonbiting Midges in Korea. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(2):320-324.
 76. Jeong KY, Han IS, Lee JY, Park KH, Lee JH, Park JW. Role of tropomyosin in silkworm allergy. *Mol Med Rep*. 2017;15(5):3264-3270.
 77. Leung PSC, Wing Kuen Chow, Duffey S, Hoi Shan Kwan, Gershwin ME, Ka Hou Chu. IgE reactivity against a cross-reactivity allergen in crustacea and mollusca: Evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(5):954-961.
 78. Mykles DL, Cotton JL, Taniguchi H, Sano K, Maeda Y. Cloning of tropomyosins from lobster (*Homarus americanus*) striated muscles: fast and slow isoforms may be generated from the same transcript. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998;19(2):105-115.
 79. Nakano S, Yoshinuma T, Yamada T. Reactivity of Shrimp Allergy-Related IgE Antibodies to Krill Tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;145:175-181.
 80. López-Matas MA, Iraola V, Moya R, et al. Cloning and characterization of tropomyosin from the mite *Chortoglyphus arcuatus*. *Mol Immunol*. 2015;68(2):634-640.
 81. James JK, Pike DH, Khan IJ, Nanda V. Structural and Dynamic Properties of Allergen and Non-Allergen Forms of Tropomyosin. *Structure*. 2018;26(7):997-1006.e5.
 82. Ayuso R, Lehrer SB, Tanaka L, et al. IgE antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 1999;83(5):399-405.
 83. Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, et al. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1286-1293.e3.
 84. Bauermeister K, Wangorsch A, Perono L, et al. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. *Mol Immunol*. 2011;48(15-16):1983-1992.
 85. Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez M, et al. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy*. 2011;66(10):1375-1383.
 86. Subba Rao P, Rajagopal D, Ganesh K. B- and T-cell epitopes of tropomyosin, the major shrimp allergen. *Allergy*. 1998;53(Suppl 46):44-47.
 87. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: Ige-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(1):38-48.
 88. Leung NYH, Wai CYY, Ho MHK, et al. Screening and identification of mimotopes of the major shrimp allergen tropomyosin using one-bead-one-compound peptide libraries. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(3):308-318.
 89. Ayuso R, Sanchez-Garcia S, Pascal M, et al. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? *Clin Exp Allergy*. 2012;42(2):293-304.
 90. Wai CYY, Leung NYH, Leung PSC, Chu KH. T cell epitope immunotherapy ameliorates allergic responses in a murine model of shrimp allergy. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(3):491-503.
 91. Ravkov E V., Pavlov IY, Martins TB, et al. Identification and validation of shrimp-tropomyosin specific CD4 T cell epitopes. *Hum Immunol*. 2013;74(12):1542-1549.
 92. Abramovitch JB, Kamath S, Varese N, et al. IgE Reactivity of Blue Swimmer Crab (*Portunus pelagicus*) Tropomyosin, Por p 1, and Other Allergens; Cross-Reactivity with Black Tiger Prawn and Effects of Heating. *PLoS One*. 2013;8(6):1-13.
 93. Pascal M, Grishina G, Yang AC, et al. Molecular diagnosis of shrimp allergy: Efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(4):521-529.e10.
 94. Yang AC, Arruda LK, Santos BR, Barbosa MCR, Chapman MD. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:872-878.
 95. Barber D, Arias J, Boquete M, et al. Analysis of mite allergic patients in a diverse territory by improved diagnostic tools. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(7):1129-1138. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.03993.x.
 96. Yu C-J, Lin Y-F, Chiang B-L, Chow L-P. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol*. 2003;170(1):445-453.
 97. García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM,

BIBLIOGRAFÍA

- Sotelo-Mundo RR. Molecular Characterization of Arginine Kinase, an Allergen from the Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144:23-28.
98. Yadzir ZHM, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M, Murad S. Identification of the major allergen of *Macrobrachium rosenbergii* (giant freshwater prawn). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(1):50-54.
 99. Giuffrida MG, Villalta D, Mistrello G, Amato S, Asero R. Shrimp allergy beyond tropomyosin in Italy: Clinical relevance of arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and hemocyanin. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2014;46(5):172-177.
 100. Shen Y, Cao MJ, Cai QF, et al. Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen. *J Sci Food Agric*. 2011;91(7):1326-1335.
 101. Abdel Rahman AM, Kamath SD, Lopata AL, Robinson JJ, Helleur RJ. Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine kinase using tandem mass spectrometry. *J Proteomics*. 2011;74(2):231-241.
 102. Shen H-W, Cao M-J, Cai Q-F, et al. Purification, Cloning, and Immunological Characterization of Arginine Kinase, a Novel Allergen of Octopus fangsiao. *J Agric Food Chem*. 2012;60:2190-2199.
 103. Gámez C, Zafra MP, Boquete M, et al. New shrimp IgE-binding proteins involved in mite-seafood cross-reactivity. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(9):1915-1925.
 104. Brown AE, France RM, Grossman SH. Purification and characterization of arginine kinase from the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol*. 2004;56(2):51-60.
 105. Yan H, Xia L-X, Chen J-J, et al. Cloning, expression and purification of arginine kinase from *Blattella germanica* and its immune activity. *Chinese J Parasitol Parasit Dis*. 2011;29(3):191-194.
 106. Srinroch C, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Phiriyangkul P. Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium* spp. allergens. *Food Chem*. 2015;184:160-166.
 107. Liu Z, Xia L, Wu Y, Xia Q, Chen J, Roux KH. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(1):8-14.
 108. Binder M, Mahler V, Hayek B, et al. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J Immunol*. 2001;167(9):5470-5477.
 109. Xing P, Yu HQ, Li M, et al. Characterization of arginine kinase, a novel allergen of *dermatophagoides farinae* (Der f 20). *Am J Transl Res*. 2015;7(12):2815-2823.
 110. Yang Y, Liu G-Y, Yang H, et al. Crystal structure determination of *Scylla paramamosain* arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates. *Food Chem*. 2019;Jan 15(271):597-605.
 111. Yao C-L, Wu C-G, Xiang J-H, Dong B. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2005;19(4):317-329.
 112. Rosmilah M, Shahnaz M, Zailatul HMY, Noormalin A, Normilah I. Identification of tropomyosin and arginine kinase as major allergens of *Portunus pelagicus* (blue swimming crab). *Trop Biomed*. 2012;29(3):467-478.
 113. Uda K, Fujimoto N, Akiyama Y, et al. Evolution of the arginine kinase gene family. *Comp Biochem Physiol - Part D Genomics Proteomics*. 2006;1(2):209-218.
 114. Chen HL, Mao HY, Cao MJ, et al. Purification, physicochemical and immunological characterization of arginine kinase, an allergen of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chem Toxicol*. 2013;62(September):475-484.
 115. Rosa S, Prates S, Piedade S, Marta C., Pinto J. Are there shrimp allergens exclusive from the cephalothorax? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(1):85-87.
 116. Han F, Wang Z, Wang X. Characterization of myosin light chain in shrimp hemocytic phagocytosis. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;29(5):875-883.
 117. Ayuso R, Grishina G, Ibanez M. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand – type protein identified as a new shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;1(124):114-120.
 118. Grisar T, Lakaye B, de Nijs L, Lo Turco J, Daga A, Delgado-Escueta A. Myoclonin1/EFHC1 in cell division, neuroblast migration, synapse/dendrite formation in

