

ESTUDIO SOBRE LA ALERGENICIDAD IN VIVO E IN VITRO  
A DIFERENTES ESPECIES Y VARIEDADES DE  
CRUSTÁCEOS.

TESIS DOCTORAL

LUIS JAVIER CALVO TELLO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, PSIQUIATRIA Y  
DERMATOLOGÍA.

ZARAGOZA 7/5/2009



**Dedicado a mi madre con todo mi cariño.**

**Estoy convencido que con tu fuerza y tu espíritu de lucha eres capaz de superar cualquier enfermedad por terrible que sea...**



Prof<sup>a</sup>. Dra. Dña. Isabel Nerín de la Puerta, Profesora del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

HAGO CONSTAR:

Que D. Luis Javier Calvo Tello, ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “Estudio sobre la alergenidad in vivo e in vitro a diferentes especies y variedades de crustáceos”, bajo mi dirección.

Que una vez revisado el contenido del estudio, este se considera adecuado para su presentación como Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor por esta Facultad de Medicina.

Zaragoza, 4 de mayo de 2009

Fdo: Prf<sup>a</sup> Dra. Isabel Nerín de la Puerta



Dr. D. Carlos Colás Sanz, Jefe del Servicio de Alergología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, de Zaragoza.

HAGO CONSTAR:

Que D. Luis Javier Calvo Tello, ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “Estudio sobre la alergenidad in vivo e in vitro a diferentes especies y variedades de crustáceos”, bajo mi dirección.

Que una vez revisado el contenido del estudio, este se considera adecuado para su presentación como Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor por esta Facultad de Medicina.

Zaragoza, 4 de mayo de 2009

Fdo: Dr. D. Carlos Colás Sanz



## **AGRADECIMIENTOS:**

Antes de comenzar y como dice el refrán “es de bien nacidos el ser agradecidos”, quiero agradecer a:

El Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria, lugar donde con la ayuda inestimable de su inmunóloga la Doctora Natividad Longo, y la técnico del laboratorio Zuriñe, fueron guiándome en la realización de los extractos, la cuantificación de proteínas, el SDS PAGE y el comienzo de los inmunoblotting, durante 3 meses que duró mi rotación en dicho Servicio. En todo ese tiempo aprendí la complejidad de las técnicas de laboratorio, y por supuesto a tener paciencia, ya que mínimas modificaciones en la realización de una técnica, puede dar al traste horas o incluso días de trabajo.

En especial a la Doctora Maite Audicana Berasategui por el ánimo recibido y el seguimiento de mis avances durante los 3 meses que estuve en el Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria, así como a todos los adjuntos/as, las residentes, enfermeras, auxiliares y administrativas de dicho hospital por su acogida e integración en todas las actividades que realizaban y el apoyo que recibí de cada uno de ellos.

Los directores de mi tesis: la Doctora Isabel Nerín de la Puerta y al Doctor Carlos Colás Sanz por todo el apoyo prestado para la realización de esta tesis doctoral.

Al jefe de Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, el Doctor Luis Larraz y al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, que gracias a la ayuda inestimable del profesor Alberto Anel y los becarios Nacho, Nuria y

Patricia, se pudo completar el estudio mediante la realización del Western Blot.

A todos los pacientes, que han formado parte de este estudio, por su colaboración desinteresada, sin los cuales habría sido imposible hacer posible avanzar en la medicina.

Por último, y no por eso menos importante, a mis padres, por darme la vida, el mejor de los regalos. A mi padre Gerardo, quien me demuestra con el ejemplo, lo que significa trabajar duro, ser tenaz, constante y perseverante. En especial, a mi madre Ana María, una mujer paciente, sabia, tolerante, de quien he aprendido lo que es el amor por los demás, lo que significa dar sin recibir nada a cambio, en una palabra lo que significa entregarse.

## ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
(A)	Absorbancia
(a)	Coefficiente de absorción
BSA	Seroalbúmina bovina
(c)	Concentración
CR	Cucaracha
CPA	Célula presentadora de antígenos
D.O	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FROM	Fondo de Regulación y Organización del Mercado de los productos de la pesca y cultivos marinos
Ig	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
IR	Infrarrojos
IUIS	International Union of Immunological Societies
KDa	Kilodaltons
Ku/l	KiloUnidades/ litro
L	Longitud del paso de luz
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
mg/kg	Miligramos / Kilogramo
nm	Nanómetros
PBS	Tampón fosfato salino

<b>RPM</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RAST</b>	<b>Radioalergosorbent test.</b>
<b>SAO</b>	<b>Síndrome de alergia oral</b>
<b>SDS</b>	<b>Duodecilsulfatosódico</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida –duodecilsulfatosódico.</b>
<b>TBS</b>	<b>Tampón Tris salino</b>
<b>TGI</b>	<b>Tracto gastrointestinal</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris hidroximetil –Aminometano</b>
<b>Tween 20</b>	<b>Polioxietileno-sorbitan monolaurato</b>
<b>UI</b>	<b>Unidad Internacional</b>
<b>UV</b>	<b>Luz ultravioleta</b>
<b>V</b>	<b>Voltios</b>
<b>VIS</b>	<b>Luz visible</b>
<b>WAO</b>	<b>World Allergy Organization</b>
<b><math>\lambda</math></b>	<b>Longitud de onda</b>
<b><math>\mu</math>l</b>	<b>Microlitros</b>

## INDICE

<b>I. PROLOGO</b> .....	17
<b>II. JUSTIFICACION DE ESTE ESTUDIO</b> .....	23
<b>III.</b>	
<b>INTRODUCCION</b> .....	27
III.1. Alergia alimentaria.....	29
III.1.1. Alimentos causantes de alergia.....	30
III.1.2. Epidemiología.....	32
III.1.3. Reacciones adversas a los alimentos.....	32
III.1.4. Alergia alimentaria mediada por IgE.....	35
III.1.5. Alergia alimentaria no mediada por IgE.....	37
III.1.6. Alérgenos alimentarios.....	37
III.1.7. Medidas de evitación.....	40
III.2. Crustáceos.....	42
III.2.1. Características generales.....	42
III.2.2. Anatomía de los crustáceos.....	45
III.2.3. Clasificación.....	50
III.2.4 Eumalacostráceos (camarón, gamba, langostino. etc).....	51
III.2.5 Características de los Eumalacostráceos.....	51
III.3. Alergia a crustáceos.....	52
III.3.1. Principales estudios realizados con distintas especies.....	53
III.3.2. Evolución histórica.....	56
III.3.3. Alérgeno mayor: la tropomiosina.....	63
III.4. Reactividad cruzada (RC).....	66
III.4.1. RC de la cucaracha y otros artrópodos.....	67
III.4.2. RC entre alérgenos de la cucaracha y proteínas de otros invertebrados.....	68

III.4.3. Tropomiosina, responsable de la RC entre diferentes alérgenos de naturaleza animal.....	69
III.4.4. La alergia a ácaros-marisco y la inmunoterapia específica.....	72
III.5. Manifestaciones clínicas .....	72
III.5.1. Síntomas cutáneos: Urticaria y angioedema.....	73
III.5.2. Síndrome de alergia oral (SAO).....	74
III.5.3. Síntomas digestivos.....	75
III.5.4. Síntomas respiratorios.....	76
III.5.5. Anafilaxia.....	77
III.5.6. Diagnóstico diferencial.....	78
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
V.1. Selección de los pacientes.....	87
V.1.1 Demografía de Álava.....	87
V.1.2 Criterios de exclusión de la muestra.....	88
V.1.3 Características de la muestra.....	89
V.1.4 Localización de la muestra a estudio, firma del consentimiento informado, realización de pruebas cutáneas y extracción de sangre.....	90
V.1.5 Selección del control positivo y del control negativo.....	91
V.1.6. Diseño del estudio.....	92
V.2. Variables a estudio.....	92
V.3 Material.....	93
V.3.1 Obtención de las distintas especies de crustáceos.....	93
V.3.2. Etiquetas identificativas.....	97
V.3.3. Productos químicos según su etiqueta identificativa.....	104

V.3.4. Formatos y categorías usados en la venta mayorista.....	105
V.3.5. Realización de alícuotas y conservación.....	107
V.3.6. Codificación de los datos.....	107
V.3.7. Realización de los extractos.....	110
V.3.8. Prick test con extractos comerciales(neumoalérgenos)...	112
V.4 Métodos.....	113
V.4.1. Pruebas cutáneas. Prick by prick.....	113
V.4.2. Extracción y almacenamiento de los sueros.....	115
V.4.3. IgE específica para camarón (F24) y langosta (F80).....	115
V.4.4. Cuantificación de las proteínas de los extractos mediante el sistema Bio-rad® proteín assay en placa microtiter®.....	118
V.4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)...	124
V.4.6. Inmunoblotting.....	131
V.4.6.1. Generalidades del inmunoblotting.....	131
V.4.6.2. Inmunoblotting: protocolo usado con los extractos	133
a) Bloqueo de la membrana.....	134
b) El 1 <sup>er</sup> anticuerpo.....	135
c) El 2 <sup>o</sup> anticuerpo (Sigma®).....	135
d) Sustrato de la peroxidasa: Luminol.....	136
e) Sistema de revelado.....	137
f) Resumen.....	138
V.4.7. Análisis estadístico.....	138
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>139</b>
VI.1. Características de la muestra: Datos demográficos.....	141
VI.2. Análisis descriptivo de las pruebas in vivo: prick test.....	144
VI.2.1. Asignación de un número a cada una de las especies y variedades de crustáceos, así como su nombre comercial y	

científico.....	144
VI.2.2. Resultados de las pruebas cutáneas prick by prick.....	145
VI.2.3. Análisis descriptivo de los resultados agrupados.....	155
VI.2.4. Resultados con las cabezas de los crustáceos.....	158
VI.2.5. Resultados con los cuerpos de los crustáceos.....	160
VI.2.6. Resultados de los valores del diámetro de las pápulas...	161
VI.3. Análisis descriptivo de las pruebas in vitro.....	164
VI.3.1. IgE específica.....	164
VI.3.2. Cuantificación de proteínas.....	167
VI.3.3. SDS PAGE.....	169
VI.3.3.1. SDS PAGE con las cabezas de los crustáceos.....	170
VI.3.3.2. SDS PAGE con los cuerpos de los crustáceos.....	178
VI.3.3.3. Análisis de los resultados del SDS PAGE.....	186
VI.3.4. Inmunoblotting.....	189
VI.3.4.1. Puesta a punto de la técnica.....	189
VI.3.4.2. Resultados del Inmunoblotting.....	191
<b>VII. DISCUSION.....</b>	<b>217</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>229</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>233</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>251</b>
• ANEXO 1: Alérgenos de la gamba ( <a href="http://www.allergome.org">www.allergome.org</a> ).....	253
• ANEXO 2: Reactividad cruzada ( <a href="http://www.allergome.org">www.allergome.org</a> ).....	255
• ANEXO 3: Consentimiento informado.....	259
• ANEXO 4: Aditivos alimentarios.....	261

# **I. PROLOGO**

---



## I. PROLOGO:

La alergia alimentaria es, hoy por hoy, un problema en auge, debido a múltiples causas, como son la aparición de productos transgénicos, la utilización de distintos conservantes, estabilizantes, emulgentes, potenciadores del sabor e infinidad de productos químicos, que conservan y modifican la calidad del producto, la aparición de “comida basura”, y por último la industrialización, que hace posible la adquisición de infinidad de productos, que antes sólo se consumían durante una determinada época del año,. Así mismo, el medio ambiente, también influye sobre los seres vivos, que habitan en él, de hecho, actualmente existe un aumento de Anisakis, nematodo que parasita peces teleósteos y cefalópodos, hecho que podría explicarse por el aumento de la temperatura del agua del mar.

Cada país, tiene una cultura específica e idiosincrásica que influye en las costumbres dietéticas. En nuestro país, el consumo de crustáceos es muy frecuente, de ahí, que la continua exposición a sus alérgenos hace posible la sensibilización. En otros países, como por ejemplo China es muy frecuente la sensibilización a la sopa de nidos de golondrina, un plato típico de dicha zona.

Pues bien, si en nuestro país es frecuente el consumo de crustáceos, y también las reacciones alérgicas a alimentos, es lógico pensar, que nos enfrentamos ante una patología cada día más frecuente y que, como siempre, tenemos que estar a la vanguardia de las últimas actualizaciones, ofreciendo al paciente el mayor abanico terapéutico de posibilidades.

La actual praxis médica de cualquier Servicio de Alergia de

España, en la que un paciente acude por sospecha de alergia alimentaria a crustáceos, se inicia con una historia clínica detallada, para verificar posteriormente la sensibilización a dicho alimento mediante 2 procedimientos. Bien sea mediante la realización de un prick test con un extracto estandarizado de una casa comercial, que contiene los alérgenos mayores de dicho crustáceo o bien, se realiza una prueba cutánea de alergia llamada *prick by prick* con una única variedad del alimento sospechoso, que el propio paciente obtiene en un supermercado.

En el primer supuesto, los pacientes pueden no estar sensibilizados a alérgenos mayores presentes en el extracto comercial, sino a menores de dicho crustáceo, por lo que se obtendría un resultado negativo en las pruebas cutáneas, a pesar de presentar una relación causa-efecto clara en la historia clínica. En el segundo supuesto, es posible que al paciente traiga a la consulta una especie diferente que la que le produjo la reacción alérgica, por lo que de nuevo las pruebas cutáneas podrían resultar negativas. De ahí, la pericia del alergólogo para adecuar los resultados de las pruebas cutáneas con la historia clínica.

De hecho, aquellos pacientes sensibilizados mediante prick test a una determinada especie de langostino, podrían tolerar perfectamente otras variedades, por lo que no sería necesaria la evitación de todos los crustáceos de su dieta, sino que se limitaría a evitar aquellas especies a las que estuviera sensibilizado. Esta característica no es aplicable a todos los pacientes, sino a aquellos que cumplen unas características determinadas y por tanto, serían pacientes seleccionados, a los que se les debería realizar un estudio con mayor profundidad, mediante la realización de pruebas de alergia in vivo e in vitro con las variedades de langostino que existen en su área geográfica. No obstante, si la historia clínica es sugestiva de alergia alimentaria, independientemente del

resultado, la recomendación terapéutica, se limita a la evitación de la ingesta, ya que actualmente no existen tratamientos específicos con vacunas a alérgenos alimentarios.

Por todas las razones mencionadas anteriormente, nos planteamos el estudio de un grupo de pacientes con alergia a crustáceos con el objetivo de conocer si la actual praxis médica se adecúa a todos los pacientes. Un pequeño porcentaje de la población alérgica a crustáceos no tiene alergia a la tropomiosina, alergeno mayor, común en todos los crustáceos, por lo que en estos pacientes sería necesario realizar un estudio más a fondo, para determinar cuál es el principal antígeno responsable de su alergia alimentaria. Para seleccionar a estos pacientes de la población alérgica a marisco, sería necesario realizar prick test con una batería de ácaros de depósito. Si dichas pruebas fueran negativas indicaría que el paciente no está sensibilizado a la tropomiosina, proteína muscular común en los crustáceos y en los ácaros (Der p 10 y Der f 10). En este supuesto, el paciente está sensibilizado a un alergeno menor que no está presente en todos los crustáceos.

Este estudio intenta modificar las pautas terapéuticas realizadas en el momento actual, así como mejorar el diagnóstico de un pequeño porcentaje de pacientes sensibilizados a alergenos menores de los crustáceos.



## **II. JUSTIFICACION DE ESTE ESTUDIO**

---



## II. JUSTIFICACIÓN DE ESTE ESTUDIO:

En España, la alergia al pescado constituye el 18% de todos los casos de alergia alimentaria en niños, de éstos el 3,8% son debidos a crustáceos<sup>1</sup>. Se podría considerar la primera causa de alergia entre los alérgenos derivados de animales, a excepción del huevo y la leche. Según Castillo<sup>2</sup>, la prevalencia de su sensibilización va íntimamente unida a la frecuencia de su consumo. No obstante, la ingesta no es siempre la responsable de la sensibilización a alimentos. Fernandes<sup>3</sup> en el año 2003, demuestra que una población judía ortodoxa, cuyas leyes les prohíben comer marisco, está sensibilizada a langostinos.

Por otra parte, en adultos, las reacciones de hipersensibilidad tras la ingestión de marisco constituye una de las causas de alergia alimentaria más frecuente<sup>4</sup>, y dentro de los mariscos, la gamba y el langostino ocupa un lugar prevalente, por lo que han sido objeto de numerosos estudios, tanto para identificar sus alérgenos mayores, como para determinar su reactividad cruzada con otros animales, fundamentalmente con artrópodos (ácaros<sup>5</sup>, cucarachas<sup>6-7</sup>, insectos<sup>8-9</sup>...). Los pacientes pueden desarrollar urticaria, angioedema, asma y cuadros de anafilaxia<sup>10-12</sup>. Hoffmann et al<sup>13</sup> demostraron la presencia de antígenos termoestables y termolábiles en el langostino. El antígeno termoestable fue identificado con un peso molecular de unos 28 kDa. En varios estudios se ha identificado el alergeno del langostino como una proteína muscular, la tropomiosina<sup>8,9,14</sup>, que es el responsable de la mayoría de las reacciones alérgicas por marisco. Esta proteína es común en todos los crustáceos, por lo que los pacientes que están sensibilizados a esta proteína, deberían presentar pruebas cutáneas positivas en prick test con todos los crustáceos testados. Sin embargo, aunque teóricamente debería ser así, algunos pacientes tienen pruebas cutáneas positivas con algunas

variedades de langostino y negativas con otras. Por eso, en algunas ocasiones existe una discordancia entre la teoría y la práctica médica. Esta discordancia, nos indujo, a realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, no encontrando en la literatura actual ningún estudio que compare la alergenicidad de diferentes variedades de langostino.

En abril de 2006, se publicó un artículo en el que se comparaban la alergenicidad de 10 variedades diferentes de manzanas, encontrando diferencias estadísticamente significativas<sup>15</sup>. Esto indica que aunque existen proteínas comunes a determinados alimentos, existen otros alérgenos específicos de cada variedad. Con este estudio descriptivo intentaremos comprobar si los resultados obtenidos en el citado artículo con las distintas variedades de manzana podría extrapolarse a otros alimentos, en este caso, los crustáceos.

## **III.INTRODUCCION**

---



### **III. INTRODUCCIÓN:**

#### **III.1. ALERGIA ALIMENTARIA.**

Las personas que sufren alergia alimentaria presentan síntomas al tomar alimentos que para la gran mayoría de la población forman parte de una dieta saludable. Incluso en pequeñas cantidades, los alimentos implicados pueden causar reacciones graves, e incluso mortales, a las personas susceptibles. Afortunadamente, en la mayoría de los casos no se produce la muerte, sino una serie de síntomas que pueden afectar a la piel, tubo digestivo, aparato respiratorio, ojos y sistema nervioso central. Para el paciente alérgico, la única forma de evitar la alergia alimentaria es no consumir los alimentos que le causan la reacción alérgica. En la práctica, esto puede resultar difícil. La alergia alimentaria afecta a la calidad de vida y a la economía de quienes las padecen, así como a la economía de la industria alimentaria. Por consiguiente, constituyen un problema tanto para los pacientes como para todos aquellos que participan en el suministro y preparación de alimentos, tales como sus familiares y amigos, los restauradores y la industria alimentaria.

La Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) publicó el 9 de junio de 2006 una nota informativa sobre alergia alimentaria. En ella se hace referencia a la seguridad de los alimentos modificados genéticamente, mediante recombinación del ADN, ya que contienen nuevas proteínas que pueden suponer un riesgo para los individuos con alergia alimentaria. Los principios y directrices de la Comisión del Codex Alimentarius sobre los alimentos de origen biotecnológico recomiendan un procedimiento de evaluación del potencial alergénico de las nuevas proteínas expresadas, cuyo objetivo es detectar las nuevas proteínas que puedan causar alergia.

### III.1.1. Alimentos causantes de alergia.

Se han identificado más de 70 alimentos causantes de alergia. Varios estudios indican que el 75% de las reacciones alérgicas en los niños se deben a un número reducido de alimentos: huevos, leche, cacahuete y otros frutos secos. Las frutas, las verduras, los cacahuetes y otros frutos secos y los crustáceos son los responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas de los adultos. Los pacientes con alergia al polen o al látex sufren a menudo síntomas alérgicos cuando comen determinadas frutas, vegetales o frutos secos<sup>16</sup>. Esta “reactividad cruzada” se debe a que el organismo no distingue los alérgenos del polen y del látex de otras proteínas similares presentes en los alimentos y reacciona frente a ellas. En Europa y en los EE.UU., los alimentos implicados con más frecuencia en reacciones potencialmente mortales son los cacahuetes y otros frutos secos.

El Comité sobre Etiquetado de los Alimentos de la Comisión del Codex Alimentarius ha elaborado una lista de los alimentos e ingredientes responsables de las reacciones más graves y de la mayoría de los casos de hipersensibilidad a los alimentos. La Norma General para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados establece que los siguientes alimentos e ingredientes causan hipersensibilidad y deberán declararse siempre como tales:

- Cereales que contienen gluten, como por ejemplo: trigo, cebada, centeno, avena (y espeleta) o cepas híbridas, y productos de éstos; crustáceos y sus productos;
- Huevos y derivados.
- Pescados y productos pesqueros
- Maní (cacahuete), soja y sus productos

- Leche y productos lácteos (incluida lactosa)
- Nueces de árboles y sus productos derivados
- Sulfito en concentraciones de 10 mg/kg o más.

Aunque la lista del Codex, contiene los alérgenos más destacados, a nivel mundial, la prevalencia de la alergia alimentaria es variable según la zona geográfica. Algunos países han optado por incluir otros alimentos en sus listas nacionales de alimentos e ingredientes que deben ser declarados en las etiquetas de los alimentos. En la Unión Europea, por ejemplo, a la lista de alérgenos que deben figurar en la etiqueta de los alimentos se han añadido el apio, la mostaza y las semillas de sésamo.

El procesamiento y la preparación de los alimentos, así como la matriz alimentaria pueden incrementar o reducir el potencial alérgico. No obstante, los datos existentes en la actualidad son insuficientes para que se puedan hacer recomendaciones generales sobre cómo preparar los alimentos y qué matriz alimentaria utilizar con el fin de aumentar la inocuidad de un alimento para los pacientes alérgicos.

Las pruebas de provocación con alimentos han proporcionado alguna información acerca de las cantidades de alérgeno que pueden desencadenar efectos adversos en un individuo. En general, las dosis oscilan entre cientos de microgramos y gramos de proteína<sup>16</sup>. Sin embargo, por motivos éticos, no se suelen efectuar pruebas de este tipo en pacientes que ya han sufrido reacciones potencialmente mortales, entre los que probablemente se encuentren los individuos más sensibles. En algunos informes de casos se han descrito reacciones potencialmente mortales inducidas por alimentos tras la exposición a partículas alimentaria transportadas por el aire o través de besos, pero no se han establecido las cantidades que han provocado esas reacciones.

Por consiguiente, con los datos existentes, resulta imposible sacar conclusiones firmes acerca del umbral de dosis de un alérgeno que es seguro para todas las personas alérgicas a un determinado alimento.

### **III.1.2. Epidemiología de la alergia alimentaria.**

La prevalencia estimada de la alergia alimentaria en la población general es del 1% al 3% en los adultos y del 4% al 6% en los niños. No obstante, resulta difícil determinar su prevalencia exacta porque en los distintos estudios se han utilizado metodologías diferentes y su incidencia se modifica con la edad. La alergia al huevo y la leche son las más frecuentes en los lactantes, pero generalmente desaparecen con el tiempo. La alergia a los mariscos es más frecuente en los adultos que en los niños, mientras que la alergia al cacahuete (también llamado maní) es igual de frecuente en ambos grupos de edad.

### **III.1.3. Reacciones adversas a los alimentos.**

Durante mucho tiempo ha existido una gran confusión en el concepto de alergia alimentaria, ya que se ha aplicado el término “alergia” para designar distintos síntomas y enfermedades inespecíficas y, por otra parte, no existía uniformidad de criterios respecto a la terminología utilizada para designar las diversas reacciones adversas por alimentos.

En 1984, el Comité de Reacciones Adversas a Alimentos de la Academia Americana de Alergia e Inmunología Clínica y el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas publicaron el Manual of Adverse Reactions to Foods donde se establece una nomenclatura de los distintos tipos de reacciones adversas por alimentos, clasificándolas en reacciones alérgicas a alimentos y reacciones de intolerancia.

En 1995, el Subcomité de Reacciones Adversas a Alimentos de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) elaboraron un documento de opinión en el que se proponía una nueva clasificación de las reacciones adversas a alimentos<sup>17</sup> basándose principalmente en los mecanismos implicados en dichas reacciones (Figura 1). Se define como reacción adversa a alimentos cualquier reacción anómala producida por la ingestión de un alimento. Tales reacciones pueden ser tóxicas, considerando así a aquellas que pueden afectar a cualquier individuo cuando se administra una dosis suficiente, y no tóxicas, siendo estas últimas las que dependen de una susceptibilidad individual. Las reacciones no tóxicas las clasifican en reacciones mediadas por mecanismos inmunológicos o alergia y reacciones no mediadas por mecanismos inmunológicos o intolerancia. A su vez, subclasifican las reacciones mediadas inmunológicamente o reacciones alérgicas en reacciones mediadas por la IgE y reacciones mediadas por otros mecanismos inmunológicos en los que no participa la IgE. Dentro de las reacciones de intolerancia encontramos reacciones debidas a mecanismos enzimáticos, como es el caso de algunas enfermedades metabólicas como, por ejemplo, el déficit de lactasa; debidas a mecanismos farmacológicos, ya sea por sustancias añadidas a los alimentos o presentes en ellos de forma natural, como es el caso de las aminas vasoactivas o la tiramina de algunos quesos; y por último, reacciones de intolerancia por mecanismos indeterminados. Esta clasificación ha estado vigente durante muchos años, y todavía en la actualidad sigue siendo aplicada por prestigiosos autores en el campo de la alergia a los alimentos.

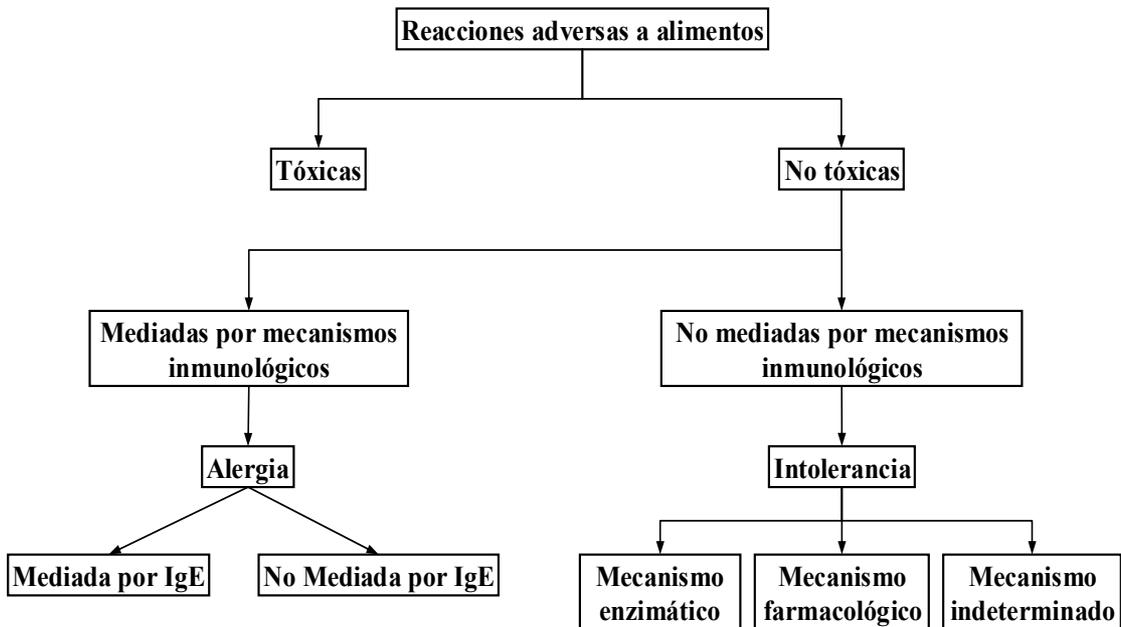


Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos según la EAACI <sup>17</sup>.

En el año 2001, la Comisión de Nomenclatura de la EAACI revisa las definiciones de las reacciones adversas a alimentos, proponiendo una nueva nomenclatura. En estas recomendaciones se propone que cualquier reacción adversa a alimentos se defina como hipersensibilidad a alimentos; dentro de éstas las reacciones mediadas por mecanismos inmunológicos se definen como alergia a los alimentos, y las reacciones no mediadas por mecanismos inmunológicos se definen como “hipersensibilidad no alérgica a alimentos” (previamente conocida como intolerancia). La alergia a los alimentos se clasifica en alergia mediada por IgE y alergia no mediada por IgE. La primera, se refiere a las reacciones de hipersensibilidad por alimentos que se producen por anticuerpos IgE específicos frente a un determinado alimento, confirmado por pruebas in vivo / in vitro, con una correlación con los síntomas del paciente y/o las pruebas de provocación.

En octubre de 2003, esta última nomenclatura es revisada y refrendada por el comité de revisión de nomenclaturas de la Organización Mundial de Alergia<sup>18</sup> (WAO) y se muestra en la Figura 2.

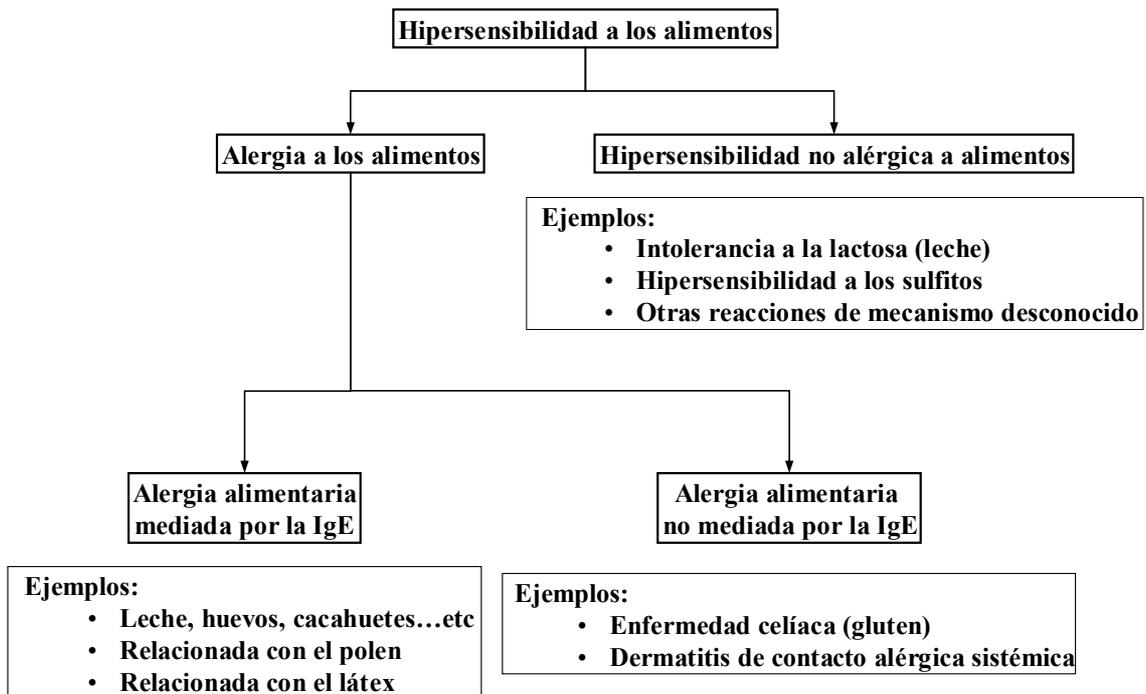


Figura 2. Nomenclatura de las reacciones adversas a los alimentos según la WAO<sup>18</sup>.

### III.1.4. Alergia alimentaria mediada por IgE.

El desarrollo de alergia alimentaria se produce en varios pasos y requiere repetidas exposiciones a un determinado antígeno alimentario. La respuesta inmune mediada por IgE tiene 3 fases: fase de sensibilización, fase efectora y una fase crónica.

En la fase de sensibilización, tras la absorción y procesamiento del antígeno por las células CPA (células dendríticas, macrófagos y LB),

éstas presentan los péptidos antigénicos a los LT CD4+ vírgenes. Bajo la influencia de determinadas citocinas (IL-4 e IL-13), estos LT Th0 vírgenes se transforman en linfocitos Th2, los cuales son necesarios para la transformación de LB en células plasmáticas productoras de IgE frente al antígeno. En esta fase, ausente de manifestaciones clínicas, se genera IgE frente al alimento al que se ha expuesto el paciente, ya sea por vía oral, importante mecanismo en los recién nacidos, o por vía inhalada, de relevancia en los niños mayores y adultos<sup>19,20</sup>.

En la fase efectora, la exposición antigénica recurrente induce la unión de moléculas de IgE a los receptores de alta afinidad para IgE que expresan mastocitos y basófilos. Esto desencadena su activación y la posterior liberación de mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos...). Esta respuesta inmunológica desencadena, a su vez, una respuesta tisular responsable de síntomas clínicos a nivel de piel y mucosas oculares, nasales, bronquiales, y del tracto gastrointestinal (TGI). Esta fase aguda que ocurre de segundos a minutos tras la exposición al antígeno puede estar seguida de una reacción de fase tardía a las 2 a 24 horas de esta exposición caracterizada por una infiltración celular del tejido por granulocitos (basófilos y eosinófilos) y linfocitos (principalmente Th2)<sup>21,22</sup>.

En la fase crónica, aparece como resultado de sucesivas fases tardías. La patogenia de esta inflamación crónica se basa en un conjunto de células y citocinas tipos Th1 y Th2 acompañados de dilatación arteriolar, aumento de la permeabilidad vascular, estimulación de nervios sensitivos y alteración de la función del TGI.

### **III.1.5. Alergia alimentaria no mediada por IgE.**

Se ha observado una hiperplasia linfonodular en el íleon en varias enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa) así como en la alergia alimentaria<sup>23</sup>, y existen estudios que definen la hiperplasia linfonodular como posible marcador del aumento de la respuesta inmunológica en el TGI<sup>24</sup>. También se observan en pacientes con alergia alimentaria no mediada por IgE un patrón de alteración inmunológica consistente en un aumento de linfocitos CD4+ y una disminución de células Th1 en sangre periférica. Por el contrario, en los pacientes celíacos, se observa un aumento de células CD8+ y células Th1 en sangre periférica y un aumento de linfocitos CD8+ en la mucosa yeyunal<sup>25</sup>.

### **III.1.6. Alérgenos alimentarios.**

Los alérgenos alimentarios son de origen animal o vegetal, siendo muchos de ellos compartidos por diferentes familias botánicas o zoológicas. Cada alimento contiene un número importante de proteínas potencialmente alergénicas, existiendo entre éstas antígenos mayores o principales y antígenos menores o secundarios, distinción que depende de la frecuencia con que estos antígenos sean los responsables de la sensibilización del alimento. Un alérgeno mayor se define como aquel que fija IgE específica en al menos el 50 % de los sueros de pacientes sensibilizados a un alimento. Una vez identificados los alérgenos, la IUIS (Internacional Union of Immunology Society) ha dado unas normas de nomenclatura para que exista uniformidad en las denominaciones<sup>26</sup>.

La parte de alérgeno que es reconocida por la IgE específica se denomina epitopo, que es diferente al epitopo que reconocen las poblaciones de linfocitos T. Los alérgenos tienen epitopos comunes para

diferentes clases de inmunoglobulinas (IgE, IgG, IgA, IgM), pero en otras ocasiones son selectivos para una sola clase<sup>27</sup>. La mayoría de los epitopos conocidos para la IgE son secuenciales, es decir, el orden de secuencia de aminoácidos da lugar al reconocimiento por parte de la IgE. Estos epitopos son muy resistentes al calor y a la acción enzimática, mientras que los epitopos que dependen de la estructura terciaria “conformacionales” son más lábiles a la temperatura y la digestión enzimática.

Si los comparamos con los neumoalérgenos (ácaros, pólenes, epitelios, mohos, etc.), se ha profundizado poco en el estudio fisico-químico y purificación de los antígenos (alérgenos) alimentarios. A pesar de ello, en los últimos años los estudios sobre alérgenos alimentarios están adquiriendo una relevante importancia bajo la influencia de los comités de estandarización de la IUIS. Todos los alérgenos que están involucrados en reacciones IgE dependientes son proteínas. En general, los alérgenos alimentarios son glucoproteínas, es decir, poseen una o más moléculas de azúcares unidos a las cadenas de aminoácidos. Estos alérgenos representan una mínima porción del alimento y poseen una gran potencia biológica, por lo que pequeñas cantidades son suficientes para desencadenar síntomas importantes y también producir una respuesta cutánea positiva, en las personas sensibilizadas<sup>12</sup>. En cuanto a sus características fisico-químicas, poseen un peso molecular relativamente bajo, entre 12 y 35 kDa<sup>28</sup> (kilodaltons), y frecuentemente estabilidad frente al calor, al pH ácido y a enzimas proteolíticas, propiedades en general que favorecen la llegada de las moléculas de forma intacta a la superficie de absorción del intestino delgado, aunque no siempre esto sucede así.

La compleja diversidad proteica que se encuentra en los alérgenos alimentarios se puede estudiar por diferentes técnicas, como la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), el isoelectroenfoque (IEF), el *immunoprint* en geles de agarosa, el *immunoblotting* en geles de poliacrilamida, la inmunoelectroforesis cruzada radiactiva (CRIE), la cromatografía de intercambio iónico y la filtración en gel. En el último lustro se ha iniciado la aplicación de tecnología de biología molecular al estudio inmunoquímico de los alérgenos, habiendo sido clonados y secuenciados diferentes alérgenos, hecho que ha permitido conocer su estructura primaria, su función biológica y su homología con otras proteínas. Esta metodología permite producir el alérgeno purificado en grandes cantidades.

Los alérgenos alimentarios pueden ser modificados (desnaturalización) por la acción del calor, mediante cocción u otra forma de calentamiento por encima de los 60°C, reduciendo su alergenicidad<sup>29</sup> e incluso en ocasiones aumentándola<sup>30</sup>. El calor aplicado al envasado de latas de atún, que puede llegar hasta 120° C, hace que éste sea bien tolerado en pacientes con sensibilización al atún<sup>31</sup>.