- juvenile myoclonic epilepsy. In: Noebels J, Avoli M, Rogawski M, eds. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th Ed. Bethesda; 2012:1-23.
119. Zhang Y-X, Chen H-L, Maleki SJ, et al. Purification, Characterization, and Analysis of the Allergenic Properties of Myosin Light Chain in *Procambarus clarkii*. *J Agric Food Chem*. 2015;63(27):6271-6282.
 120. Kim BK, Kim KS, Oh C-W, et al. Twelve actin-encoding cDNAs from the American lobster, *Homarus americanus*: Cloning and tissue expression of eight skeletal muscle, one heart, and three cytoplasmic isoforms. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*. 2009;153(2):178-184.
 121. Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;4(122):795-802.
 122. Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, Mita H. Sarcoplasmic Calcium-Binding Protein: Identification as a New Allergen of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146:91-98.
 123. White AJ, Northcutt MJ, Rohrback SE, et al. Characterization of sarcoplasmic calcium binding protein (SCP) variants from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2011;160(1):8-14.
 124. Chen HL, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Mao HY, Liu GM. Purification and characterisation of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chem*. 2013;139(1-4):213-223.
 125. Abdel Rahman AM, Kamath SD, Gagné S, Lopata AL, Helleur R. Comprehensive proteomics approach in characterizing and quantifying allergenic proteins from northern shrimp: Toward better occupational asthma prevention. *J Proteome Res*. 2013;12(2):647-656.
 126. Sheldahl C, Xing J, Dong W, Harvey SC, Cheung HC. The Calcium-Saturated cTnl / cTnC Complex: Structure of the Inhibitory Region of cTnl. *Biophys J*. 2003;84(February):1057-1064.
 127. Tanaka H, Takahashi H, Ojima T. Ca²⁺-binding properties and regulatory roles of lobster troponin C sites II and IV. *FEBS Lett*. 2013;587(16):2612-2616.
 128. Kalyanasundaram A, Santiago TC. Identification and characterization of new allergen troponin C (Pen m 6.0101) from Indian black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Eur Food Res Technol*. 2015;240(3):509-515.
 129. Chao E, Kim HW, Mykles DL. Cloning and tissue expression of eleven troponin-C isoforms in the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2010;157(1):88-101.
 130. Rial Prado MJ, Batolome B, Pastor C, Cuesta J, Parra A. Troponin as a cause of hypersensitivity to barnacle. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(3):194-195.
 131. Hindley J, Wünschmann S, Satinover SM, et al. Bla g 6: A troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(6):1389-1395.
 132. Jeong KY, Kim CR, Un S, et al. Allergenicity of recombinant troponin C from *Tyrophagus putrescentiae*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(3):207-213.
 133. Yang Y, Chen ZW, Hurlburt BK, et al. Identification of triosephosphate isomerase as a novel allergen in *Octopus fangsiao*. *Mol Immunol*. 2017;85:35-46.
 134. Chuang J-G, Su S-N, Chiang B-L, Lee H-J, Chow L-P. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics*. 2010;10(21):3854-3867.
 135. Hoppe S, Steinhart H, Paschke A. Identification of a 28 kDa lychee allergen as a triosephosphate isomerase. *Food Agric Immunol*. 2006;17(1):9-19.
 136. Khanaruksombat S, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Phiriyangkul P. Identification of a novel allergen from muscle and various organs in banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*). *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2014;113(3):301-306.
 137. Piboonpocanun S, Jirapongsananuruk O, Tipayanon T, Boonchoo S, Goodman RE. Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(10):1492-1498.
 138. Lu X, Lu H, Guo L, et al. *Cloning and Characterization of a Novel Hemocyanin Variant LvHMCV4 from Shrimp Litopenaeus Vannamei*. Vol 46.; 2015.
 139. Zhang Y, Zhu L, Li S, et al. Identification of the major allergenic epitopes of Eriocheir sinensis roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses. *Mol Immunol*.