La digestión o hidrólisis enzimática modifica también los alérgenos alimentarios, dando lugar a neoantígenos que pueden ser sensibilizantes o, por el contrario, perder esta capacidad, aunque parece más frecuente que la sensibilización a estos neoantígenos se acompañe de sensibilización al antígeno no digerido. La alergenicidad del cacahuete y la soja disminuye 100 y 10 veces, respectivamente, si se somete a la acción de tripsina y pepsina<sup>32</sup>.

En algunos grupos de alimentos, principalmente entre alimentos vegetales, la sensibilización a un miembro del grupo implica de forma

más o menos frecuente la sensibilización a otro/s miembro/s de la familia, denominándose este fenómeno como “reactividad cruzada”. Se debe a la presencia de antígenos “alérgenos” comunes entre ellos, como por ejemplo en el caso del melocotón y el albaricoque, los crustáceos y los ácaros...etc. A pesar de los diferentes estudios sobre el tema, no se ha establecido completamente el valor clínico de esta reactividad cruzada. Se ha descrito también la reactividad cruzada de alimentos vegetales con pólenes de diversas plantas, como, por ejemplo, el polen de gramíneas y trigo, patata, manzana, tomate, melón y apio; el polen de abedul y manzana, patata, zanahoria, naranja, nuez y avellana, y el polen de ambrosia y plátano, sandía, pepino y calabacín<sup>33-36</sup>. Las profilinas son unas proteínas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se ha sugerido la posibilidad de que sean las responsables de la reactividad cruzada entre los diferentes vegetales, hecho que le ha valido la designación de “panalergeno”<sup>37</sup>.

### **III.1.7. Medidas de evitación de los pacientes con alergia alimentaria.**

Un primer paso importante para proteger a los pacientes con alergia alimentaria radica en la concienciación de los funcionarios de la administración pública en materia de salud y alimentación y de quienes participan en el suministro y la preparación de alimentos. Para gestionar los riesgos de los alérgenos, los fabricantes deben tener un amplio conocimiento de los ingredientes y los posibles contaminantes de los productos alimentarios. Un alimento inocuo desde el punto de vista alérgico puede estar contaminado por alérgenos, por ejemplo cuando el producto es procesado con el mismo equipo que otros productos que contienen alérgenos y no se efectúa una limpieza adecuada entre la elaboración de los distintos productos. Existen directrices para la industria alimentaria acerca de los aspectos esenciales que deben tomar

en consideración para gestionar los riesgos de los alérgenos. Comer fuera de casa suele ser un riesgo para las personas alérgicas. Existen consejos para los restauradores acerca de lo que pueden hacer para reducir el riesgo de que sus clientes sufran reacciones alérgicas. El principal consejo es comprobar siempre cuidadosamente los ingredientes antes de asesorar a un paciente con alergia alimentaria.

En los Estados Unidos de América y Europa se están efectuando estudios para conocer mejor la verdadera prevalencia de la alergia alimentaria. Los resultados de estos estudios ayudarán a elaborar mejores directrices para la protección de los individuos con alergias alimentaria. Estas personas tienen que saber qué comidas deben evitar y necesitan información fiable y fácil de encontrar acerca de los ingredientes de los alimentos que compran. La ingestión de cantidades muy pequeñas de un ingrediente al que sean alérgicos puede resultar mortal.

En la actualidad, el tratamiento de la alergia alimentaria se basa en la eliminación estricta de la dieta del alimento responsable y el tratamiento de los síntomas ante su ingestión accidental.

La desensibilización oral es una posibilidad terapéutica para conseguir adelantar la tolerancia clínica total o parcial en los pacientes con alergia alimentaria, con resultados iniciales prometedores con la leche de vaca, aunque son necesarios nuevos estudios con el fin de valorar su seguridad y eficacia.

## **III.2. LOS CRUSTÁCEOS.**

Tras una visión general de la alergia alimentaria, se procede a analizar un grupo de alimentos que son el objetivo de nuestro estudio: los crustáceos. Este apartado incluye las características generales de los crustáceos, anatomía y clasificación.

### **III.2.1. Características generales de los crustáceos.**

Los crustáceos constituyen uno de los recursos de mayor importancia dentro de las pesquerías mundiales. Se trata de un grupo heterogéneo de animales por lo que resulta difícil hacer una sola descripción para la gran diversidad de formas que presenta. Son invertebrados que pertenecen al grupo de artrópodos por tener sus apéndices formados por pequeñas pinzas articuladas con su cuerpo segmentado y cubierto de un tegumento quitinoso muy calcificado, por lo que presentan aspecto de una costra y reciben el nombre de crustáceos.

En su cuerpo se distinguen dos regiones principales: la llamada "cabeza", que resulta de la unión de la zona cefálica con el tórax, que forma un cefalotórax, y la "cola", que es el abdomen. Estas regiones están formadas por un número diferente de segmentos y en cada uno de ellos se localiza un par de apéndices o "patas" que se designan de acuerdo con la función que desempeñan y la región del cuerpo donde se hallan.

El abdomen puede estar extendido, como en el caso de los camarones, o doblado debajo del cefalotórax, como en los cangrejos, en los que termina en tres apéndices que forman la "nadadera caudal".

En la región cefálica llevan los apéndices sensoriales que son dos pares de antenas, los ojos que generalmente se encuentran sostenidos por unos pedúnculos y los apéndices al servicio de la boca que se abre en la región ventral y son un par de mandíbulas y dos pares de maxilas. Los apéndices del abdomen intervienen en la reproducción, en el transporte de los huevecillos y en el cuidado de la prole.

Los crustáceos son animales que toman el oxígeno disuelto en el agua para realizar su respiración, función que realizan por medio de unos órganos llamados branquias, localizados a los lados del cefalotórax. Estas se pueden modificar para tomar aire atmosférico, como sucede en los cangrejos que pasan largos periodos fuera del agua.

Su aparato digestivo es muy variable y son principalmente carnívoros, aunque en sus fases juveniles pueden ser herbívoros o filtradores de plancton. Generalmente son unisexuales, es decir que existen machos y hembras, pero hay algunas excepciones, como los percebes y las bellotas de mar que son hermafroditas.

Durante su desarrollo la mayoría de los crustáceos presenta transformaciones muy marcadas, pasan por varios estados larvarios antes de alcanzar el adulto, proceso al que se llama metamorfosis. Durante el crecimiento el animal se desprende y abandona el caparazón que originalmente lo cubre, aumenta de tamaño y forma otro nuevo; este fenómeno recibe el nombre de "muda".

Los crustáceos son un extenso subfilo de artrópodos, con más de 67.000 especies y sin duda faltan por descubrir hasta cinco o diez veces este número. Incluyen varios conocidos grupos animales, como las langostas, los camarones, los cangrejos, los langostinos y los percebes. Son fundamentalmente acuáticos y habitan en todas las profundidades,

tanto en el medio marino, salobre y de agua dulce; unos pocos han colonizado el medio terrestre, como la cochinilla de la humedad (isópodos).

Los océanos son la residencia más común de estos animales y, por su abundancia, tanto en especies como en individuos, algunos naturalistas los han llamado "insectos del mar", ya que se los encuentra en todos los parajes; algunos son de tamaños microscópicos, como los copépodos y otros alcanzan tallas de tres metros, como los cangrejos gigantes llamados "araña de mar de Japón".

Viven comúnmente en la zona marina que corresponde a la plataforma continental. Sin embargo, llegan a localizarse hasta en los fondos marinos profundos en donde, por lo general, se desplazan caminando; en algunas ocasiones en etapas juveniles pueden ser nadadores y en otras se encuentran fijos al fondo y a los objetos sumergidos.

Su biología está sometida a la influencia de los factores ambientales: temperatura, cantidad de oxígeno disuelto en el agua, luz y salinidad; así como a la de los factores bióticos, o sea la interacción con otros seres vivos. Además, se ha observado que muchas especies tienen una extraordinaria resistencia biológica que les ha permitido extenderse por todo el mundo. Esta característica es importante para cultivar a las especies de interés comercial.

Existe un gran número de crustáceos que son utilizados por el hombre como alimento; en el caso de los "copépodos", pequeños crustáceos del plancton, los consume de manera indirecta, por ser ellos la base de las cadenas de alimentación de otros animales marinos comestibles. Otros crustáceos, como los camarones, los cangrejos, las

langostas, las centollas, las cigalas, los carabineros, etc., son aprovechados directamente y revisten una importancia primordial para la economía del mar y de la industria pesquera. En general, debido a la excelente calidad de su carne, han alcanzado un elevado precio en el mercado internacional.

Se ha intentado el cultivo de las diferentes especies de crustáceos, el cual siempre es difícil, por lo menos si se trata de llevarlo a cabo de manera integral, desde la fecundación e incubación artificial hasta la consecución de ejemplares adultos. Los principales inconvenientes de dicho cultivo son: el complicado y largo desarrollo larvario, la existencia de sus fases de vida pelágica y porque su crecimiento se verifica con mudas. En esta última fase, se incrementan los porcentajes de mortalidad natural.

Pese a ello, en la actualidad se está consiguiendo dicho cultivo, en el caso del camarón que se realiza de manera industrial en Japón y de manera experimental en España. En México básicamente se ha tratado de mejorar el medio donde viven, dragando las bocas de las lagunas litorales y conectando los ríos con el fin de llevar el agua dulce necesaria para el crecimiento de las fases larvarias que viven en estas lagunas, como las de Nayarit, Mazatlán y el sur de Sonora. En Puerto Peñasco, Sonora, se ha logrado el cultivo del camarón rojo a nivel comercial.

### **III.2.2. Anatomía de los crustáceos.**

El tamaño de los crustáceos es muy variable, oscilando entre menos de 100  $\mu\text{m}$  y los 3 metros de envergadura (cangrejo araña del Japón, *Macrocheira kaempferi*).

El cuerpo está formado por un número variable de metámeros o segmentos intercalados entre el acron y el telson, más de 50 en grupos primitivos como cefalocáridos, diplostráceos y notostráceos; la tendencia evolutiva general es hacia la pérdida de metámeros; los malacostráceos tienen 19 ó 20, y los cladóceros y ostrácodos no más de 10.

El cuerpo está dividido normalmente en tres tagmas o regiones: céfalon (cabeza), tórax (pereion) y pleon (o abdomen), aunque normalmente los primeros segmentos del tórax se unen a la cabeza formando lo que se conoce como cefalotórax (Figura 3).

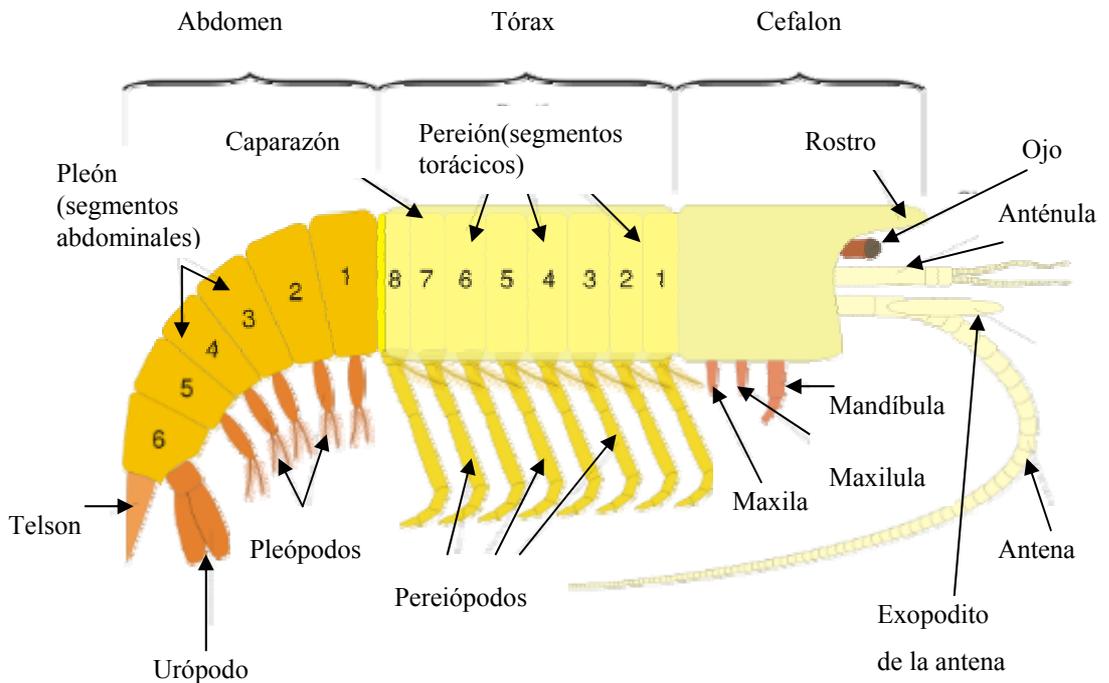


Figura 3. Anatomía de un crustáceo y las distintas partes en las que se divide: Abdomen, Tórax y Cefalon.

### a) Apéndices.

Todos los tagmas poseen apéndices; en las formas primitivas tienden a ser similares entre sí, mientras que en las más evolucionadas se transforman y se adaptan para funciones específicas. Excepto el primer par de antenas (anténulas), los demás apéndices son birrámeos, al menos en estado embrionario. Este tipo de apéndice posee una zona proximal de tres artejos (a veces reducidos a dos o a uno) llamada protopodio o simpodio, en la que se articulan dos ramas, una principal interna (endopodio) y otra secundaria externa (exopodio); el protopodio posee a menudo expansiones denominadas exitos, situadas en la parte externa, y enditos, además de epipodios foliáceos con función respiratoria. En algunos casos, dichas expansiones se desarrollan considerablemente y adquieren el papel preponderante del apéndice; por ejemplo, los grandes enditos de las mandíbulas, denominados gnatobases, se encargan de masticar el alimento. El exopodio desaparece en los decápodos, cuyos apéndices tiene, por tanto, apariencias unirrámeas.

Los apéndices de los crustáceos, a pesar de su gran diversidad, responden a los tipos estructurales básicos:

- **Estenopodios.** Son apéndices alargados, cilíndricos, robustos, con tegumento duro y con sus artejos bien articulados entre sí. Son las típicas patas marchadoras.
- **Filopodios.** Son apéndices foliáceos, aplanados, con tegumento delgado y con articulaciones poco marcadas. Sus funciones principales son la natación y el intercambio de gases.

### b) Céfalon o cabeza.

Como en los demás mandibulados (Mandibulata), la cabeza de los crustáceos se compone de cinco metámeros o segmentos<sup>160</sup> (seis para algunos autores), más o menos fusionados, más el acron. Los

tergitos de estos cinco segmentos se fusionan entre sí para formar un todo continuo llamado escudo cefálico o caparazón.

- **Acron.** No posee apéndices. Aloja el protocerebro y lleva los ojos, casi siempre son compuestos, ya sea asentados sobre el tegumento (ojos sésiles) o sobre un pedúnculo (ojos pedunculados).
- **Segmento antenular** (primer segmento). Contiene el deutocerebro y lleva el primer par de antenas o anténulas, que son unirrámeas. En los copépodos adquieren un gran desarrollo y diversificación, ya que además de órgano sensorial, las utilizan como remos para nadar y en algunos machos sirven para sujetar a la hembra durante el apareamiento.
- **Segmento antenal** (segundo segmento). Aloja el tritocerebro; lleva el segundo par de antenas, de función básicamente sensorial, pero en algunos grupos, como cladóceros, ostrácodos y en las larvas nauplio, son los principales apéndices locomotores.
- **Segmento mandibular** (tercer segmento). Lleva las mandíbulas; poseen enditos de tipo gnatobásico muy esclerotizados con función masticadora; puede existir un pequeño palpo mandibular.
- **Primer segmento maxilar** (cuarto segmento). Lleva el primer par de maxilas o maxílulas; su estructura es similar a la de las mandíbulas, con gantobase y palpo maxilular. En especies filtradoras hay abundantes sedas que retienen las partículas del agua; en especies carnívoras tienen forma de garra con las que capturan y manipulan las presas.
- **Segundo segmento maxilar** (quinto segmento). Lleva el segundo par de maxilas, denominadas simplemente maxilas, que poseen un palpo maxilar y son de estructura y función similares a las de las maxílulas.

Muchas veces, los primeros segmentos torácicos se fusionan con el

céfalon y sus apéndices actúan como piezas bucales adicionales denominadas maxilípedos. Los tergitos de estos segmentos también se fusionan entre sí, y con el caparazón, para formar el cefalotórax, aunque este término es a veces usado sólo en el caso que recubra todo el tórax, como en los eucáridos.

#### **d) Tórax y pereion.**

El tórax posee un número variable de segmentos o toracómeros; en la mayoría de grupos consta de ocho, aunque este número puede oscilar entre tres (ostrácodos) y once (notostráceos); cada toracómero posee con un par de apéndices llamados toracópodos. Cuando los primeros segmentos torácicos se fusionan con la cabeza, el conjunto de segmentos no fusionados recibe el nombre de pereion, cada uno de sus segmentos, pereionitos o pereiómero, y sus apéndices, pereiópodos. Como se ha dicho, los primeros toracópodos tienen tendencia a transformarse en apéndices bucales auxiliares (maxilípedos) y sirven para la manipulación del alimento. Los demás toracópodos (pereiópodos) suelen relacionarse con la locomoción (nadar o caminar). En algunos grupos, como los peracáridos, las hembras guardan los huevos entre los pereiópodos, en una especie de marsupio.

#### **e) Abdomen o pleon.**

El número de metámeros y apéndices del pleon es muy variable, desde uno (ostrácodos) hasta 22 en notostráceos (sin contar el telson). En muchos grupos el número de segmentos es de seis. Los cirrípedos carecen de pleon. Los segmentos del pleon se denominan pleómeros.

Los apéndices del pleon son los pleópodos, que suelen faltar en los crustáceos no malacostráceos, excepto el último par o urópodos. Los pleópodos tienen a menudo forma de pala y son utilizados para nadar.

### III.2.3. Clasificación de los crustáceos.

La clasificación exhaustiva de todos los crustáceos es ardua y compleja. El excelente trabajo de Joel W. Martin y George E. Davis en el año 2001, ha servido para poner un poco de orden a tan intrincado grupo. Dichos autores reconocen seis clases, algunas subdivididas en subclases:

#### 1. Clase Branchiopoda

- Subclase Phyllopoda (*Triops*, pulgas de agua, branquiópodos "bivalvos")
- Subclase Sarsostraca (*Artemia*)

#### 2. Clase Remipedia

#### 3. Clase Cephalocarida

#### 4. Clase Maxillopoda

- Subclase Mystacocarida (diminutos crustáceos intersticiales)
- Subclase Copepoda (copépodos)
- Subclase Branchiura (piojos de peces)
- Subclase Pentastomida (gusanos lengua, parásitos)
- Subclase Tantulocarida (parásitos marinos)
- Subclase Thecostraca (percebes, bellotas de mar y afines)

#### 5. Clase Ostracoda

- Subclase Myodocopa
- Subclase Podocopa

#### 6. Clase Malacostraca

- Subclase Phyllocarida
- Subclase Hoplocarida (galeras)
- Subclase Eumalacostraca (krill, camarones, cangrejos, gambas, langostas, cochinillas de humedad)

Dentro de la clasificación de los crustáceos, las gambas y langostinos, son el objetivo de este estudio, por lo que se procede a describir las características principales de la clase malacostraca, subclase eumalacostraca.

#### **III.2.4. Crustáceos: Clase Malacostraca. Subclase Eumalacostraca.**

Los eumalacostráceos (Eumalacostraca, del griego *eu*, "verdadero"; *malakos*, "blando" y *ostrakon*, "concha") son una subclase de malacostráceos del subfilo Crustacea. Agrupa unas 42.000 especies, casi todos los malacostráceos conocidos, lo que representa casi las dos terceras partes de los crustáceos conocidos. Contiene, entre otros, el orden Decapoda, que incluye a las especies de marisco más consumidas por el hombre, y por tanto, con más interés biológico.

#### **III.2.5. Características de los eumalacostráceos.**

Los eumalacostráceos, como la mayoría de los crustáceos, realizan la excreción a través de auténticos nefridios situados junto la boca (glándulas maxilares) o en la base de las antenas (glándulas antenales). Tienen típicamente 19 segmentos, 5 en la cabeza (cefalonitos), 8 en el tórax (toracómeros) y 6 en el pleon (pleonitos). En la mayoría de eumalacostráceos, los primeros segmentos del tórax se fusionan con la cabeza, de modo que el tórax parece que tenga menos segmentos; por ejemplo, en los decápodos, los tres primeros segmentos torácicos están fusionados con la cabeza y el tórax parece que tenga solo cinco toracómeros; se habla entonces de pereion; el pereion es, pues, el conjunto de segmentos torácicos no fusionados con la cabeza, y sus apéndices se denominan pereiópodos. Los apéndices de los segmentos fusionados no desaparecen, sino que se transforman en maxilípedos que colaboran en el procesado de los alimentos; siguiendo con el ejemplo de

los decápodos, con tres toracómeros fusionados y cinco libres (pereion), poseen tres maxilípedos y cinco pereiópodos. Los pereiópodos se usan para caminar (grupo Reptantia) o copular, el último segmento del pleon, el telson, ayudado por el resto de pleópodos, para nadar (grupo Natantia). Dentro de ellos se incluyen los camarones, cangrejos, gambas, langostas, cochinillas de la humedad, krill...etc. Véase la anatomía macroscópica de un eumalacostráceo (gamba) en la Figura 4.

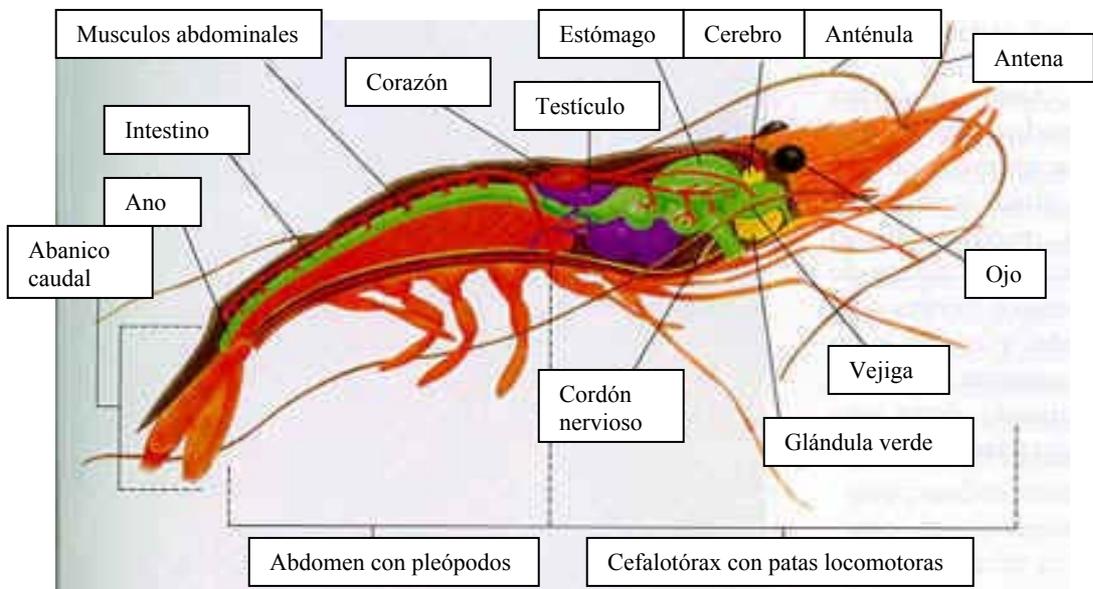


Figura 4. Anatomía macroscópica de un eumalacostráceo.

### III.3. ALERGIA A LOS CRUSTÁCEOS.

En este apartado nos referiremos a los principales alérgenos de los crustáceos responsables de la alergia, mediante el análisis de los diferentes estudios reflejados en la bibliografía, así como a las manifestaciones clínicas, tanto alérgicas como tóxicas derivadas de su consumo.

### **III.3.1. Principales estudios realizados con distintas especies de crustáceos.**

Antes de comenzar cualquier investigación sobre un determinado tema, es obligado realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica. En este caso, se comenzó buscando todos los diferentes estudios realizados con la palabra “shrimp”. Esta búsqueda nos puede llevar a una posible confusión, ya que la palabra “shrimp” tiene distintas acepciones. En este sentido, en la página web [www.wordreference.com](http://www.wordreference.com) se hace constar que si dicha palabra va seguida de la palabra “medium”, hace referencia al camarón o a la gamba; si va precedida de la palabra “small” hace referencia a camarón o a la quisquilla.

Por otra parte, la palabra inglesa “prawn” tiene, en algunos diccionarios, los significados de langostino, gamba (familia Penaeidae), quisquilla (familia Palaemonidae) y camarón (familia Decapoda) y, desde el punto de vista zoológico, son animales diferentes; a veces se encuentran estudios en los que no se dan los nombres científicos de los animales implicados lo que los invalida puesto que hay palabras genéricas, como gamba, que pueden referirse a una amplia variedad de especies. Tal es el caso, que por ejemplo, en España un animal miembro de la familia Penaeidae y género *Penaeus*, es conocido como langostino, mientras que el mismo en México es conocido como camarón; otro ejemplo es el caso del *Pleuroncodes monodon* conocido en Chile como langostino colorado o langostino zanahoria, mientras que el mismo es conocido en Perú como camaroncito rojo.

Por este motivo, se decide realizar una revisión bibliográfica desde el año 1979 hasta 1995, donde tras analizar un total de 32 artículos advertimos que se usa un mismo nombre vulgar (“shrimp” o “prawn”) para designar a distintos nombres científicos y por tanto diferentes especies. Véase la Tabla 1 donde se refleja el nombre científico, el nombre vulgar (shrimp/prawn), el autor y el año de la publicación.

Dado que resulta difícil traducir la palabra “shrimp” y que es utilizada en la bibliografía con diferentes acepciones como langostino, gamba, camarón...etc, durante el transcurso de esta tesis se utilizarán estos conceptos de forma arbitraria para describir tanto los resultados encontrados en la bibliografía, como para referirnos a las diferentes especies y variedades testadas a los pacientes.

NOMBRE VULGAR	NOMBRE CIENTÍFICO	AUTOR -AÑO
Shrimp	No aparece reflejado	Maulitz y cols, 1979
Prawn	<b>Penaeus japonicus</b>	Nagano y cols, 1984
Shrimp	<b>Metapenaeus jpyneri</b>	Nagano y cols, 1984
Shrimp	No aparece reflejado	Kavli y cols, 1985
Shrimp	No aparece reflejado	Lehrer y cols, 1985
White shrimp	<b>Penaeus setifecus</b>	Waring y cols, 1985
Shrimp	No aparece reflejado	Maibach, 1986
Shrimp	No aparece reflejado	McCants y cols, 1986
Shrimp	No aparece reflejado	Daul y cols, 1987
White shrimp	<b>P. setifecus</b>	Lehrer y cols, 1987
Shrimp	No aparece reflejado	Daul y cols, 1988
Shrimp	No aparece reflejado	Morgan y cols, 1988
Shrimp	<b>Penaeus Indicus</b>	Nagpal y cols, 1989
White shrimp	<b>P. setifecus</b>	Morgan y cols, 1989
Brown shrimp	<b>P. aztecus</b>	Morgan y cols, 1989
White shrimp	<b>P. setifecus</b>	Daul y cols, 1990
White shrimp	<b>P. setifecus</b>	Morgan y cols, 1990
Shrimp	No aparece reflejado	Morgan y cols, 1991
Brown shrimp	<b>P. aztecus</b>	Daul y cols, 1991
White shrimp	<b>P. zetifecus</b>	Daul y cols, 1992
Brown shrimp	<b>P. azeticus (sic)</b>	Daul y cols, 1992
Gamba	<b>P. Indicus</b>	Nagpal y cols, 1993
Shrimp	No aparece reflejado	Akkerdaas y cols, 1993
Brown shrimp	<b>P. aztecus</b>	Musmand y cols, 1993
Shrimp	<b>Crangon crangon</b>	Witteman y cols, 1994
Shrimp	<b>Metapenaeus ensis</b>	Leung y cols, 1994
Prawn	No aparece reflejado	McSharry y cols, 1994
Shrimp	No aparece reflejado	Castillo y cols, 1994
Brown shrimp	<b>P. aztecus</b>	Reese y cols, 1994
Shrimp	No aparece reflejado	Rajagopal y cols, 1994
Shrimp	No aparece reflejado	Shanti y cols, 1994
Atlantic shrimp	<b>Pandalus borealis</b>	Crespo y cols, 1995

Tabla 1. Distintos estudios clasificados por autor y año de publicación que hacen referencia a la palabra “shrimp”. Nótese que el nombre científico difiere en la mayoría de los estudios.

### III.3.2. Alérgenos mayores de los crustáceos: evolución histórica.

La gamba es el marisco más consumido en EE.UU. y el mejor estudiado desde el punto de vista alérgico. Aunque el marisco contiene una gran variedad de proteínas, sólo unas pocas son alergénicas y la mayoría de ellas son glicoproteínas hidrosolubles, termoestables, con un Pm entre 10 y 100 kDa, y un punto isoeléctrico ácido.

Las especies de gambas *Penaeus* y *MetaPenaeus* son los crustáceos cuyos alérgenos han sido más ampliamente estudiados. Mediante técnicas de SDS-PAGE, se estudiaron las bandas proteicas de extractos crudos y cocidos de gambas y del agua de cocción, y se encontró que cualitativamente las bandas mostradas eran muy similares en los tres extractos<sup>30</sup>.

Hasta la actualidad, los alérgenos del marisco se obtienen a partir de extractos crudos y cocidos de los distintos géneros y especies, y su reproductibilidad muestra gran variabilidad. De ahí la importancia de obtener alérgenos de marisco purificados y bien caracterizados para mejorar el diagnóstico.

El marisco cocido retiene toda su alergenidad y el agua de cocción contiene los mismos alérgenos. El rendimiento de los extractos de marisco cocido para diagnóstico es mejor, quizá, con relación a que los alérgenos son proteínas muy termoestables y a que el calor produzca cambios estructurales que originan un aumento de la exposición de los epitopos de unión a la IgE (Tabla 2)<sup>2,29</sup>.

<b>Autores</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Pm kDa</b>	<b>Especie</b>	<b>Proteína</b>	<b>Antígenos</b>
Hoffman	Antígeno-II	38			Mayor
Nagpal	Sa-II, Pen i 1	34	<i>Penaeus Indicus</i>	Tropomiosina	Mayor
Daul	Pen a 1, Pen s 1	36	<i>P. setiferu</i> <i>P. aztecas</i>	Tropomiosina	Mayor
Lin <sup>138</sup>	Par f 1	39	<i>Parapenaeus Fissurus</i>		Mayor
Hoffman	Antígeno-I	21			Menor
Nagpal	Sa-I	8,2	<i>Penaeus Indicus</i>		Menor
Nagpal	Sa III ¿?		<i>Penaeus Indicus</i>	RNA-t	Menor
Daul <sup>8,10,39</sup>		20,42-45 66-72	<i>P. setiferu</i> <i>P. aztecas</i>		Menor
Lin <sup>40</sup>		86	<i>Parapenaeus Fissurus</i>		Menor

Tabla 2. Alérgenos mayores (tropomiosina) y menores descritos en la bibliografía con distintas especies de crustáceos.

Los crustáceos han sido reconocidos como una causa común de reacciones de hipersensibilidad por alimentos, de hecho en la bibliografía existen abundantes casos de reacciones alérgicas por el consumo de marisco, a continuación se detallan los principales de forma cronológica los principales autores.

Maulitz y cols (1979)<sup>41</sup> reportaron el caso de un hombre de 31 años que presentó 2 episodios de anafilaxia tras la ingesta de ostra, en el primer caso y de gamba, en el segundo, tras la realización de ejercicio físico. El paciente dio positividad cutánea a extractos de los moluscos, ostra y almeja, y de los crustáceos, gamba y cangrejo. El paciente presentaba IgE específica para los cuatro alimentos pero no presentaba clínica tras la ingesta de ninguno de ellos, siempre que no fuera seguida por ejercicio físico fuerte.

Hoffman y colaboradores en el año 1981 fueron los primeros en identificar y caracterizar parcialmente alérgenos de gamba<sup>13</sup>. Aislaron el Antígeno II frente al cual mostraban IgE específica el 100% de un grupo de 11 pacientes alérgicos a gamba. Se trataba de una proteína termoestable de 38 kDa, 341 residuos aminoácidos, con un punto isoeléctrico de 4,5 y un contenido del 4% de carbohidratos capaz de inhibir el 92% de un extracto de gamba. También aislaron el Antígeno I, de menor importancia, en el extracto de gamba crudo, termolábil, de 21 kDa, formado por un dímero de dos cadenas de polipéptidos.

Waring y cols en 1983 estudiaron reacciones cutáneas y de RAST a antígenos de mariscos, detectándose 18 antígenos en extracto de gamba; 5 de estos antígenos tenían reactividad cruzada con cangrejo de río, 3 con langosta y 1 con cangrejo de mar. Un año más tarde, dicho grupo trabajó con gamba blanca natural y hervida (*Penaeus setiferus*), cangrejo azul hervido (*Callinectes sapidus*), langosta hervida y congelada (*Palinurus argus*) y colas de cangrejo de río hervidas y congeladas (*Procambarus clarkii*) encontrando que hay dos tipos de individuos sensibles a la ingesta de estos crustáceos, los que son atópicos y que presentan positividad cutánea y de RAST y los no atópicos con dichas pruebas negativas o sólo ligeramente positivas y sugirieron que se debía investigar más debido a la posibilidad de que existieran mecanismos inmunológicos y no inmunológicos.

Lehrer y cols (1984)<sup>42</sup> encontraron reactividad cruzada entre alérgenos de gamba, cangrejo de río, langosta y cangrejo de mar y un año más tarde, Lehrer y cols (1985)<sup>43</sup> identificaron dichos alérgenos mediante técnica de radioinmunolectroforesis cruzada.

McCants y Lehrer (1986 y 1987) demostraron, por inhibición del RAST, que la ostra y algunos crustáceos tienen estructuras antigénicas comunes. Los últimos autores trabajaron con: gamba blanca (*Penaeus setiferus*), cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), langosta espinosa (*Palinurus argus*), cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) y ostra (*Crassostrea virginica*); a pesar de que los moluscos y los crustáceos están, filogenéticamente, bastante separados, encontraron que los pacientes sensibilizados a crustáceos reaccionaban a las ostras por lo que propusieron 2 hipótesis:

- Las estructuras antigénicas comunes deben estar relacionadas con entidades primitivas que aún se conservan en ambos filos.
- Las ostras se alimentan por filtración y las pequeñas larvas de los crustáceos pueden formar parte de su dieta de tal forma que pueden incorporar sus alérgenos a la ostra.

Carlston (1988)<sup>44</sup> relata dos casos de pacientes muy sensibles a las emanaciones (alergia inhalante) de ajo, en el primer caso, y de pescados (bacalo, platija, halibut, caballa y atún), mariscos (almeja, vieira y ostra) y de moluscos (cangrejo y gamba) en el segundo, que fueron tratados con inmunoterapia inyectable y consiguieron una mejoría de sus síntomas; el autor cita, entre otras conclusiones, que la hiposensibilización, en ambos casos, produjo una notable mejoría clínica y que a los pacientes sometidos a este tipo de inmunoterapia sería prudente considerarlos con el mismo cuidado que si estuvieran siendo sometidos a inmunoterapia de venenos ya que, en ambos casos, se dieron reacciones más o menos fuertes durante la aplicación de algunas de las inyecciones. Termina el autor haciendo notar que todo el proceso estuvo acompañado por un continuo descenso de IgE.

Goetz en 1989 y Goetz y Whisman en 1990 reportaron un caso de hipersensibilidad con síntomas de asma ocupacional y urticaria de contacto en un manipulador de alimentos, no atópico, cuando estaba en contacto con gambas y vieiras.

Más tarde, en el mismo año, Nagpal y colaboradores<sup>29</sup>, y en 1990 Morgan y cols<sup>45</sup> aislaron y caracterizaron alérgenos termoestables de la gamba *Penaeus Indicus* el antígeno Sa-II, similar al Antígeno II, de 34 kDa, y otra proteína, asimismo termoestable, el antígeno *Sa-I*, de 8,2 kDa. Ambos antígenos, *Sa-I* y *Sa-II*, presentan una comunidad antigénica del 54%. Se especuló con la posibilidad de que *Sa-I* fuese un fragmento de *Sa-II*. Asimismo, aislaron otro antígeno, *Sa-III*, que caracterizaron como un RNAt, que no ha podido ser confirmado por otros investigadores. Más tarde, se identificó el antígeno *Sa-II* como la tropomiosina de la gamba *Penaeus Indicus* y se le denominó *Pen i 1*, según la nomenclatura internacional (IUIS)<sup>14</sup>.

Otras bandas proteicas alergénicas identificadas con unos Pm de 20, 42-45, 66-72 y 86 kDa se unían a menos del 50% de los sueros de pacientes alérgicos a gamba<sup>10,28,39</sup>.

Se ha descrito la existencia de alérgenos específicos de especie. Algunos pacientes refieren tener síntomas sólo frente a una especie de gambas determinada. Se estudió esta posibilidad con gambas blancas *Penaeus setiferus* y gamba marrón *Penaeus aztecus*, por ser las más consumidas en la zona del Golfo Sur de EE.UU. Se encontró que 3 de 31 pacientes diagnosticados previamente de alergia a gambas reaccionaban sólo frente a un extracto de las dos especies de gambas y en los estudios de inhibición de RAST se comprobó esta reacción única. Esto sugiere la posibilidad de sensibilización a un único alérgeno, específico de especie,

lo que podría explicar los síntomas intermitentes referidos por algunos pacientes. Hay que tener en cuenta esta posibilidad en los casos de historia clínicamente compatible con pruebas cutáneas, séricas y de provocación negativas<sup>46</sup>

Por otra parte, el grupo de la sección de Inmunología Clínica, Departamento de Medicina del Tulane Medical Center (New Orleans) ha investigado, durante bastantes años, las reacciones alérgicas por crustáceos en especial por gambas. Diversos autores han reportado urticaria de contacto por gambas y langostinos en Japón<sup>47</sup> y en Noruega<sup>48</sup>; parece que sólo se produce con los crustáceos sin cocinar lo que sugiere la existencia de alérgenos termolábiles.