BIBLIOGRAFÍA

- 2016;74:125-132.
140. Khurana T, Collison M, Chew FT, Slater JE. Blat 3: A novel allergen of German cockroach identified using cockroach-specific avian single-chain variable fragment antibody. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2014;112(2):140-145.
 141. Al-Ghoulleh A, Johal R, Sharquie IK, et al. The glycosylation pattern of common allergens: The recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. *PLoS One.* 2012;7(3):1-11.
 142. Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, et al. $\beta(1,2)$ -xylose and $\alpha(1,3)$ -fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11451-11458.
 143. Suzuki M, Kobayashi Y, Hiraki Y, Nakata H, Shiomi K. Paramyosin of the disc abalone *Haliotis discus discus*: Identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin. *Food Chem.* 2011;124(3):921-926.
 144. Suzuki M, Shimizu K, Kobayashi Y, Ishizaki S, Shiomi K. Paramyosin from the disc abalone *Haliotis discus discus*. *J Food Biochem.* 2014;38(4):444-451.
 145. Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, et al. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123(2):120-129.
 146. Lee C-S, Tsai L-C, Chao P-L, et al. Protein sequence analysis of a novel 103-kDa *Dermatophagoides pteronyssinus* mite allergen and prevalence of serum immunoglobulin E reactivity to rDer p 11 in allergic adult patients. *Clin Exp allergy.* 2004;34(3):354-362.
 147. Kamath SD, Lopata AL. IgE reactivity to shrimp allergens in infants and their cross-reactivity to house dust mite. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017;12(10):3218-3221.
 148. Lee CH, Wu CC, Tyan YC, Yu WT, Huang ES, Yu HS. Identification of pyruvate kinase as a novel allergen in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by specific-IgE present in patients with shrimp allergy. *Food Chem.* 2018;258:359-365.
 149. Aalberse RC, Akkerdaas JH, Ree R Van. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy.* 2001;56:478-490.
 150. Santamaría R, Therón R. Treevolution: Visual analysis of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2009;25(15):1970-1971.
 151. *Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation of Allergenicity of Food Derived from Biotechnology.*; 2001.
 152. Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Molecular Cloning of Tropomyosins Identified as Allergens in Six Species of Crustaceans. *J Agric Food Chem.* 2007;55:985-991.
 153. Vargas AM, Mahajan A, Tille KS, Wilson BS, Mattison CP. Cross-reaction of recombinant termite (*Coptotermes formosanus*) tropomyosin with IgE from cockroach and shrimp allergic individuals. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2018;120(3):335-337.
 154. González-Fernández J, Alguacil-Guillén M, Cuéllar C, Daschner A. Possible Allergenic Role of Tropomyosin in Patients with Adverse Reactions after Fish Intake. *Immunol Invest.* 2018;47(4):416-429.
 155. Liu R, Holck AL, Yang E, Liu C, Xue W. Tropomyosin from tilapia (*Oreochromis mossambicus*) as an allergen. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(3):365-377.
 156. Motoyama K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Cephalopod tropomyosins: Identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:1997-2002.
 157. Witteman AM, Akkerdaas JH, Van Leeuwen J, Van Der Zee JS, Aalberse RC. Identification of a Cross-Reactive Allergen (Presumably Tropomyosin) in Shrimp, Mite and Insects. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;(105):56-61.
 158. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, et al. Asthma after consumption of snails in house-dust-mite-allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. *Allergy.* 1996;51:387-393.
 159. Dresner SH, Siegel S. *The Jewish Dietary Laws.* (Press T burning bush, ed.). New York; 1959.
 160. Kosher Food Certification - Kashrut. <http://www.koshercertification.org.uk/>. Accessed September 14, 2018.
 161. Judaism 101: Kashrut: Jewish Dietary Laws. <http://www.jewfaq.org/kashrut.htm>. Accessed September 14, 2018.
 162. Fernandes J, Reshefw A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:956-961.
 163. Arlian LG, Morgan MS, Vyszynski-Moher DL, Sharra D. Cross-reactivity between storage and dust mites and between mites and shrimp. *Exp Appl Acarol.* 2009;47:159-172.

BIBLIOGRAFÍA

164. Boquete M, Iraola V, Morales M, Pinto H. Seafood hypersensitivity in mite sensitized individuals: is tropomyosin the only responsible allergen? *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2011;106(3):223-229.
165. Wang J, Calatroni A, Visness CM, Sampson HA. Correlation of specific IgE to shrimp with cockroach and dust mite exposure and sensitization in an inner city population. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(4):834-837.
166. López-Matas MA, De Larramendi CH, Moya R, et al. In vivo diagnosis with purified tropomyosin in mite and shellfish allergic patients. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2016;116(6):538-543.
167. Cantillo JF, Puerta L, Lafosse-Marin S, Subiza JL, Caraballo L, Fernandez-Caldas E. Allergens involved in the cross-reactivity of *Aedes aegypti* with other arthropods. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2017;118(6):710-718.
168. Cantillo JF, Puerta L, Lafosse-Marin S, Subiza JL, Caraballo L, Fernández-Caldas E. Identification and Characterization of IgE-Binding Tropomyosins in *Aedes aegypti*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(1):46-56.
169. Tuano KTS, Anvari S, Hanson IC, et al. Improved diagnostic clarity in shrimp allergic non-dust-mite sensitized patients. *Allergy Asthma Proc.* 2018;39(5):377-383.
170. Shafique RH, Inam M, Ismail M, Chaudhary FR. Group 10 allergens (tropomyosins) from house-dust mites may cause covariation of sensitization to allergens from other invertebrates. *Allergy Rhinol.* 2012;3(2):e74-90. doi:10.2500/ar.2012.3.0036.
171. Bessot JC, Metz-Favre C, Rame JM, De Blay F, Pauli G. Tropomyosin or not tropomyosin, what is the relevant allergen in house dust mite and snail cross allergies? *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2010;42(1):3-10.
172. Azofra J, Lombardero M. Limpet anaphylaxis: Cross-reactivity between limpet and house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2003;58(2):146-149.
173. Iparraguirre A, Rodríguez-Pérez R, Juste S, Ledesma A, Moneo I, Caballero ML. Selective allergy to lobster in a case of primary sensitization to house dust mites. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(5):409-413.
174. Bobolea I, Barranco P, Pastor-Vargas C, Iraola V, Vivanco F, Quirce S. Arginine kinase from the cellar spider (*Holocnemus pluchei*): a new asthma-causing allergen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155(2):180-186.
175. Nugraha R, Kamath SD, Johnston E, et al. Rapid and comprehensive discovery of unreported shellfish allergens using large-scale transcriptomic and proteomic resources. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1501-1504.e8.
176. Jirapongsananuruk OĀ, Sripramong CĀ, Pacharn PĀ, et al. Specific allergy to *Penaeus monodon* (seawater shrimp) or *Macrobrachium rosenbergii* (freshwater shrimp) in shrimp-allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:1038-1047.
177. Vidal C, Bartolomé B, Rodríguez V, Armisen M, Linneberg A, González-Quintela A. Sensitization pattern of crustacean-allergic individuals can indicate allergy to molluscs. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70(11):1493-1496.
178. Wong L, Huang CH, Lee BW. Shellfish and house dust mite allergies: Is the link tropomyosin? *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2016;8(2):101-106.
179. Arlian LG, Morgan MS. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003;23(3):443-468.
180. Murray AB, Ferguson AC, Morrison BJ. Sensitization to house dust mites in different climatic areas. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76(1):108-112.
181. Sastre J, Iraola V, Figueredo E, Tornero P, Fernandez-Caldas E. Mites in Madrid. *Allergy.* 2002;57:58-59.
182. SEAIC. *Alergológica 2015.* (Healthcare DG de C, ed.); 2017.
183. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(12):959-965.
184. Becker S, Gröger M, Canis M, Pfrogner E, Kramer MF. Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269(4):1291-1296.
185. Thalayasingam M, Gerez IFA, Yap GC, et al. Clinical and immunochemical profiles of food challenge proven or anaphylactic shrimp allergy in tropical Singapore. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(3):687-697.
186. Westritschnig K, Sibanda E, Thomas W, et al. Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:22-27.
187. Asero R, Mistrello G, Amato S, et al. Shrimp allergy in Italian adults: a multicenter study