Daul y cols aislaron y caracterizaron una proteína de 36.000 daltons como un alérgeno importante de gamba y lo llamaron Pen s. La secuencia de sus aminoácidas demostró semejanza con la tropomiosina.

Castillo y cols (1991) reportaron hipersensibilidad inhalatoria a calamar, lapa, gamba, cangrejo y langosta.

En 1993 Akkerdaas así como Nagpal<sup>14</sup> caracterizaron un alérgeno común en la gamba y el ácaro doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*) que podía ser la tropomiosina de músculo esquelético.

Lehrer y cols<sup>42</sup> encontraron reactividad cruzada entre alérgenos de gamba, cangrejo de río, langosta y cangrejo de mar y un año más tarde, identificaron dichos alérgenos mediante técnicas de laboratorio.

Lemièrre en 1994 reportó el caso de una mujer que presentaba urticaria, de origen alérgico y mediada por IgE, tras la ingesta de cangrejo, gamba y langosta.

Castillo<sup>2</sup> y cols en 1994 estudiaron 48 pacientes con hipersensibilidad a mariscos (calamar, gamba, bogavante, cangrejo, mejillón y almeja) a los que sometieron a pruebas con extractos de dichos mariscos así como de pulpo y lapa y concluyeron que las pruebas cutáneas producen mejores resultados que el CAP y que existe una asociación clínica dentro del mismo y distintos filos, reflejando epitopos comunes, y que los extractos de calamar, pulpo y lapa contienen gran cantidad de alérgenos termoestables.

Crespo<sup>49</sup> y cols en 1994 y 1995 reportaron reactividad cruzada entre alérgenos de cucaracha (*Blattella germanica*) y camarón (*Pandalus borealis*); en el trabajo de 1994 llaman gamba del Atlántico a *Pandalus borealis*. Senent y cols en 1996 reportaron asociación entre alergia a mariscos (gamba), arácnidos (ácaros) y nemátodos (*Ascaris*).

Isola y cols (1995) reportaron un caso de cistitis hemorrágica tras la ingesta de un pastel que contenía carne de cangrejo.

Rodríguez y cols (1996) estudiaron la prevalencia de sensibilización a crustáceos en una población sensible a ácaros.

Tras esta revisión bibliográfica se concluye que hasta el año 1996 se conocían sólo 3 alérgenos mayores derivados de diferentes especies de gambas: Pen a 1 (tropomiosina) del cuerpo de la gamba marrón *Penaeus aztecus* con un peso molecular de 36 kD y que presenta reactividad cruzada con algunos ácaros e insectos<sup>14,50</sup>. Su secuencia aminoácida es conocida sólo parcialmente (Daul<sup>8,51</sup> y cols, 1990, 1991, 1992,1994; Reese<sup>52,53</sup> y cols, 1994 y 1995; Liebers<sup>54</sup> y cols, 1996); Par f 1 (seroalbúmina) de la gamba *Parapenaeus fissurus* con peso molecular de 39 kD y cuya secuencia aminoácida se conoce sólo parcialmente (Lin<sup>40</sup> y cols, 1993; Liebers<sup>54</sup> y cols, 1996) y Met e 1 (tropomiosina) de la gamba

MetaPenaeus ensis con peso molecular de 34 kD y cuya secuencia aminoácida se conoce en su totalidad (Leung<sup>9</sup> y cols, 1994; Liebers<sup>54</sup> y cols, 1996).

En general, son bastantes los autores (Shanti<sup>14</sup> y cols, 1993 y 1994; Rajagopal y cols, 1994; Reese<sup>52</sup> y cols, 1994; McSharry<sup>55</sup> y cols, 1994) los que han publicado diversos estudios sobre caracterización de alérgenos mediante técnicas de péptidos sintéticos y de anticuerpos monoclonales.

Herrero y cols (2001) reportaron un estudio hecho a tres pacientes, dos de ellos con historia de hipersensibilidad tras la ingesta de distintos crustáceos (gamba cocida, langosta de Noruega y dos especies de cangrejos, Cancer pagurus y nécora) y el tercero con historia de hipersensibilidad, por vía inhalatoria, durante la cocción de nécora (Portunus puber). Detectaron múltiples alérgenos de distintos pesos moleculares, aunque la mayoría por debajo de 20 kDa. Sugieren que el diagnóstico de hipersensibilidad a crustáceos se realice siempre con extractos tanto crudos como hervidos y se complete con estudios inmunológicos de detección de IgE específica.

### **III.3.3. Alérgeno mayor: la tropomiosina.**

La gamba es el crustáceo mejor estudiado, y en el que primero se caracterizó su alérgeno mayoritario, una proteína termoestable de 36 Kda que fue identificada como una tropomiosina (Pen a 1, en Penaeus aztecus). La tropomiosina supone el 20% de las proteínas solubles de la gamba, y es muy abundante en el líquido de cocción de los crustáceos. Su termoestabilidad hace que pueda ser vehiculizada en los vapores de cocción de los crustáceos y que se puedan producir sensibilizaciones y síntomas tras una exposición por vía inhalada. Más del 85% de los

pacientes alérgicos a la gamba están sensibilizados a la tropomiosina, y la respuesta IgE frente a este alérgeno supone el 80% de la respuesta IgE frente al extracto completo de gamba<sup>8,14</sup>. Se han identificado 8 epítomos B en Pen a1<sup>56</sup>.

Las tropomiosinas forman una familia de proteínas altamente conservadas y presentes en células musculares y no musculares de vertebrados e invertebrados. La tropomiosina participa, junto con la actina y la miosina, en la contracción muscular y, en las células no musculares, puede estar relacionada con su morfología y motilidad. Está formada por dos moléculas con estructura de hélice  $\alpha$  enrolladas entre sí en espiral formando un dímero<sup>57</sup>.

Solamente son alérgicas las tropomiosinas de los invertebrados. Se han identificado tropomiosinas alérgicas en los crustáceos (diferentes especies de gambas, langosta, bogavante y cangrejo), moluscos (ostra, caracol, mejillón, oreja de mar, calamar), ácaros (Der p 10, Der f 10) y cucarachas (Per a 7, Bla g 7), con un importante grado de similitud y reactividad cruzada. La tropomiosina es, en definitiva, un panalérgeno de los invertebrados, y la base de las asociaciones de la alergia a los crustáceos y moluscos entre sí, y con la alergia respiratoria a los ácaros<sup>57-63</sup>.

Se ha identificado un alérgeno minoritario en la gamba, *Penaeus monodon*, de 40 Kda, que presenta actividad de arginina quinasa. Ha sido denominado Pen m 2 y es reconocido por un 27% de los pacientes alérgicos<sup>64</sup>.

En las Tablas 3 y 4, se describen distintas especies de crustáceos con su correspondiente antígeno, así como el nombre vulgar y los pesos moleculares de dicho alérgeno mayor. Todos ellos están en un rango de 34 a 39 Kd (Kilodaltons).

	<b>Especie</b>	<b>Antígeno</b>
<b>Gamba</b>	Metapenaeus ensii <sup>9</sup>	Met e 1
	Penaeus aztecus <sup>8</sup>	Pen a 1
	Penaeus Indicus <sup>14</sup>	Pen i 1
	Parapenaeus fissurus	Par f 1
<b>Langosta</b>	Panulirus stimpsoni <sup>58</sup>	Pan s 1
	Homarus americanus <sup>58</sup>	Hom a 1
<b>Cangrejo</b>	Charibdis feriatus <sup>59</sup>	Cha f 1

Tabla 3. Alérgeno mayor, tropomiosina de crustáceos (gamba, langosta y cangrejo)

<b>NOMBRE CIENTÍFICO</b>	<b>NOMBRE VULGAR</b>	<b>PM (KD)</b>
Penaeus aztecus (Pen a 1)	Gamba marrón	36 Kd
Penaeus Indicus (Pen i 1)	Gamba de la India	34 Kd
Parapenaeus fissurus (Par f 1)	Gamba de Taiwán	39 Kd
MetaPenaeus ensis (Met e 1)	Gamba del sur de China	34 Kd

Tabla 4. Actuales alérgenos mayores estudiados en distintas especies de gambas: Tropomiosina

En la actualidad, existen un total de 331 alérgenos descritos de distintos crustáceos (shrimp). Todos ellos han sido tipificados y obtenidos de la página web cuya dirección es [www.allergome.org](http://www.allergome.org). Dado que es excesivamente extenso describir todos ellos, hacemos referencia exclusivamente a los alérgenos mayores (tropomiosina) de los crustáceos que se detallan en el anexo I.

### **III.4. REACTIVIDAD CRUZADA.**

Recientes hallazgos experimentales sugieren que existe una reactividad cruzada entre los alérgenos de la Cucaracha (CR) con alérgenos presentes en insectos y algunos invertebrados. Se ha demostrado que anticuerpos (Ac) de naturaleza IgE, provenientes de pacientes con alergia a insectos, reaccionan con antígenos (Ag) de *Lepisma Saccharina*, un insecto; también lo hacen con Ag de *Blatella germánica* y extractos de chironomid. Este fenómeno también se ha observado entre antígenos de CR y diferentes especies crustáceas. Hay algunos hallazgos experimentales que muestran reacciones cruzadas entre antígenos de cucarachas con antígenos de nemátodos, tales como el *Anisakis* y *Ascaris*. No se ha demostrado reactividad cruzada entre alérgenos de cucaracha y alérgenos de mamíferos superiores.

La proteína implicada en esta reactividad cruzada es la tropomiosina, la cual, ha sido identificada como el mayor alérgeno en la CR, los ácaros, el camarón y otros crustáceos. Esta proteína muestra una homología sustancial en la secuencia aminoacídica entre estas diferentes especies. Se sugiere que este fenómeno tiene un significado y una relevancia clínica, por cuanto pudiera explicar la inducción de sensibilización hacia alérgenos de invertebrados o sensibilización a Ag de crustáceos en individuos originariamente sensibilizados contra Ag de ácaros o de CR.

Los antígenos de la cucaracha constituyen hoy en día como uno de los principales alérgenos de interior y pueden ser capaces de producir en individuos sensibilizados a éstos, enfermedades alérgicas respiratorias, como el asma<sup>65-66</sup>. En ciertas áreas de la región central de los Estados Unidos y en algunas zonas costeras tales como Florida, San Francisco y Boston, la cucaracha es el alérgeno ambiental más importante asociado al desarrollo del asma. En nuestro medio se ha podido documentar que el 65% de los pacientes asmáticos se encuentran sensibilizados a los alérgenos de CR<sup>67</sup>.

La cucaracha pertenece al Phylum artropoda, clase insecto, orden blattania, familia blattidae. Hay, por lo menos, ocho diferentes especies de cucarachas, de importancia clínica, las cuales pueden causar alergia respiratoria. De ellas se han identificado un gran número de alérgenos, particularmente de la *Blattella* germánica (Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4 y Bla g 5) y de la *Periplaneta* americana (Per a I, Per a 3, Per a 7)<sup>66,67</sup>. Sin embargo, no todos los alérgenos presentes en una especie en particular se comparten con otras especies.

#### **III.4.1. Reactividad cruzada de la cucaracha con otros artrópodos.**

Los artrópodos que frecuentemente se han investigado, cuyos alérgenos presentan reactividad cruzada con cucaracha, incluye los miembros de la clase insecta y arachnida, tales como el frigáneo, la cachipolla, los jejenes (*chironomidae*), la mariposa nocturna, otros tipos de mariposas y los ácaros del polvo. Tratando de definir la relación alérgica entre alérgenos de artrópodos, cucarachas y ácaros, se ha encontrado resultados contradictorio<sup>67</sup>. Witteman y colaboradores demostraron que anticuerpos IgE de sujetos sensibilizados a Ag de insectos, reaccionaban con el *Lepisma saccharina*, cucaracha y/o

extractos de chironomid. Pruebas de inhibición por RAST confirmaron la reactividad cruzada entre los ácaros del polvo casero y *Lepisma saccharina*; igualmente entre la cucaracha y el extracto de chironomid<sup>50</sup>.

Alonso y colaboradores<sup>67</sup> demostraron reactividad cruzada entre cucaracha (*Periplaneta americana*) y el reduvido (*Triatoma infestans*) por inhibición de RAST. Estudios adicionales realizados por Pascual y colaboradores, demostraron varios ligantes comunes entre cucaracha germánica y chironoid<sup>63</sup>. Otros miembros del Phylum arthropoda son los crustáceos. Entre ellos, el camarón, la langosta, el cangrejo de río y el cangrejo de mar, tienen una gran importancia en la alergología clínica, debido a que la mayoría de estos crustáceos poseen proteínas que se comportan como alérgenos alimenticios.

En la actualidad, está claro que alérgenos proteicos obtenidos por ebullición de camarones, presentan reactividad cruzada con alérgenos de *Blatella germánica*<sup>49</sup>. Erikson y colaboradores en otro estudio informaron reactividad cruzada entre la larva de chironomids y el camarón<sup>68</sup>.

#### **III.4.2. Reatividad cruzada entre alérgenos de la cucaracha y proteínas de otros invertebrados.**

Con el propósito de determinar si la hipersensibilidad a nemátodos y artrópodos era debido a la reactividad cruzada inmunológica o a polisensibilización, Pascual y colaboradores<sup>63</sup> examinaron por inmunoblot e inhibición del inmunoblot, 18 sueros de pacientes pediátricos con IgE Específica contra *Anisakis Simplex* y 21 sueros de pacientes pediátricos con IgE a *Blatella germánica*. El inmunoblot de *Anisakis* fue parcialmente inhibido con Ag de Chironomids y con extracto de *Blatella germánica*. Otro estudio investigó reactividad de Ac IgE contra una variedad de alérgenos inhalantes provenientes de insectos, artrópodos y nemátodos *A. simplex* y

*Ascaris suis*<sup>62</sup>. También se ha demostrado que la tropomiosina de pollo se une a la IgE Específica contra Ag de artrópodos y extractos de nemátodos, sugiriendo que esta reacción alérgica de reactividad cruzada estaba presente en una variedad de extractos proveniente de insectos, ácaros, crustáceos, moluscos y parásitos.

No hay evidencia de que los alérgenos de la cucaracha y el de los mamíferos produzcan una reacción cruzada, aún a través de Bla g 4, un importante alérgeno de *Blattella germanica* con otras proteínas de origen animal, como la proteína urinaria del ratón, la beta-lactoglobulina (leche), alérgenos de la vaca, del perro y del caballo. Todas estas proteínas son miembros de la familia de las proteínas ligantes denominadas lipocalinas o calicinas<sup>66</sup>. La homología en la secuencia aminoacídica entre estas moléculas es solamente de un 20%, sin embargo, su estructura tridimensional se conserva.

#### **III.4.3. Tropomiosina, responsable de la reactividad cruzada entre diferentes alérgenos de naturaleza animal.**

La molécula de la tropomiosina está asociada con los filamentos delgados del músculo y los microfilamentos de muchas células en diferentes órganos; juega un papel en la contracción muscular. La función de esta proteína en las células diferentes a los miocitos es desconocida. Se cree, en general, que participa en la regulación de la morfología celular y en la motilidad de los organismos. En el músculo, la molécula tiene una conformación alfa helicoidal bicatenaria. Alrededor de cada hebra presenta otras formaciones aminoacídicas enrolladas alrededor de sí misma. Estos últimos oligopéptidos son ricos en radicales hidrofóbicos, los cuales se encuentran espaciados a lo largo de la molécula cada dos o tres residuos, en forma sistemática.

En el año 1984, la tropomiosina se identificó como una proteína alergénica en el camarón<sup>8</sup>. Estudios posteriores evidenciaron la paridad en la secuencia aminoacídica de aquella con la tropomiosina originaria de la *Drosophila melanogaster*<sup>8-9,14</sup>. Subsiguientes publicaciones evidenciaron otras moléculas de esta proteína en otros crustáceos con las mismas características alergénicas, especialmente en varias especies de langostas y de cangrejos<sup>58,69</sup>.

Más recientemente, la tropomiosina obtenida de *Periplaneta Americana*, fue identificado como uno de los alérgenos mayores de esta especie<sup>7,70</sup>. Aruda y col<sup>7</sup> hicieron un tamizaje del genoma de la cucaracha *Periplaneta Americana*, utilizando para ello un pool de antisueros enriquecidos con anticuerpos de naturaleza IgE provenientes de 14 pacientes asmáticos sensibilizados con antígenos de cucaracha. Ellos fueron capaces de aislar varios clones que compartían la misma secuencia, la cual codificaba una proteína con alto grado de homología a la tropomiosina. Esta proteína tenía una longitud de 480 aminoácidos y tenía un grado de correlación del 80%, 81% y 82% con *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y camarón, respectivamente.

Un estudio llevado a cabo por Asturias y col<sup>70</sup>, evidenció que la tropomiosina proveniente de *Periplaneta Americana*, codificada por clones obtenidos en *E. coli*, mostró una homología sustancialmente parecida a la de los trabajos arriba mencionados en relación con la tropomiosina de otros artrópodos y arácnidos; sin embargo, la tropomiosina así obtenida al compararse con otras de origen animal, provenientes de otros vertebrados, sólo mostró homología en un 50%.

Existen múltiples publicaciones que demuestran por técnicas de *ELISA* y *Western Blot*, utilizando Ac de naturaleza IgE Específicos para

tropomiosina de ácaros, crustáceos y camarón, una reactividad cruzada entre estas moléculas<sup>62</sup>, lo que sugiere que ella es un alérgeno común entre diferentes especies de invertebrados.

Se puede concluir, que a la luz de los conocimientos actuales, hoy en día se acepta que los alérgenos provenientes de los crustáceos, se constituyen en uno de los más importantes epitopos alérgicos del ecosistema de interior<sup>65,66</sup>. Por otra parte, existe un cúmulo de evidencias científicas, las cuales muestran reactividad cruzada entre los alérgenos de crustáceos y la tropomiosina proveniente de insectos y ácaros; de igual forma, este fenómeno se ve con otras especies de artrópodos particularmente con el camarón, la langosta y el cangrejo. Resulta importante y relevante la reactividad cruzada que se ha demostrado entre aeroalérgenos de ácaros y crustáceos con algunas especies de nemátodos. Al parecer, la molécula responsable de este fenómeno inmunoquímico es la tropomiosina y éste se fundamentaría en la identificación por parte de anticuerpos específicos, que reconocerían secuencias aminoacídicas, altamente conservadas en la estructura de la proteína, a nivel de la zona enrollada y estabilizada por fuerzas hidrofóbicas. Estas tienen funciones importantes en la contracción muscular. Es importante anotar que esta proteína se presenta como un alérgeno común de muchas especies entre los invertebrados. Es evidente el grado de homología en la secuencia aminoacídica entre la tropomiosina proveniente de la *P. americana* y la tropomiosina humana (50%), así como la reactividad cruzada entre un alérgeno de *Blattella germanica* (Bla g 4) y alérgenos marinos específicamente de proteínas urinarias. El fenómeno es más importante cuando también se encuentra con la betalactoglobulina de la leche bovina y canina y de otras lipocalinas y calisinas. Se destaca que la secuencia de homología entre todas estas proteínas es de sólo el 20%. Presentan en común una estructura tridimensional, la cual se conserva y ésta se asocia a la región en espiral.