BIBLIOGRAFÍA

- showing a high prevalence of sensitivity to novel high molecular weight allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157(1):3-10.
188. Farioli L, Losappio LM, Giuffrida MG, et al. Mite-Induced Asthma and IgE Levels to Shrimp, Mite, Tropomyosin, Arginine Kinase, and der p 10 Are the Most Relevant Risk Factors for Challenge-Proven Shrimp Allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;174(3-4):133-143.
 189. Vilariño N, Louzao MC, Abal P, et al. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins (Basel).* 2018;10(8):1-38.
 190. Soliño L, Costa PR. Differential toxin profiles of ciguatoxins in marine organisms: Chemistry, fate and global distribution. *Toxicon.* 2018;150:124-143.
 191. Reis Costa P, Braga A, Turner A, Reis Costa P, Braga AC, Turner AD. Accumulation and Elimination Dynamics of the Hydroxybenzoate Saxitoxin Analogues in Mussels *Mytilus galloprovincialis* Exposed to the Toxic Marine Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxins (Basel).* 2018;10(11):428.
 192. Silva M, Rey V, Barreiro A, et al. Paralytic shellfish toxins occurrence in non-traditional invertebrate vectors from north Atlantic waters (Azores, Madeira, and Morocco). *Toxins (Basel).* 2018;10(9).
 193. Bazzoni AM, Mudadu AG, Lorenzoni G, et al. Detection of Dinophysis species and associated okadaic acid in farmed shellfish: a two-year study from the western Mediterranean area. *J Vet Res.* 2018;62(2):137-144.
 194. Prego-Faraldo MV, Martínez L, Méndez J. RNA-Seq Analysis for Assessing the Early Response to DSP Toxins in *Mytilus galloprovincialis* Digestive Gland and Gill. *Toxins (Basel).* 2018;10(10):417.
 195. Biji KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, Mohan CO, Gopal TKS. Biogenic amines in seafood. *J Food Sci Technol.* 2016;53(5):2210-2218.
 196. Lopata AL, Lehrer SB. New insights into seafood allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:270-277.
 197. Tuano KTS, Davis CM. Oral allergy syndrome in shrimp and house dust mite allergies. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(6):2163-2164.
 198. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guidelines for the Definition, Classification, Diagnosis and Management of Urticaria.
 199. Muraro A, Roberts G, Worm M, et al. Anaphylaxis: Guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(8):1026-1045.
 200. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood Allergy and Allergens: A Review. *Mar Biotechnol.* 2003;5:339-348.
 201. Asero R, Antonicelli L, Arena A, et al. Causes of Food-Induced Anaphylaxis in Italian Adults: A Multi-Centre Study. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150:271-277.
 202. Steensma DP. The kiss of death: A severe allergic reaction to a shellfish induced by a good-night kiss. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(2):221-222.
 203. Bonlokke JH, Gautrin D, Sigsgaard T, Lehrer SB, Maghni K, Cartier A. Snow crab allergy and asthma among Greenlandic workers--a pilot study. *Int J Circumpolar Health.* 2012;71(6):19126.
 204. Desjardins A, Malo J, Archevêque JL, Cartier A, Mccants M, Lehrer SB. Occupational IgE-mediated sensitization and asthma caused by clam and shrimp. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96:608-617.
 205. Thomassen MR, Kamath SD, Lopata AL, et al. Occupational Exposure to Bioaerosols in Norwegian Crab Processing Plants. *Ann Occup Hyg.* 2016;60(7):781-794.
 206. Abdel Rahman AM, Gagné S, Helleur RJ. Simultaneous determination of two major snow crab aeroallergens in processing plants by use of isotopic dilution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(3):821-831.
 207. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(6):881-890.
 208. Gaddie J, Friend JAR, S LJ. Pulmonary hypersensitivity in prawn workers. *Lancet.* 1980;December(20/27):1350-1353.
 209. Malo JL, Cartier A. Occupational Reactions in the Food Industry. *Clin Rev Allergy.* 1993;11:223-240.
 210. Jeebhay MF, Robins TG, Lehrer SB, Lopata AL. Occupational seafood allergy: A review. *Occup Environ Med.* 2001;58(9):553-562.
 211. Woo CK, Bahna SL. Not all shellfish "allergy" is allergy! *Clin Transl Allergy.* 2011;1(1):3.

BIBLIOGRAFÍA

212. Panzani RC, Ariano R. Arthropods and invertebrates allergy (with the exclusion of mites): The concept of panallergy. *Allergy Suppl.* 2001;56(69):1-22.
213. McSharry C, Anderson K, McKay IC, et al. The IgE and IgG antibody responses to aerosols of *Nephrops norvegicus* (prawn) antigens: the association with clinical hypersensitivity and with cigarette smoking. *Clin Exp Immunol.* 1994;97(3):499-504.
214. Goetz DW, Whisman BA. Occupational asthma in a seafood restaurant worker: cross-reactivity of shrimp and scallops. *Ann allergy, asthma Immunol.* 2000;85(6 Pt 1):461-466.
215. Meseguer Arce J, Sánchez-Guerrero Villajos IM, Iraola V, Carnés J, Fernández Caldas E. Occupational allergy to aquarium fish food: Red midge larva, freshwater shrimp, and earthworm. a clinical and immunological study. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(7):462-470.
216. Leonard SA, Pecora V, Fiocchi AG, Nowak-Węgrzyn A. Food protein-induced enterocolitis syndrome: A review of the new guidelines. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):1-9.
217. González-Delgado P, Caparrós E, Moreno MV, et al. Clinical and immunological characteristics of a pediatric population with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) to fish. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(3):269-275.
218. Caubet JC, Bencharitiwong R, Ross A, Sampson HA, Berin MC, Nowak-Węgrzyn A. Humoral and cellular responses to casein in patients with food protein-induced enterocolitis to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(2):572-583.
219. Nowak-Węgrzyn A, Chehade M, Groetch ME, et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary—Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4):1111-1126.e4.
220. Nowak-Węgrzyn A, Jarocka-Cyrta E, Moschione Castro A. Food protein-induced enterocolitis syndrome: FPIES. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2017;27(1):1-18.
221. Gleich GJ, Sebastian K, Firszt R, Wagner LA. Shrimp allergy: Gastrointestinal symptoms commonly occur in the absence of IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4(2):316-318.
222. Miceli Sopo S, Monaco S, Badina L, et al. Food protein-induced enterocolitis syndrome caused by fish and/or shellfish in Italy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015;26(8):731-736.
223. Tan JA, Smith WB. Non-IgE-mediated gastrointestinal food hypersensitivity syndrome in adults. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(3):355-357.
224. Du YJ, Nowak-Węgrzyn A, Vadas P. FPIES in Adults. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2018;Aug(16):1-10.
225. Muñoz-Cano R, Pascal M, Araujo G, et al. Mechanisms, cofactors, and augmenting factors involved in anaphylaxis. *Front Immunol.* 2017;8(SEP):1-7.
226. Niggemann B, Beyer K. Factors augmenting allergic reactions. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2014;69(12):1582-1587.
227. Maulitz RM, Pratt DS, Schocket AL. Exercise-induced anaphylactic reaction to shellfish. *J Allergy Clin Immunol.* 1979;63(6):433-434.
228. Tokunaga H, Kokubu F, Okamoto M, Miyamoto M, Hanyuuda M, Adachi M. A case of food-dependent exercise-induced anaphylaxis induced by shrimp. *Alerugi.* 1995;Nov;44(11):1297-1304.
229. Vidal C, Bartolomé B, González-Quintela A, Rodríguez V, Armisen M. Prawns, barnacles, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Effect modifiers or interaction? *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(2):113-118.
230. Harada S, Horikawa T, Ashida M, Kamo T, Nishioka E, Ichihashi M. Aspirin enhances the induction of type I allergic symptoms when combined with food and exercise in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol.* 2001;145(2):336-339.
231. Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68(9):1085-1092.
232. Larramendi CH. Food allergy diagnosis: Are there any missing factors? A theoretical approach. *Med Hypotheses.* 2003;60(5):731-738.
233. Pevec B, Radulovic Pevec M, Stipic Markovic A, Batista I. House dust mite subcutaneous immunotherapy does not induce new sensitization to tropomyosin: Does it do the opposite? *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(1):29-34.
234. Rossi RE, Monasterolo G, Incorvaia C, et al. Lack of neo-sensitization to Pen a 1 in patients treated with mite sublingual immunotherapy. *Clin Mol Allergy.* 2010;8:2-5.