Además de la reactividad cruzada de la tropomiosina descrita previamente es importante resaltar que existen otras menos frecuentes y que han sido registradas en la página web [www.allergome.org](http://www.allergome.org) (véase anexo 2).

#### **III.4.4. La alergia a ácaros-mariscos y la inmunoterapia específica.**

Se ha sugerido que la inmunoterapia específica con ácaros pudiera ser un factor de riesgo para el desarrollo posterior de alergia alimentaria a mariscos y caracoles. De este modo, pacientes con asma alérgica por ácaros, en tratamiento con inmunoterapia específica, presentaban en el prick test un aumento del tamaño de la pápula con los extractos de caracoles, así como un agravamiento de su clínica tras su ingestión<sup>71</sup>.

Sin embargo, otros estudios no han encontrado ninguna relación entre el tratamiento con inmunoterapia específica de ácaros y el desarrollo posterior de alergia alimentaria a las gambas o a los caracoles. De hecho, el aumento ocasional de la IgE específica frente a los mismos tras la inmunoterapia no implica que aparezcan síntomas tras su ingestión<sup>72-73</sup>.

#### **III.5. MANIFESTACIONES CLINICAS.**

Los alimentos constituyen la mayor carga antigénica con la que se enfrenta el sistema inmunológico humano, siendo la tolerancia la respuesta fisiológica. No se conocen todavía con exactitud cuáles son los mecanismos que conducen al desarrollo de una respuesta mediada por IgE frente a un antígeno alimentario, en lugar de la tolerancia. En un individuo ya sensibilizado, la posterior ingestión del alérgeno inducirá síntomas alérgicos.

Estos síntomas tienen una intensidad variable, desde un ligero malestar hasta reacciones graves, potencialmente mortales, que necesitan intervención médica inmediata. Las manifestaciones clínicas pueden ser de carácter cutáneo (prurito, eritema o edema), gastrointestinal (dolor, náuseas, vómitos, diarrea o quemazón y edema de la cavidad oral), respiratorios (asma o prurito y edema de la cavidad nasal y la garganta), ocular (prurito y edema) o cardiovascular (dolor torácico, arritmias cardíacas o hipotensión, que puede llegar a causar pérdida de conciencia).

Las reacciones alérgicas suelen producirse entre pocos minutos y una hora después de la ingestión del alimento causal. Los síntomas que se manifiestan y su gravedad dependen de la cantidad de alérgeno ingerida y de la sensibilidad del paciente, y pueden durar días o semanas.

Las manifestaciones clínicas de la alergia a los alimentos mediada por IgE se detallan a continuación.

### **III.5.1. Síntomas cutáneos: Urticaria aguda y angioedema.**

La piel es un órgano diana muy frecuentemente afectado en las respuestas alérgicas a alimentos. La urticaria aguda se caracteriza por prurito transitorio y lesiones eritematosas ligeramente sobreelevadas, distribuidas por cualquier parte del tegumento cutáneo, de menos de 24 horas de evolución. En ocasiones puede acompañarse de edemas localizados, generalmente en la cara y en las extremidades, cursando como angioedema. Ambos cuadros constituyen la sintomatología más frecuentemente reseñada en relación a la alergia a los alimentos aunque es un síntoma muy inespecífico y con múltiples desencadenantes<sup>74</sup>

La urticaria por alimentos no supone, en sí misma, un cuadro grave, pero sí resulta muy alarmante para los pacientes y sus familias en

función de la extensión de las lesiones y del tiempo que persistan los síntomas. Cuando existe angioedema, la sensación de gravedad es mayor ya que el edema de párpados y/o labios puede causar sensación de impotencia funcional (mala visión por oclusión o imposibilidad de comer o pronunciar correctamente aunque sólo afecte a partes externas).

La urticaria aguda puede ser provocada, no solo por la ingestión, sino por el roce o contacto directo o indirecto con el alimento a través de las manos, utensilios o incluso partículas volátiles. Por contacto accidental con la piel se han descrito incluso cuadros con afectación general<sup>75</sup>. Una fuente de contactos cutáneos accidentales con alimentos en los pacientes alérgicos son los contactos interpersonales, sobre todo en la infancia, a través de besos, caricias, contacto con los ojos, la nariz o partes expuestas por la persona que cocina o manipula alimentos o, en ocasiones, por juegos entre niños y por contacto con vómitos o regurgitaciones de alimento entre hermanos de poca edad que provocan, en general, sintomatología restringida a la zona de contacto.

### **III.5.2. Síndrome de alergia oral (SAO).**

En una situación intermedia entre los síntomas cutáneos, digestivos o incluso respiratorios, se encuentra el que ha venido en denominarse síndrome de alergia oral (SAO). Consiste en la aparición de prurito orofaríngeo inmediato a la ingestión de un alimento, con o sin lesiones peribucales y/o ligero edema de labios. El episodio en sí mismo es de poca duración (pocos minutos). Puede aparecer como síntoma leve aislado que desaparece espontáneamente con rapidez o seguirse de un cuadro de mayor gravedad.

Se trata de un cuadro, conocido de antiguo que, en sus formas más leves, apenas es considerado patológico por los pacientes. En estos

casos rara vez es motivo de consulta, ya que el paciente rechaza el alimento y, si es adulto, deja de consumirlo, describiéndolo únicamente al ser directamente interrogado sobre ese punto.

A los síntomas ya descritos puede añadirse prurito en el paladar o la faringe, con rascado de la lengua contra el velo palatino y carraspera o sonidos de chasquido en la garganta audibles para el observador. Algunos pacientes señalan prurito en el cuello a la altura de la laringe con rascado externo y eritema local consiguiente. En estos casos, aunque no se objetiven cambios a la exploración, el cuadro sería de mayor gravedad que el simple prurito oral. Estos síntomas pueden ceder espontáneamente o progresar a síntomas cutáneos o respiratorios más marcados. Dentro del SAO también puede aparecer prurito intenso en el oído, que el paciente manifiesta con un rascado compulsivo del conducto auditivo externo y que, en los niños pequeños que no saben expresarse verbalmente, debe considerarse un síntoma de alarma ya que puede preceder a sintomatología más grave.

### **III.5.3. Síntomas digestivos.**

Los síntomas gastrointestinales cubren un amplio espectro de trastornos que pueden abarcar a toda la extensión del tubo digestivo, o a alguna de sus partes y, considerados aisladamente, son indistinguibles de los causados por otras etiologías<sup>76,77</sup>. Entre ellos destacan 3 presentaciones clínicas.

La primera, vómitos con o sin diarrea pueden manifestarse de forma aislada, aunque es más frecuente encontrar estos síntomas asociados, precediendo o siguiendo a otros síntomas en otros sistemas. Ni los vómitos ni la diarrea tienen características clínicas especiales que permitan diferenciarlos de los desencadenados por otras causas salvo la

sistemática repetición de los síntomas tras la ingestión del alimento y su ausencia al evitarlo. En los intervalos el paciente se encuentra asintomático. Los vómitos son más precoces que las manifestaciones de tránsito intestinal bajo que pueden demorarse más de 1 o 2 horas. La diarrea como presentación aislada es infrecuente. Habitualmente, las heces no tienen características especiales.

Otra manifestación clínica de la alergia alimentaria que pasa desapercibida habitualmente es el reflujo gastroesofágico. La asociación entre la alergia a los alimentos y el reflujo gastroesofágico ha sido referida por algún autor. En los pacientes asmáticos y con reflujo gastroesofágico marcado se ha encontrado una frecuencia más elevada de lo esperado de alergia a alimentos.

Por último, el dolor abdominal. Es un síntoma frecuentemente descrito por los pacientes y que tiene un componente subjetivo difícil de valorar si no se sigue de otras manifestaciones.

#### **III.5.4. Síntomas respiratorios.**

Dicha clínica respiratoria puede afectar tanto a vías respiratorias superiores como inferiores. Cuando afecta a vías respiratorias superiores, la principal manifestación clínica es la rinitis aguda. Ésta cursa con prurito e hidrorrea, y raramente es referida de modo espontáneo por los pacientes, pero se observa hasta en un 70% de las provocaciones controladas, acompañada o no de conjuntivitis, que se manifiesta inicialmente como un aumento de la secrección lagrimal o un franco lagrimeo e hiperemia conjuntival. Estos síntomas suelen ser muy precoces y resulta útil el entrenamiento del paciente y de sus familiares para su reconocimiento, ya que se siguen, habitualmente, de manifestaciones graves<sup>78</sup>. No deben confundirse estos síntomas con las

rinitis irritativas que producen algunos alimentos durante su manipulación ni con las rinitis gustatorias<sup>79</sup>.

También puede afectar a las vías respiratorias inferiores. En este caso, la dificultad respiratoria por edema de glotis, broncoespasmo, o ambos, es infrecuente como presentación aislada<sup>80</sup> y suele asociarse a una afectación grave multisistémica<sup>81</sup>. Los alimentos también pueden producir síntomas respiratorios por inhalación de proteínas volátiles (vapores de cocción, olor, pulverización...etc)<sup>30,82</sup> en ámbitos domésticos (patología del ama de casa y de niños pequeños que comparten ambientes de cocina)<sup>83</sup>, o en actividades profesionales<sup>84-86</sup>. Algunos autores encuentran que la existencia de una alergia a los alimentos empeora el curso del asma.

### **III.5.5. Anafilaxia.**

La afectación multisistémica con cuadros de gravedad variable, o según la última versión de la nomenclatura, con cuadros de riesgo vital<sup>87</sup>, no es rara en la alergia a los alimentos<sup>88,89</sup>. Se estima que los alimentos son la causa de al menos un tercio de los cuadros de choque anafiláctico<sup>90,91</sup>, aunque es posible que estas cifras estén infravaloradas, ya que el cuadro puede ser desencadenado por alimentos ocultos<sup>92,93</sup>. Dentro de las características clínicas pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Piel: prurito, flushing, urticaria, angioedema
- Aparato respiratorio: rinitis, estornudos, estridor y disfonía son características de inflamación y edema de las vías aéreas superiores. La tos, las sibilancias y la disnea son características de obstrucción de la vía respiratoria inferior.
- Aparato cardiovascular: vasodilatación, taquicardia, hipotensión arterial, colapso circulatorio, que pueden provocar shock.

- Gastrointestinal: hinchazón de labios y lengua, prurito en paladar, náuseas, vómitos, dolor abdominal cólico y diarrea.
- Neurológico: ansiedad, cefalea, convulsiones y síncope
- El prurito palmo-plantar es especialmente característico de la fase inicial de la anafilaxia, por lo que debemos estar alerta ante este síntoma.

### **III.5.6. Diagnóstico diferencial.**

Las manifestaciones clínicas por alergia alimentaria no son siempre debidas a causas alérgicas. En algunas ocasiones son producidas por causas tóxicas. Las intoxicaciones producen una amplia gama de síntomas que dependerán del tipo de toxina, su concentración en el marisco y la cantidad de este que se ingiera. Éstas se producen por su ingesta cuando se han alimentado de un cierto tipo de algas (dinoflagelados) que contienen toxinas y que se acumulan en sus tejidos. Según el tipo de toxinas se pueden hacer 4 grupos.

El primero, por toxinas paralíticas. Se conocen 20 toxinas que la pueden producir pero son todas derivadas de la saxitoxina. Los moluscos asociados, generalmente, con esta intoxicación son los mejillones, las almejas, los berberechos y las vieiras. Esta intoxicación puede llegar a ser importante como fue el caso que se presentó en Guatemala, en 1987, en el que se intoxicaron 187 personas, entre las que fallecieron 26, tras la ingestión de sopa de almejas.

En segundo lugar, por intoxicación diarreica. Es producida por un grupo de poliéteres de alto peso molecular, incluido el ácido

ocadaico, toxinas dinofisis, pectenotoxinas y yesotoxina. Los moluscos más implicados son los mejillones, las ostras y las vieiras.

El tercero, por afectación neurológica. Se produce tras la exposición a un grupo de poliéteres conocidos como brevetoxinas. En Estados Unidos los moluscos más asociados a esta intoxicación son los capturados a lo largo de las costas de Florida y en el golfo de México.

Por último, por intoxicación amnésica. Es producida por un aminoácido poco común (ácido domoico) que contamina al marisco. Los moluscos más implicados son los mejillones. En 1987 se presentaron 156 casos de este tipo de intoxicación tras la ingesta de almejas cultivadas (*Mytilus edulis*) en Isla del Príncipe Eduardo, en Canadá; 22 personas tuvieron que ser hospitalizadas y 3 ancianos murieron.



## **VI. OBJETIVOS**

---



#### IV. OBJETIVOS:

- **Objetivo principal** de nuestro estudio:

- Mejorar el diagnóstico de alergia a crustáceos.

- **Objetivos secundarios:**

- Demostrar mediante técnicas in vivo, que algunos pacientes que han sido diagnosticados por un alergólogo de alergia a crustáceos presentan pruebas cutáneas negativas en prick test con algunas especies de langostino.
- Determinar mediante Western Blot qué pesos moleculares tienen las proteínas implicadas en la alergia a crustáceos y si dichas bandas son fijadas por IgE específicas.
- Determinar qué parte del crustáceo es más alergénica, el cefalotórax (cabeza) o el abdomen (cuerpo).
- Comprobar si existe una buena correlación entre las técnicas in vivo empleadas en el diagnóstico de alergia a crustáceos y las realizadas in vitro.
- Determinar todas las bandas proteicas y los pesos moleculares de los 13 extractos de langostino de nuestro estudio (SDS PAGE), así como valorar las similitudes y las diferencias.
- Cuantificar el contenido proteico de cada uno de los extractos.



## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## V. MATERIAL Y MÉTODOS:

La mayor prevalencia de alergia al marisco se da en aquellas poblaciones en las que el marisco forma parte de su dieta habitual. Aunque no existen publicaciones que informen acerca de diferencias en la prevalencia de reactividad a los alimentos de origen marino en las diferentes áreas geográficas, probablemente los individuos que viven en zonas costeras tengan una mayor prevalencia de alergia al marisco. Así, en EE.UU. es más frecuente en pacientes de la zona del Golfo Sur<sup>10</sup>. El marisco implicado dependerá de la cultura gastronómica local<sup>10,94-96</sup>.

### V.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.

#### V.1.1. Demografía de Alava.

El Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria en el año 2005 tenía asignada una población aproximada de 300.000 habitantes según el instituto Nacional de Estadística de España (ww.ine.es). (Figura 5).



Figura 5. Gráfica de población de Alava desde el año 1988 hasta el 2008 según el Instituto Nacional de Estadística de España.

De toda esta población se seleccionó la muestra de este estudio, para ello se utilizó un programa informático llamado Clinic, que contiene una base de datos con todos los pacientes que acudieron al Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria, desde el año 2000 hasta el año 2005. Tras una historia clínica detallada y un estudio alergológico consistente en pruebas cutáneas en prick test y prick by prick, fueron diagnosticados de alergia a crustáceos y/o marisco, realizándose posteriormente un informe médico, que se registra en esta base de datos. Se obtuvo el listado de todos los pacientes y se seleccionaron aquellos que fueron diagnosticados de alergia a marisco (código 103), con independencia de si presentaron angioedema, anafilaxia, urticaria o síndrome de alergia oral, obteniéndose un total de 89 pacientes.

#### **V.1.2. Criterios de exclusión de la muestra.**

Se excluyeron todos los pacientes que cumplieran las siguientes características:

- Atópicos (más de 3 sensibilizaciones positivas en prick test, incluyendo pólenes de árboles, arbustos, malezas, hongos y ácaros)
- No atópicos que hubieran recibido inmunoterapia específica a cualquier ácaro.
- Menores de edad (<18 años)
- Mayores de 75 años
- Hipersensibilidad a Anisakis (Ig E específica o prick test positivo)
- Enfermedades orgánicas severas: Cardiológicas (valvulopatías, miocardiopatías, angina o infarto agudo de miocardio...etc), pulmonares (asma severo, fibrosis pulmonar...), hematológicas (leucemias, mielomas...etc), hepáticas (cirrosis, hepatitis B,C...etc), renales (insuficiencia renal terminal, diálisis...etc)
- Dermografismo positivo.

### V.1.3. Características de la muestra.

De los 89 pacientes diagnosticados de alergia a marisco, estaban implicados los crustáceos en 63 pacientes. En los 26 pacientes restantes, los moluscos, los cefalópodos o los bivalvos fueron los responsables de su estudio alergológico.

De éstos 63 pacientes, tras 6 de los 7 criterios de exclusión de la muestra (mayores de 75 años, atopia, dermatografismo, sensibilización asintomática a ácaros o en tratamiento con inmunoterapia a ácaros, menor de edad e hipersensibilidad a Anisakis), se redujeron a 29 pacientes.

La elección de los siguientes criterios de exclusión como son las enfermedades graves y la atopia asociadas se debieron principalmente por seguridad en los pacientes.

En este sentido, en la bibliografía se ha descrito reacciones sistémicas tras la realización de pruebas cutáneas<sup>97-101</sup> de alergia y el único tratamiento eficaz es la adrenalina. Aún cuando este riesgo es bajo, una enfermedad grave como la insuficiencia cardiaca, la insuficiencia coronaria, la HTA son contraindicaciones relativas para su uso. Por este motivo, se decide solicitar las historias clínicas en archivos para revisar minuciosamente cada informe médico, detectar dolencias graves asociadas y determinar los resultados de las pruebas alérgicas solicitadas por su alergólogo.

Por otra parte, la mayoría de los pacientes con alergia al marisco son atópicos y éste parece ser un factor de riesgo de expresividad clínica ya que en dichos pacientes son más frecuentes las reacciones más graves<sup>2,11,96, 102-103</sup>.

Así mismo, se seleccionó un control positivo (sensibilizado a crustáceos y ácaros) y un control negativo (no sensibilizado a crustáceos, alimentos ni pólenes). La muestra resultante y objeto de nuestro estudio, fueron 9 pacientes, con edades comprendidas entre 20 y 60 años, que no padezcan enfermedades graves (cardíacas, pulmonares, reumáticas...), diagnosticados de alergia a crustáceos, con hipersensibilidad a Anisakis negativa, sin atopia ni dermatografismo.

#### **V.1.4. Localización de la muestra a estudio, firma del consentimiento informado, realización de pruebas cutáneas y extracción de sangre.**

Se llamó por teléfono a los 9 pacientes seleccionados, y tras explicación detallada del estudio, se les citó fuera del horario laboral del Servicio de Alergia del Hospital Apóstol de Vitoria, en tandas de 3 pacientes cada 30 minutos. Cada uno de los pacientes aceptó libremente formar parte del estudio, y firmaron el consentimiento informado específico de este estudio (véase anexo 3).

El día de la citación, el paciente debe acudir al Servicio de alergia en ayunas, ya que es preciso realizarle una extracción de sangre, así como pruebas cutáneas en prick by prick. El estudio se realizó en el orden siguiente.

Primero, prick test con una batería estándar de aeroalérgenos ambientales comunes en nuestro medio, entre los que se incluyen hongos (*Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria*), pólenes de árboles, arbustos y malezas, así como ácaros (*Tyrophagus Putrescentiae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, *Dermatophagoides Farinae*, *Lepydoglyphus Destructor*) y epitelios de perro y gato.

Segundo, una extracción de sangre, mediante venopunción, donde se extraen 4 tubos secos amarillos grandes, con gel de separación. Tras la extracción, se deja que se consuman los factores de la coagulación durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugan todos los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante que es el suero. Se introdujo el suero de cada paciente en 12 tubos eppendorf con 1000 µl cada uno y posteriormente se congeló a -20 °C.

Por último, prick by prick con las diferentes especies y variedades de langostino, que previamente habían sido alicuotadas, tanto con la cabeza como con el cuerpo de cada una de las especies, un control positivo con histamina y un control negativo con suero fisiológico, realizándose un total de 26 prick test con diferentes partes del langostino a cada paciente.

#### **V.1.5. Selección del control positivo y del control negativo.**

Así mismo, se citó por teléfono para que acudiera al Servicio de alergia a un paciente que en la historia clínica constaban pruebas cutáneas de alergia positivas a ácaros y a crustáceos. Se realizó la misma sistemática de extracción de sangre y realización de pruebas cutáneas de alergia, que resultaron positivas para todos los prick by prick con las distintas especies de langostino. Este paciente fue etiquetado de control positivo. Del mismo modo, un adjunto del Servicio de alergia de dicho Hospital, que no era atópico ni tenía antecedentes de alergia a crustáceos, se ofreció voluntariamente como control negativo, realizándose en consultas una extracción de sangre y la batería de prick by prick citada anteriormente. Todas las pruebas realizadas a este adjunto fueron negativas por lo que fue etiquetado de control negativo.

### **V.1.6. Diseño del estudio.**

Es un estudio descriptivo y transversal, realizado a una población muestral de 11 pacientes (9 casos, 1 control positivo y 1 control negativo) diagnosticados de alergia a crustáceos, realizado en el Hospital Santiago Apóstol de Vitoria, entre los años 2000 a 2005.

### **V.2. VARIABLES A ESTUDIO.**

Las variables a estudio son las pruebas de alergia realizadas a los pacientes entre las que se incluyen los prick test (prick by prick), la determinación de la IgE específica y por último, la cuantificación de la IgE total.

#### **A) Prick test.**

Se consideró positiva una prueba que supere, al menos en 3 milímetros de diámetro mayor de pápula del control negativo. Las pápulas se dibujaron, una por una, en cinta de celofán transparente y posteriormente se midió el diámetro mayor (Figura 6), para introducir esta variable en la base de datos. Así mismo, se realizó un control positivo con histamina y un control negativo con suero fisiológico.

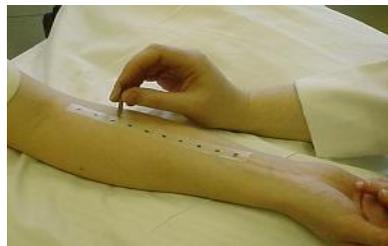


Figura 6. Prick test realizado a una paciente.

### **B) Determinación de IgE específica.**

Se utilizaron los CAPs comerciales con el sistema UNICAP 100® (Figura 4) (Farmacia, Uppsala, Suecia), que está totalmente automatizado de modo que se minimizan los posibles errores. Se determinó la IgE específica frente a los dos tipos de crustáceos que actualmente están en el mercado como son el camarón (F24) y la langosta (F80). Los resultados vienen expresados en KU/l.

### **C) Determinación de IgE total.**

La metodología a seguir es la misma que para la IgE específica. En este caso los CAP comerciales contienen anti-IgE que captura toda la Inmunoglobulina E. Los resultados también se expresan en KU/l.

## **V.3. MATERIAL: EXTRACTO ALERGENICO DE 12 ESPECIES DE CRUSTÁCEOS.**

### **V.3.1. Obtención de las especies de langostino.**

Se obtuvieron diferentes especies y variedades diferentes de langostinos (12 especies muertas y un camarón vivo, que fue congelado), que se obtuvieron de dos pescaderías y un Centro Comercial de Vitoria. Se compraron 2 langostinos de cada una de las especies y fueron introducidos en bolsas individuales. Fue necesario la colaboración del jefe de departamento de dicho Centro Comercial, para obtener la etiqueta identificativa del producto, en donde aparecen los siguientes datos: los ingredientes (producto + conservantes + antioxidantes), método de producción, zona de captura o cría, denominación comercial, denominación científica, modo de presentación o tratamiento, fecha de envasado, peso neto y la empresa distribuidora (Figuras 15-25). Otras especies de langostino se obtuvieron de varias pescaderías de mercadillos, donde fue imposible obtener la tarjeta identificativa de estos últimos.

Los nombres científicos y/o comunes de las diferentes especies y variedades de crustáceos (12 especies muertas y una viva), que fueron usadas en este estudio son los siguientes (Figuras 7 a 14):

1. *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco)
2. *Palaemon serratus* (camarón)
3. *Penaeus SPP* (caribeño)
4. *Penaeus indicus*
5. *Litorraneus vannamei*
6. *Parapenaeus SPP* (gamba arrocerá)
7. *Parapenaeus longirostris*
8. *Litopenaeus vannamei extra* (langostino REV M)
9. *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG)
10. *Parapenaeus longirostris* de Huelva
11. *Parapenaeus longirostris extra* (gamba padrón)
12. *Pleisopenaeus edwardsianus*
13. *Penaeus kerathurus* (langostino tigre).

Las especies 6, 7 10 y 11 son gambas y pertenecen al grupo *Parapenaeus*, sin embargo cada una de ellas tiene una categoría diferente (véase el apartado formatos y categorías usados en la venta mayorista). Las especies 7 y 10 fueron obtenidas de pescaderías diferentes aunque la etiqueta identificativa de ambas es idéntica.

Cada uno de los siguientes crustáceos tiene un tamaño y color específicos de su especie, como se muestra en las Figuras 7 a 14 ambas inclusive.



Figura 7. Imagen de todas las especies de crustáceos usadas en este estudio.

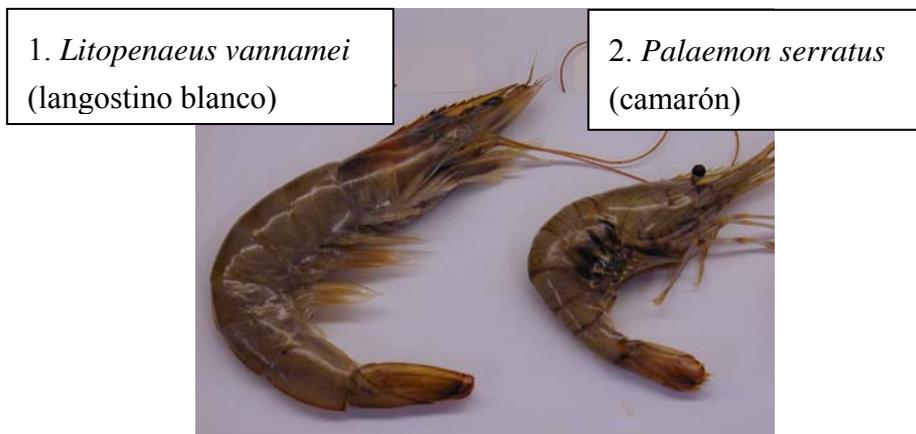


Figura 8. Imagen de los crustáceos 1 y 2, así como su nombre científico y comercial.

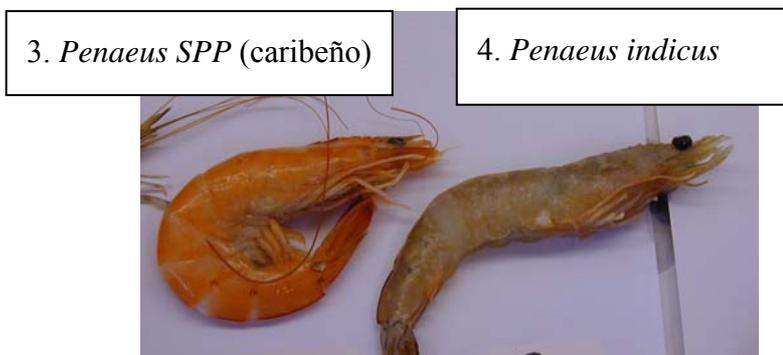


Figura 9. Imagen de los crustáceos 3 y 4, así como su nombre científico.

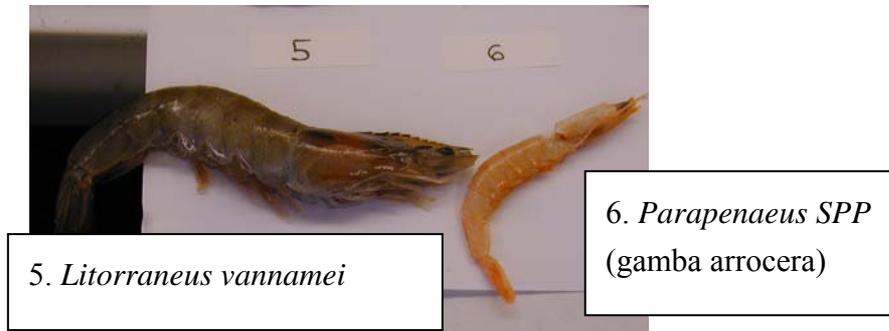


Figura 10. Imagen de los crustáceo 5 y 6, así como su nombre científico y comercial.

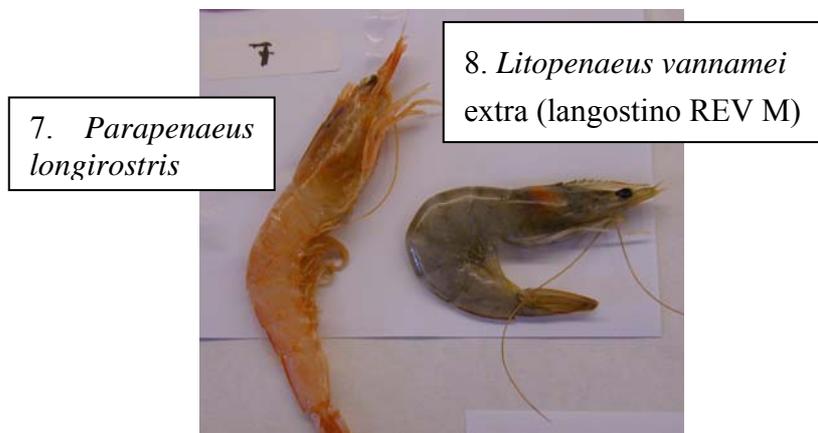


Figura 11. Imagen de los crustáceos 7 y 8, así como su nombre científico.

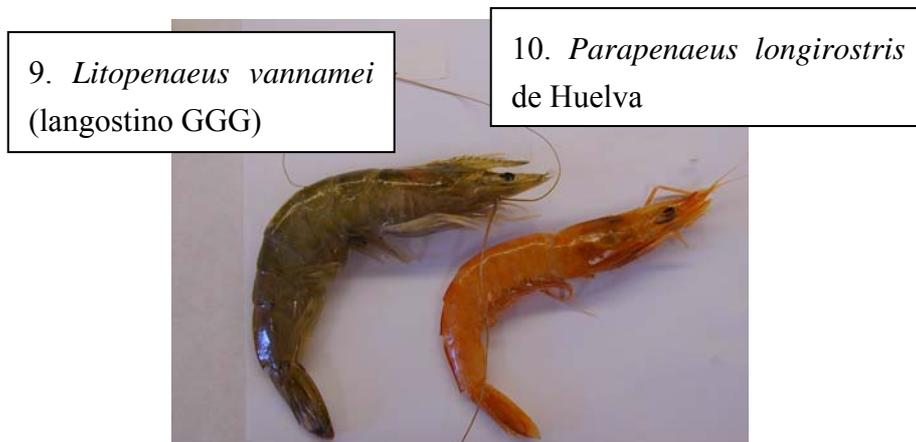


Figura 12. Imagen de los crustáceos 9 y 10, así como su nombre científico.



Figura 13. Imagen del crustáceo 11, así como su nombre científico y comercial.

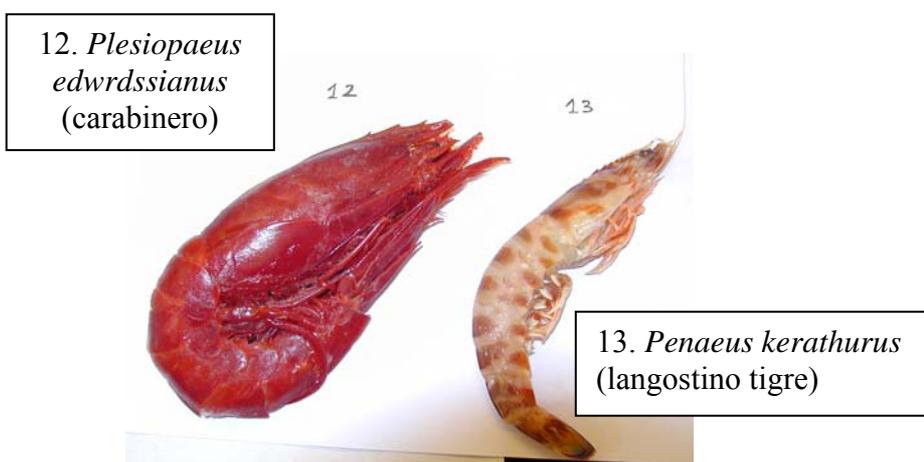


Figura 14. Imagen de los crustáceos 12 y 13, así como su nombre científico y comercial.

### V.3.2. Etiquetas identificativas de los crustáceos a estudio.

Todos los productos de la pesca, de la acuicultura y del marisqueo deben ser registrados mediante etiquetas identificativas, que han de cumplir una serie de normativas.

El Reglamento (CE) 104/2000 del Consejo, de 17 de diciembre de 2000, que establece la organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura, y el Reglamento (CE) 2065/2001 que lo desarrolla, dotan, en el ámbito de la Unión Europea, de

un marco común respecto a la información que el consumidor de productos pesqueros debe recibir.

El Boletín Oficial del Estado (BOE número 31, del día 5 de febrero de 2004) hace referencia a la normativa estatal. En concreto el Real Decreto 121/2004, de 23 de enero sobre la identificación de los productos de la pesca, de la acuicultura y del marisqueo vivos, frescos, o refrigerados o cocidos y el Real Decreto 1380/2002 de 20 de diciembre, de identificación de los productos de la pesca, de la acuicultura y del marisqueo congelados y ultracongelados, modificado parcialmente por el Real Decreto 1702/2004, de 16 de Julio, establecen la normativa básica de etiquetado para productos pesqueros frescos y congelados respectivamente.

Según la normativa vigente el tamaño de las etiquetas deben ser al menos de 9,5 x 4 cm. En cuanto al contenido obligatorio de la etiqueta, recordar que según la normativa éste debe ser el siguiente:

- Productos pesqueros frescos:
  1. Denominación comercial de la especie
  2. Precio por Kg
  3. Zona de captura o cría
  4. Método de producción (pesca extractiva o acuicultura)
  5. Método de presentación (eviscerado, con o sin cabeza, fileteado, cocido, descongelado, otros...)
  
- Productos pesqueros congelados:
  1. Precio por Kg
  2. Denominación comercial de la especie
  3. Denominación “congelado”

4. Zona de captura o cría
5. Modo de presentación (Entero, filetes, otros...)
6. Método de producción (pesca extractiva o acuicultura)
7. Precio neto escurrido
8. Porcentaje de glaseado cuando sea mayor al 5%.

Un estudio del ministerio de medio ambiente, y medio rural y marino, mediante el FROM y la secretaría general del mar, realizó una investigación sobre el cumplimiento del etiquetado de productos pesqueros, llegando a la conclusión que existe un escaso cumplimiento de la normativa del etiquetado entre los detallistas tradicionales, entre los que tan solo el 50% incorpora algún tipo de etiquetado en todos sus productos, porcentaje que se reduce al 25,3% si solo se tiene en cuenta aquellos detallistas que recogen en el etiquetado del pescado fresco toda la información obligatoria, y al 10% en el de los que recogen toda la información obligatoria para productos congelados.

El panorama es diferente en el caso de supermercados e hipermercados, que incluyen etiqueta en todos sus productos en un 84,3% de los establecimientos, recogiendo toda la información obligatoria en el 70,9% de los casos, para los productos frescos, y en el 35% en el caso de los congelados.

En este estudio aparece reflejado que el porcentaje de establecimientos con productos pesqueros bien etiquetados, en una tienda tradicional detallista en el país Vasco es del 43,7%, mientras que en un supermercado/hipermercado en la misma zona es del 79,7%.

Es importante resaltar que fue imposible obtener físicamente las etiquetas identificativas de las diferentes especies y variedades estudiadas, ya que en algunas pescaderías o bien no tenían dicha etiqueta

identificativa, simplemente desconocían el nombre científico o nos permitieron la información de la etiqueta pero no nos entregaron dicha etiqueta. No obstante, en todos los casos nos mencionaron el nombre comercial de todas las especies.

Este hecho no fue tan manifiesto en un Centro Comercial de Vitoria, donde fue más accesible dicha información.

Se muestran a continuación las etiquetas identificativas que se pudieron obtener de las distintas especies de langostino (Figuras 15 a 25). En todas ellas se ha borrado intencionadamente el distribuidor y el proveedor para proteger su anonimato.

<b>NOMBRE COMERCIAL</b> <b>LANGOSTINO BLANCO</b>		<b>MODO DE PRESENTACIÓN</b> <b>DESCONGELADO</b>	
<b>ORIGEN</b> VENEZUELA CRIADO EN: VENEZUELA ESPECIE: LITOPENAEUS VANNAMEI	<b>CALIBRE</b> 40/50 Pz/Kg	<b>INGREDIENTES</b> Langostinos, antioxidante (E-223). Contiene sulfitos.	
<b>PROVEEDOR</b>		<b>FECHAS</b>	
CIF: <input type="text"/>	Nº lote y envasado:	Caducidad:	
Nº RSI: <input type="text"/>	23 ABR 2006	28 ABR 2006	

Figura 15. Etiqueta identificativa del *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) (nº 1).



Figura 16. Etiqueta de venta del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2)

<b>GAMBA</b> <b>ARROCERA XX</b> <b>REF. 1177</b> Ingredientes: gamba, E-222, E-330, E-301, E-450i <b>FECHA ENVASADO: 21-04-09</b> Caducidad 5 días Conservar entre 0 - 4 °C	<b>ZONA DE CAPTURA O CRIA,</b> Atlántico centro-este	
	<b>DENOMINACIÓN COMERCIAL:</b> Gamba <b>DENOMINACIÓN CIENTÍFICA:</b> <i>Parapenaeus longirostris</i>	
<b>PESO NETO:</b> 4 kg	<b>MÉTODO DE PRODUCCIÓN:</b> Pesca extractiva	<b>MODO DE PRESENTACIÓN O TRATAMIENTO:</b> c/c.

Figura 17. Etiqueta identificativa del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (nº 6).