BIBLIOGRAFÍA

235. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy*. 1996;51(2):108-113.
236. Asero R. Lack of de novo Sensitization to Tropomyosin in a Group of Mite-Allergic Patients Treated by House Dust Mite-Specific Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137:62-65.
237. Cortellini G, Spadolini I, Santucci A, et al. Improvement of shrimp allergy after sublingual immunotherapy for house dust mites: a case report. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2011;43(5):162-164.
238. Sathe SK, Teuber SS, Roux KH. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol Adv*. 2005;23(6):423-429.
239. Han XY, Yang H, Rao ST, et al. The Maillard Reaction Reduced the Sensitization of Tropomyosin and Arginine Kinase from *Scylla paramamosain*, Simultaneously. *J Agric Food Chem*. 2018;66(11):2934-2943.
240. Rolland JM, Varese NP, Abramovitch JB, et al. Effect of Heat Processing on IgE Reactivity and Cross-Reactivity of Tropomyosin and Other Allergens of Asia-Pacific Mollusc Species: Identification of Novel Sydney Rock Oyster Tropomyosin Sac g 1. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(14):1800148.
241. Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J Agric Food Chem*. 2006;54(25):9529-9534.
242. Vissers YM, Iwan M, Adel-Patient K, et al. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2011;41(11):1631-1642.
243. Abramovitch JB, Lopata AL, O'Hehir RE, Rolland JM. Effect of thermal processing on T cell reactivity of shellfish allergens - Discordance with IgE reactivity. *PLoS One*. 2017;12(3):1-18.
244. Lehrer SB, Ibañez M, McCants M, Daul CB, Morgan JE. Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:1005-1013.
245. Liu G-M, Cheng H, Nesbit JB, Su W-J, Cao M-J, Maleki SJ. Effects of Boiling on the IgE-Binding Properties of Tropomyosin of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Toxicol Chem Food Saf*. 2010;75(1):T1-T5.
246. Samson KTR, Chen F, Miura K, et al. IgE Binding to Raw and Boiled Shrimp Proteins in Atopic and Nonatopic Patients with Adverse Reactions to Shrimp. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133:225-232.
247. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;756(1-2):207-228.
248. Carnés J, Ferrer Á, Huertas ÁJ, Andreu C, Larramendi CH, Fernández-Caldas E. The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007;98(4):349-354.
249. Aalberse RC. Shrimp serology: We need tests with more and less cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(4):530-531.
250. Ling L, Ospina MB, Sideri K, Vliagoftis H. Retrospective analysis on the agreement between skin prick test and serum food specific IgE antibody results in adults with suspected food allergy. *Allergy, Asthma Clin Immunol*. 2016;12(1):1-6.
251. Asero R, Scala E, Villalta D, et al. Shrimp allergy: Analysis of commercially available extracts for in-vivo diagnosis short title: Analysis of commercial shrimp extracts for SPT. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(3):1-21.
252. Kazatsky AM, Wood RA. Classification of Food Allergens and Cross-Reactivity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16(3):1-7.
253. Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: Is it a necessity? *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93(6):1068-1070.
254. Blaus B. Medical gallery of Blausen Medical 2014. WikiJournal of Medicine. https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_2014. Published 2014. Accessed December 2, 2018.
255. Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):144-149.
256. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1997;100(4):444-451.
257. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5):891-896.
 258. Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Beyer K, et al. How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(4):964-971.
 259. Thermo Fischer Scientific. <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html>. Accessed November 13, 2018.
 260. Lopata AL, Kleine-Tebbe J, Kamath SD. Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy: Part 22 of the Series Molecular Allergology. *Allergo J.* 2016;25(7):24-32.
 261. Boquete M, Iraola V, Fernández-Caldas E, et al. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2006;16(3):169-176.
 262. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(Suppl 1):88-92.
 263. Khor SS, Morino R, Nakazono K, et al. Genome-wide association study of self-reported food reactions in Japanese identifies shrimp and peach specific loci in the HLA-DR/DQ gene region. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-17.
 264. Daul B, Morgan JE. Provocation-challenge studies in shrimps-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;81:1180-1186.
 265. Keil T, McBride D, Grimshaw K, et al. The multinational birth cohort of EuroPrevall: background, aims and methods. *Allergy.* 2010;65(4):482-490.
 266. El-Qutob D. Shrimp allergy: beyond avoidance diet. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2017;49(06):252.
 267. Kandyil RM, M DC. Shellfish allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20:408-414.
 268. Byun MW, Kim JH, Lee JW, Park JW, Hong CS, Kang IJ. Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J Food Prot.* 2000;63(7):940-944.
 269. Ahmed I, Lv L, Lin H, et al. Effect of tyrosinase-aided crosslinking on the IgE binding potential and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chem.* 2018;248:287-295.
 270. Zhen-xing LI, Hong LIN, Li-min CAO, Khalid J. Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(4):251-256.
 271. Wang L, Hu Z, Zhou X, Chen Z, Wu H. Elimination of Allergens in South American Shrimp by Protease Hydrolysis. *Food Sci.* 2010;31(17):263-266.
 272. Feuille E, Nowak-Wegrzyn A. Allergen-specific immunotherapies for food allergy. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2018;10(3):189-206.
 273. Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(4):826-830.
 274. Prickett SR, Rolland JM, O'Hehir RE. Immunoregulatory T cell epitope peptides: The new frontier in allergy therapy. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(6):1015-1026.
 275. Moldaver D, Larché M. Immunotherapy with peptides. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;66(6):784-791.
 276. Wai CYY, Leung NYH, Ho MHK, et al. Immunization with hypoallergens of shrimp allergen tropomyosin inhibits shrimp tropomyosin specific IgE reactivity. *PLoS One.* 2014;9(11):1-10.
 277. Rajagopal D, Ganesh A, Subba P V. Modulation of Allergen-Specific Immune Responses to the Major Shrimp Allergen, Tropomyosin, by Specific Targeting to Scavenger Receptors on Macrophages. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;121:308-316.
 278. Epstein-Rigbi N, Goldberg MR, Levy MB, Nachshon L, Elizur A. Quality of Life of Food-Allergic Patients Before, During, and After Oral Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018.
 279. Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E. New therapeutic strategy for combating the increasing burden of allergic disease: Probiotics - A Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group report. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(1):31-37.
 280. West CE, Dzidic M, Prescott SL, Jenmalm MC. Bugging allergy; role of pre-, pro- and synbiotics in allergy prevention. *Allergol Int.* 2017;66(4):529-538.
 281. Schiavi E, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, Boirivant M, Di Felice G. Oral therapeutic

BIBLIOGRAFÍA

- administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;66(4):499-508.
282. Di Felice G, Barletta B, Butteroni C, et al. Use of Probiotic Bacteria for Prevention and Therapy of Allergic Diseases. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42, Supp.(September):S130-S132.
283. Fu L, Song J, Wang C, Fu S, Wang Y. Bifidobacterium infantis potentially alleviates shrimp tropomyosin-induced allergy by tolerogenic dendritic cell-dependent induction of regulatory T cells and alterations in gut microbiota. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1-14.
284. Fu L, Peng J, Zhao S, Zhang Y, Su X, Wang Y. Lactic acid bacteria-specific induction of CD4⁺Foxp3⁺T cells ameliorates shrimp tropomyosin-induced allergic response in mice via suppression of mTOR signaling. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14.
285. Wang J, Jones SM, Pongracic JA, et al. Safety, clinical and immunologic efficacy of a Chinese herbal medicine (FAHF-2) for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;October; 1(4):962-970.
286. Simons FER, Ebisawa M, Sanchez-Borges M, et al. 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organ J.* 2015;8(1):1-16.
287. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
288. Allergome. <http://www.allergome.org/>. Accessed November 28, 2018.
289. Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, et al. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy.* 2013;3(1):1-10.
290. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
291. Vidal C, Bartolomé B, Rodríguez V, Armisén M, Linneberg A, González-Quintela A. Sensitization pattern of crustacean-allergic individuals can indicate allergy to molluscs. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70(11):1493-1496. doi:10.1111/all.12693.
292. Faber MA, Pascal M, El Kharbouchi O, et al. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2017;72(6):842-848.

8. Anexos

ANEXO 1. TABLA DE IgE ESPECÍFICAS EN ALÉRGICOS A GAMBA

ALERGIA GAMBA	IgE GAMBA	IgE Pen a 1	<i>P. styliifera</i> cruda	<i>P. styliifera</i> cocida	<i>P. vannamei</i> cruda	<i>P. vannamei</i> cocida	<i>S. melanthro</i> cruda	<i>S. melanthro</i> cocida	Mezcla 4 especies crudas	Mezcla 4 especies cocidas
1	14,4	11,5	2,115	1,360	2,522	2,894	3,830	2,822	1,789	0,781
1	1,07	1,21	0,529	0,476	0,096	1,536	1,219	1,049	0,024	0,223
1	1,47	0,52	0,020	0,038	0,164	0,392	0,376	0,329	0,000	0,000
1	8,18	0	0,066	0,036	0,308	0,103	0,214	0,176	0,075	0,000
1	1,16	0	0,139	0,000	0,589	0,364	0,545	0,123	0,100	0,000
1	NR	NR	0,222	0,062	0,015	0,765	0,809	0,609	0,000	0,000
1	NR	NR	0,000	0,000	0,000	0,321	0,232	0,130	0,000	0,000
1	11,5	12	1,356	1,722	3,201	3,487	3,905	3,451	1,945	1,218
1	0,67	0,48	0,081	0,071	0,276	0,200	0,257	0,207	0,111	0,016
1	59,7	NR	4,014	4,027	4,009	4,012	4,042	4,038	4,001	3,609
1	1,05	0,02	0,101	0,045	0,040	0,657	0,620	0,357	0,000	0,000
1	1,8	1,53	0,278	0,309	0,379	0,681	0,678	0,674	0,309	0,305
1	3,47	0	0,167	0,022	1,169	0,770	1,178	0,192	0,371	0,070
1	19,8	NR	0,909	0,326	4,009	3,176	3,533	1,267	1,589	0,301
1	20	28	2,282	2,256	3,148	3,935	4,042	4,038	2,098	1,933
1	2,56	NR	0,081	0,000	0,242	0,083	0,283	0,066	0,039	0,000
1	0,79	0,38	0,088	0,079	0,054	0,292	0,330	0,307	0,019	0,044
1	4,74	0,03	0,269	0,132	0,481	0,835	0,980	0,908	0,138	0,054
1	4,12	0,28	0,459	0,105	0,363	0,858	1,291	0,568	0,205	0,040
1	16,2	11,4	1,656	1,756	2,229	3,552	4,042	3,395	1,637	1,350
1	7,44	5,22	0,766	0,784	1,511	1,608	2,078	1,620	1,131	0,572
1	18,8	0,09	0,190	0,158	0,652	0,281	0,540	0,448	0,356	0,111
1	0,36	0,01	0,042	0,021	0,000	0,322	0,320	0,212	0,000	0,011
1	2,25	0,03	0,300	0,000	0,419	0,000	0,532	0,010	0,227	0,000
1	0,87	0,11	0,174	0,127	0,095	0,412	0,502	0,493	0,076	0,114
1	4,51	0,01	0,187	0,023	0,317	0,156	0,390	0,103	0,150	0,000
1	7,18	7,81	0,630	0,773	0,618	1,506	1,543	1,512	0,571	0,729
1	2,17	0	0,839	0,037	1,086	0,061	0,582	0,091	1,022	0,029
1	0,2	0	0,083	0,066	0,014	0,186	0,245	0,219	0,036	0,073
1	4,33	2,1	1,175	0,662	1,190	0,734	0,977	0,663	1,330	0,616
1	23,4	15,3	4,003	2,836	3,458	3,185	4,035	3,221	4,033	2,610
1	0,96	0	0,477	0,074	0,761	0,426	0,538	0,074	0,708	0,127
1	0,29	0	0,098	0,062	0,062	0,111	0,220	0,112	0,041	0,045
1	79,9	25	4,003	4,031	4,032	4,032	4,035	4,040	4,033	4,027
1	6,26	5,3	1,452	1,208	1,204	1,540	1,444	1,242	1,727	1,164
1	55,6	3,75	3,003	2,292	2,597	2,569	3,167	2,348	3,831	2,221
1	1,28	0,2	0,127	0,093	0,208	0,174	0,129	0,135	0,283	0,126
1	0,21	0,01	0,308	0,159	0,034	0,518	0,322	0,326	0,041	0,109
1	0,22	0	1,005	0,020	0,928	0,007	0,182	0,010	0,858	0,003
1	1,5	1,24	1,419	1,148	0,904	1,350	1,448	1,152	1,413	1,119
1	3,76	1,08	0,674	0,840	0,203	0,998	0,796	0,813	0,498	0,980
1	6,62	NR	0,000	0,239	0,274	2,193	0,038	0,094	0,250	0,106
1	0,67	0,48	0,053	0,052	0,091	0,067	0,062	0,056	0,112	0,083
1	0	0	0,002	0,028	0,019	0,022	0,066	0,032	0,029	0,029
1	5,04	4,39	0,044	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
1	4,23	0,03	0,000	0,006	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,02	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,001	0,000	0,034
1	0,45	0	0,026	0,000	0,000	0,015	0,023	0,024	0,000	0,000
1	2,28	0	0,018	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000
1	8,89	0,03	0,005	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	0,000	0,040
1	0,97	0	0,010	0,000	0,038	0,000	0,034	0,001	0,000	0,000
1	1,04	0	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,002
1	0,57	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	2,47	0,02	0,091	0,026	0,189	0,128	0,229	0,153	0,014	0,000
1	2,54	0	0,000	0,000	0,091	0,004	0,098	0,020	0,000	0,019
1	0,43	0	0,009	0,000	0,290	0,177	0,142	0,013	0,015	0,006
1	1,76	0,1	0,049	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,092
1	2,1	0	0,000	0,000	0,017	0,000	0,016	0,006	0,000	0,000
1	4,5	0,01	0,008	0,000	0,000	0,012	0,006	0,000	0,000	0,004
1	1,11	0,02	0,003	0,000	0,000	0,009	0,007	0,000	0,000	0,000
1	0,76	0	0,041	0,000	0,096	0,000	0,123	0,000	0,000	0,000
1	0,9	0,02	0,000	0,000	0,000	0,046	0,023	0,006	0,000	0,000
1	0,56	0,02	0,000	0,000	0,000	0,011	0,009	0,000	0,000	0,005
1	0,46	0,13	0,000	0,000	0,066	0,030	0,064	0,057	0,000	0,000
1	8,18	0	0,000	0,000	0,111	0,022	0,078	0,036	0,000	0,000
1	2,13	0	0,000	0,000	0,016	0,005	0,171	0,008	0,000	0,000
1	0,57	0	0,000	0,000	0,010	0,000	0,014	0,001	0,000	0,000
1	0,69	0	0,002	0,014	0,041	0,025	0,034	0,018	0,035	0,015
1	0,11	0	0,000	0,005	0,007	0,002	0,011	0,034	0,006	0,004
1	0,45	0	0,000	0,028	0,015	0,003	0,025	0,022	0,029	0,026
1	NR	NR	0,034	0,032	0,012	0,067	0,042	0,031	0,019	0,030
1	0	0	0,055	0,057	0,131	0,066	0,068	0,095	0,180	0,068
1	0,14	0	0,035	0,047	0,006	0,033	0,064	0,069	0,030	0,023
1	0,28	0	0,002	0,022	0,026	0,023	0,023	0,029	0,031	0,019
1	0,36	0	0,009	0,034	0,006	0,022	0,034	0,047	0,017	0,016
1	0,02	0	0,000	0,005	0,002	0,009	0,015	0,021	0,019	0,001
1	0,03	0	0,004	0,019	0,019	0,008	0,013	0,035	0,034	0,012
1	1,04	0	0,000	0,019	0,019	0,026	0,021	0,041	0,015	0,015
1	1,3	0	0,000	0,008	0,000	0,002	0,027	0,025	0,006	0,000
1	0,76	0	0,004	0,018	0,034	0,004	0,018	0,019	0,029	0,013
1	0,03	0	0,023	0,027	0,012	0,054	0,052	0,041	0,031	0,038
1	0,24	0	0,000	0,015	0,017	0,001	0,008	0,009	0,016	0,005
1	1,11	0,14	0,115	0,114	0,053	0,231	0,135	0,122	0,088	0,145
1	0	0	0,000	0,021	0,000	0,020	0,030	0,026	0,003	0,011
1	0,35	0	0,000	0,015	0,001	0,002	0,008	0,011	0,005	0,008
1	0,14	0	0,068	0,051	0,018	0,108	0,110	0,069	0,041	0,039
1	0,47	0	0,000	0,013	0,013	0,005	0,008	0,112	0,007	0,009
1	0,68	0	0,210	0,016	0,136	0,001	0,090	0,010	0,209	0,006
1	0,31	0	0,004	0,017	0,021	0,011	0,027	0,013	0,008	0,018
1	0,8	0	0,000	0,011	0,030	0,004	0,016	0,030	0,027	0,013
1	0,01	0	0,000	0,020	0,009	0,025	0,014	0,028	0,021	0,021
1	0,13	0	0,002	0,022	0,004	0,030	0,055	0,049	0,004	0,015
1	0	0	0,042	0,013	0,045	0,002	0,008	0,040	0,013	0,002
1	0,18	0	0,021	0,022	0,081	0,042	0,047	0,047	0,065	0,022
1	0,11	0,01	0,044	0,035	0,026	0,052	0,103	0,083	0,046	0,055
1	0,27	0	0,000	0,013	0,009	0,002	0,009	0,010	0,003	0,011
1	0,56	NR	0,110	0,050	0,035	0,102	0,136	0,066	0,057	0,032
1	0,3	0	0,123	0,055	0,051	0,111	0,124	0,119	0,071	0,063
1	0	0	0,000	0,004	0,012	0,002	0,011	0,010	0,005	0,008

ANEXO 2. TABLA DE IgE ESPECÍFICAS EN NO ALÉRGICOS A GAMBA

ALERGIA GAMBA	IgE GAMBA	IgE Pen a 1	<i>P. styliifera</i> cruda	<i>P. styliifera</i> cocida	<i>P. vannamei</i> cruda	<i>P. vannamei</i> cocida	<i>S. melantha</i> cruda	<i>S. melantha</i> cocida	Mezcla 4 especies crudas	Mezcla 4 especies cocidas
0	11,3	0	3,143	0,400	3,966	0,856	2,303	0,611	3,799	0,365
0	3,35	0,02	0,817	0,477	0,074	0,648	0,862	0,749	0,206	0,416
0	26,5	5,29	2,967	2,264	1,313	3,564	3,094	2,870	2,091	2,159
0	0,3	0	0,000	0,012	0,018	0,018	0,033	0,044	0,006	0,013
0	0,79	0	0,048	0,054	0,046	0,051	0,046	0,040	0,040	0,043
0	0,12	0	0,066	0,194	0,060	0,070	0,060	0,062	0,072	0,161
0	0	0	0,013	0,030	0,041	0,141	0,152	0,149	0,000	0,002
0	NR	NR	0,013	0,000	0,039	0,000	0,051	0,020	0,000	0,000
0	0,17	0,42	0,050	0,071	0,053	0,107	0,082	0,076	0,057	0,082
0	0,32	0,06	0,064	0,086	0,113	0,091	0,098	0,071	0,113	0,091
0	0,3	0	0,000	0,000	0,141	0,000	0,084	0,027	0,000	0,000
0	0,09	0,04	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,053	0,000	0,000
0	NR	NR	0,000	0,009	0,000	0,000	0,006	0,076	0,000	0,000
0	0	0,01	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,015	0,000	0,000
0	0,66	0	0,004	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
0	0,84	NR	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000
0	0,75	NR	0,001	0,000	0,188	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000
0	1,51	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000

Becas

Se recibió una beca de la Sociedad Española de Alergología (SEAIC) para la realización de este trabajo.

La SEAIC no participó en el diseño del estudio, la recogida y análisis de datos, ni la preparación del manuscrito.

Conflictos de interés

No se declara ningún conflicto de interés.

ANEXO 4. CERTIFICADO DE DIRECCIÓN

Antonio Luis Valero Santiago, Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Alergología, Jefe de Sección de Alergología del Hospital Clínic de Barcelona

CERTIFICA

Que María Rueda García, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “Diagnóstico de los Pacientes con Alergia a Gamba” y que una vez revisado, reúne todos los requisitos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctora.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento

Barcelona, diciembre de 2018



Antonio Luis Valero Santiago

ANEXO 5. CERTIFICADO DE DIRECCIÓN

Albert Selva O'Callaghan, Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Medicina Interna en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, y Profesor de la Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA

Que María Rueda García, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi tutoría el trabajo titulado "Diagnóstico de los Pacientes con Alergia a Gamba" y que una vez revisado, reúne todos los requisitos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctora.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento

Barcelona, diciembre de 2018

Albert Selva O'Callaghan