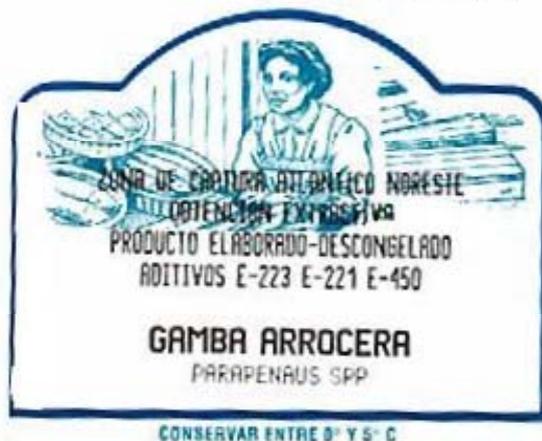


Figura 18. Etiqueta de venta del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (nº 6)



Figura 19. Etiqueta identificativa del *Parapenaeus longirostris* (nº 7)

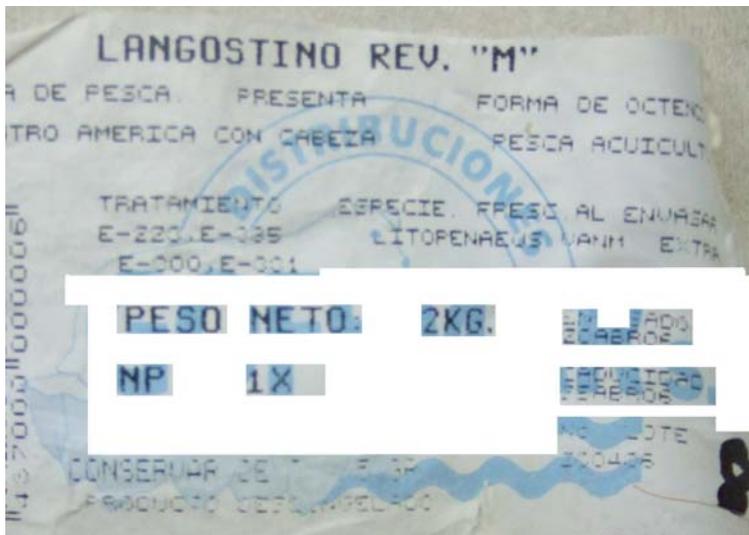


Figura 20. Etiqueta identificativa del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8)



Figura 21. Etiqueta identificativa del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10).

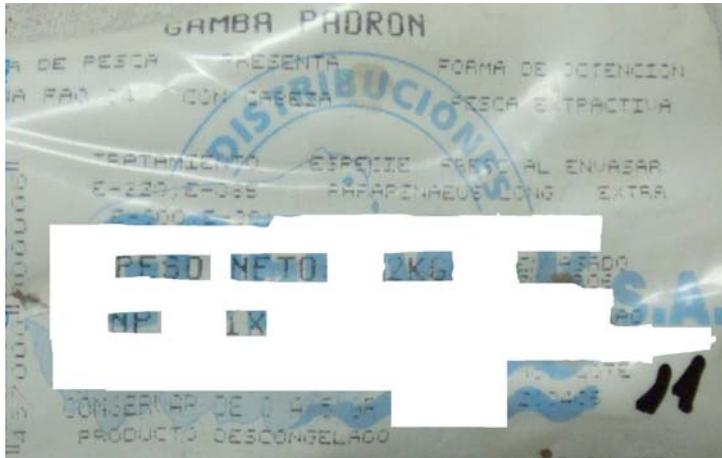


Figura 22. Etiqueta identificativa del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11).

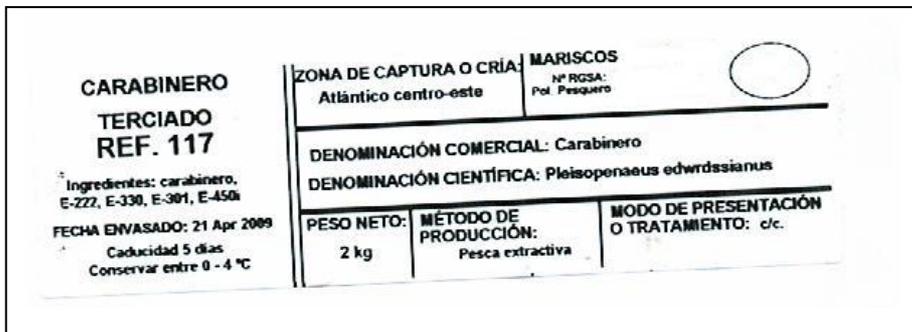


Figura 23. Etiqueta identificativa del *Pleisopaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12).



Figura 24. Etiqueta de venta del crustáceo del *Pleisopaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12)



Figura 25. Etiqueta identificativa del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13)

Algunas de las etiquetas estaban mojadas, por lo que la humedad, y el paso del tiempo hicieron que presentaran daños importantes, de ahí la baja calidad de algunas de las fotografías de las etiquetas identificativas presentadas anteriormente.

### V.3.3. Listado de todos los productos químicos empleados en los langostinos según su etiqueta identificativa.

E-385	EDTA	Emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes
E-301	Ascorbato sódico	ANTIOXIDANTES
E-330	Acido cítrico	Emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes
E-222	Bisulfito sódico	SULFITOS(conservantes)
E-223	Metabisulfito sódico(pirosulfito sódico)	SULFITOS(conservantes)
E-300	Acido ascórbico	ANTIOXIDANTES
E-331	Citratos de sodio	Emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes

Tabla 3. Todos los aditivos alimentarios reflejados en las etiquetas identificativas

La Tabla 3 recoge todos los aditivos alimentarios autorizados en la Unión Europea, que se añadieron a las especies de nuestro estudio ya que así consta en la etiqueta identificativa.

Éstos se clasifican por una letra común a todas ellas, que es la E y un número que determina específicamente a la sustancia química. Todos ellos se engloban dentro de varias categorías como son emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes, conservantes como los sulfitos y antioxidantes. El listado completo de todos ellos aparece al final de este trabajo (véase anexo 4).

#### **V.3.4. Formatos y categorías usados en la venta mayorista.**

En algunas de las etiquetas identificativas aparecen conceptos muy especializados como por ejemplo, langostino REV, langostino M, langostino GGG o extra. Como veremos más adelante, hacen referencia a los formatos y las categorías usados en la venta mayorista. Anteriormente, se clasificaba sólo por dos parámetros, el primero si el producto estaba crudo o cocido y un segundo que hacía referencia a la talla o tamaño. Actualmente, este concepto se ha depurado, clasificándose en el número de piezas que son necesarias para pesar un kilogramo. Esto nos da una idea más exacta del tamaño de la especie, así como es necesario para entender mejor a que nos referimos cuando usamos esta nomenclatura.

Así mismo, existen otras denominaciones más usuales, que también hacen referencia a la categoría, como por ejemplo gamba arrocera (nº 6), que hace referencia a un pieza de gamba más pequeña, ya que según la Tabla 4 (formatos y categorías más usuales en venta mayorista), son necesarias más de 100 piezas para pesar un kilogramo. También aparece en dicha Tabla que se presenta a continuación, el tipo de envase, el peso y el transporte. Dichas características no fueron recogidas en nuestro estudio.

Todas estas categorías serán usadas al analizar los resultados de las distintas especies y variedades de crustáceos de este estudio.

<b>Formatos y categorías más usuales en venta mayorista</b>
---

**ANTERIORES**

<b>Clasificado por</b>	<b>Envase y peso</b>	<b>Transporte</b>
Tallas o tamaños (cruda o cocida)	Caja de madera de 2 Kg	En camión “pescadero” de toldo, con cartolas fijas en los laterales para evitar el desplazamiento de la carga. También por ferrocarril.

**ACTUALES**

<b>Gamba Clasificado</b>	<b>Categoría</b>	<b>Envase y peso y transporte</b>
Tallas o tamaños (cruda o cocida)	<p>Cruda* y cocida (fresca): Extra: (40-50 piezas/kg) Gigante (50-70 piezas/kg) Selecta (80-100 piezas/kg) Pequeña o arroceras (+100 piezas/kg)</p> <p>Cruda* y cocida (congelada): G1 (60 piezas/kg) G2 (70 piezas/kg) G3 (80-90 piezas/kg) G4 (90-100 piezas/kg) G3X o arroceras (+100 piezas/kg) Colas o sin cabeza</p> <p>*La mayor parte de lo que se pone a la venta.</p> <p>Nota: los tamaños grandes son especialmente demandados por la restauración, en congelado y sin cocer.</p>	<p>Fresca (cruda), en caja madera o en “corcho” de poliespán, de 1 kg en los tamaños grandes y de 2 kg en los pequeños o arroceras, con hielo. Cocida, a parte de cajas, también se presenta en bandejas (200-500 gr) de poliespán retractiladas, envasadas en atmósfera inerte o protectora. Sellado de envase, film barrera de polipropileno multicapa.</p> <p>Congelada (cruda): envasado en cartón al peso y congelada a bordo. Cocida, en cajitas de madera de 1 kg y en “corcho” de poliespán de 1-2 kg. El formato “colas” o sin cabeza, en bolsa de plástico de 1 kg o cajas de cartón de 2 a 4 kg a granel, por tallajes y piezas/libra. El congelado, en general, siempre con etiqueta de envasado, procedencia y consumo preferente. Transporte: el fresco, en camión frigorífico a 0°/ 5°. El congelado a -18/-20°.</p>
<b>Carabinero Clasificado</b>	<b>Categoría</b>	<b>Envase y peso y transporte</b>
Crudo, fresco y congelado, por tallas	<p>Especialmente categorías: Brillante G (8 a 12 piezas/kg) (sobre todo procedencia Marruecos) Brillante M (13 a 19 piezas/kg) Brillante P (20 a 30 piezas/kg)</p>	<p>Fresco: en cajas de madera de 1 ó 2 kg con una rotación en Merca de 1-2 días. Congelado: en cajas de cartón de 2-3 kg, dependiendo del tamaño. Transporte: el fresco, en camión frigorífico a 0°/ 5°. El congelado a -18/-20°.</p>
<b>Camarón Clasificado</b>	<b>Categoría</b>	<b>Envase y peso y transporte</b>
<p>Cocido y congelado, por tallas</p> <p>Nota: También se comercializan pequeñas cantidades de crudo y vivo.</p>	<p>G (100 a 150 piezas/kg) aprox. M (150 a 250 piezas/kg) aprox. P (250 a 350 piezas/kg) aprox.</p>	<p>G y M: en caja de “corcho” de poliespán de 1 kg o en formatos de bandejas retractiladas con atmósfera inerte de 300 g. P: en caja de “corcho” de poliespán de 2 kg o en formatos de bandejas retractiladas con atmósfera inerte de 300 g. También se pueden encontrar envasados en bandeja de aluminio con tapa de plástico, de 1 kg. Transporte: el fresco, en camión frigorífico a 0°/ 5°. El congelado a -18/-20°.</p>

Tabla 4. Formatos y categorías más usuales en venta mayorista

### V.3.5. Realización de alícuotas y conservación de las especies hasta la realización de las pruebas in vivo e in vitro.

Como ya se ha comentado, se compraron 2 langostinos de cada una de las diferentes especies y variedades, uno para realizar el prick by prick y el otro para realizar el extracto. Para realizar el prick by prick, previamente, fue necesario fraccionar cada una de las especies en 10 alícuotas de cada cuerpo y 4 alícuotas de cada cabeza de langostino, obteniéndose un total de 182 alícuotas, que fueron introducidas cada una de ellas en sus correspondientes tubos eppendorf codificados con una letra y se conservaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de las pruebas cutáneas.

### V.3.6. Codificación de los datos.

► **SUERO**: Se realizó, a cada paciente, una extracción de sangre mediante el sistema vacutainer® (Figura 26) de 4 tubos secos con gel de separación, que contienen EDTA. Tras dejar transcurrir 30 minutos para que se consuman los factores de la coagulación, se centrifuga (Figura 27) a 3000 RPM, durante 10 minutos, obteniéndose 3 niveles (Figura 28). El sobrenadante de cada frasco, es el suero del paciente, que se alícuotó en 12 tubos eppendorf (Figura 29) con 1000  $\mu\text{l}$  en cada tubo, asignando un número a cada paciente del 1 al 9, por orden de llegada. Así como también se extrajo sangre a un control negativo y un control positivo.



Figura 26. Sistema Vacutainer® usado para la obtención de la sangre de los pacientes del estudio.



Figura 27. Centrifugadora Mistral 2000R usada para centrifugar la sangre y separar los elementos formes del suero.

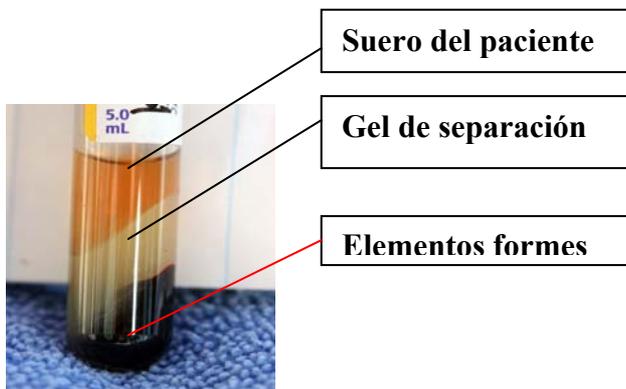


Figura 28. Observese los 3 niveles creados tras la centrifugación sanguínea.



Figura 29. Tubos eppendorf® usados para alicuotar el suero de los pacientes a estudio.

► **EXTRACTO:** Se recogió el nombre de cada una de las especies con su nombre científico, y se le asignó una letra (codificó) tanto a la cabeza como al cuerpo de cada uno de los crustáceos, de tal forma que el paciente desconocía la especie con la que se le realizaban las pruebas cutáneas, así como el investigador también desconocía con qué variedad realizaba las pruebas in vitro. Se trabajó en todo momento con muestras codificadas con letras (Tabla 5)

1. <i>Litopenaeus Vannamei</i> (langostino blanco)	1 cuerpo	Y
	1 cabeza	Z
2. <i>Palaemon Serratus</i> (camarón)	2 cuerpo	N
	2 cabeza	L
3. <i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	3 cuerpo	B
	3 cabeza	Q
4. <i>Penaeus Indicus</i>	4 cuerpo	P
	4 cabeza	X
5. <i>Litorraneus Vannamei</i>	5 cuerpo	E
	5 cabeza	O
6. <i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	6 cuerpo	I
	6 cabeza	U
7. <i>Parapenaeus longirostris</i>	7 cuerpo	F
	7 cabeza	K
8. <i>Litopenaeus vannamei</i> extra (langostino REV M)	8 cuerpo	G
	8 cabeza	W
9. <i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	9 cuerpo	A
	9 cabeza.	M
10. <i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	10 cuerpo	γ
	10 cabeza	T
11. <i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	11 cuerpo	D
	11 cabeza	C
12. <i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	12 cuerpo	S
	12 cabeza	R
13. <i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	13 cuerpo	H
	13 cabeza	J

Tabla 5. Codificación de todas las especies de langostino realizadas en este estudio.

### V.3.7. Realización de los extractos.

1° Se preparó PBS (1 litro de agua destilada + 1 sobre de phosphate buffered saline Ph 7,4 de la casa comercial SIGMA, en agitación continua con “mosca”)

2° Se “maceraron” en mortero (Figura 30) y por separado, tanto la cabeza como el cuerpo de cada una de las especies de crustáceos (12 especies muertas y una viva), y el resultante se virtió en un recipiente.

3° Se añadió PBS en cada uno de los recipientes hasta quedar sumergidos completamente y se mantuvo en agitación continua durante 24 horas a una temperatura de 18° C.

4° Al día siguiente cada uno de los recipientes, y por separado, se filtran con un papel de filtro empapado previamente en agua destilada, y se introduce el líquido obtenido en filtros de diálisis, que serán cerrados por ambos extremos, evitando cualquier fuga (Figura 31). Todos los filtros de diálisis, se introducen en un recipiente que contiene PBS, durante 24 horas en agitación continua con una “mosca”.

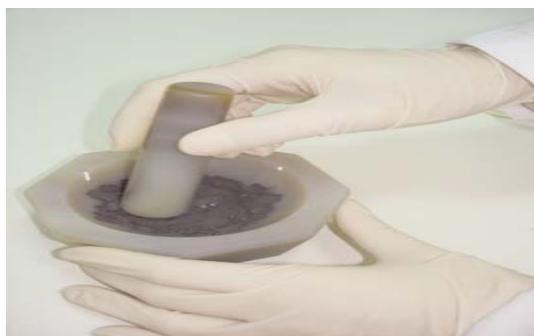


Figura 30. “Maceración” con mortero de las especies de langostino (cabeza y cuerpo) por separado.

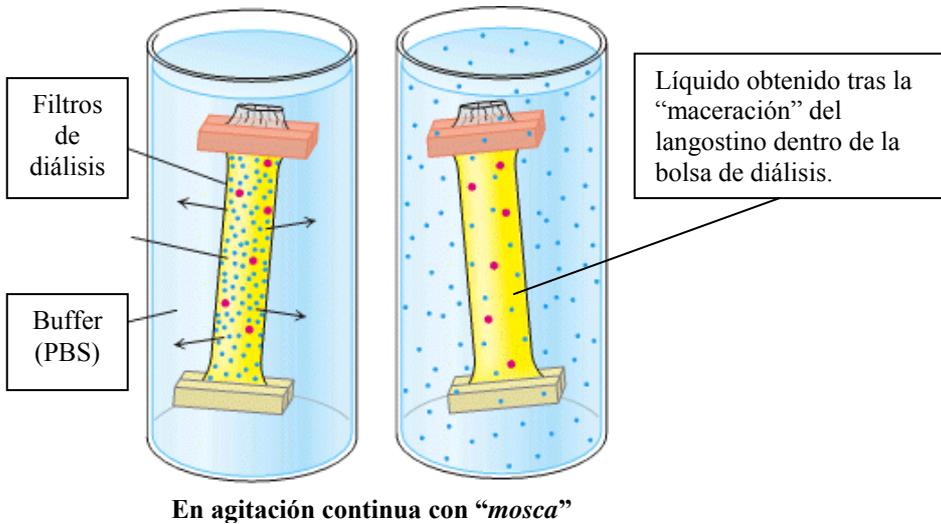


Figura 31. Separación de las proteínas por filtración.

5° Al cabo de 24 horas se sustituye el PBS por agua destilada, y se deja otras 24 horas e igualmente en agitación continua con “mosca”.

6° Se procede a extraer el líquido contenido en cada uno de los filtros de diálisis y se centrifuga durante 15 minutos a 3.000 RPM a una temperatura de 4°C.

7° El líquido sobrenadante, se aspira con una jeringa de 10 cc y se filtra con un micropore de 0,8  $\mu\text{m}$  (MILLEX® AA). El líquido obtenido sufre una última filtración mediante un micropore de 0,22  $\mu\text{m}$  (MILLEX® GP) (Figura 32)

8° Se congela el líquido obtenido a -20°C.

9° Se procede a la liofilización, que consiste en eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenido en el extracto. Dicho proceso se realiza mediante la introducción del líquido congelado, anteriormente citado, en una liofilizadora a una presión de 0,230 milibares y una temperatura de -48° C. Esta misma técnica se realizó con

el cuerpo y con la cabeza de cada una de las diferentes especies y variedades de langostino.



Figura 32. Filtración mediante unidades de filtración MILLEX® con membrana micropore.

### V.3.8. Prick test con extractos comerciales de neumoalérgenos.

Se utilizó de forma estándar (extractos alérgicos en solución salina glicerinada al 50% con un 0,5% de fenol como conservante) los extractos comerciales de ácaros de la casa comercial Leti S.A Barcelona. España.

- Prick test con neumoalérgenos:

- Pólenes: phleum, cynodon, olivo, Chenopodium, Salsola, plátano de sombra y ciprés.
- Hongos: Aspergillus, Alternaria y Cladosporium.
- Epitelios: perro y gato.
- Acaros (Dermatophagoides Pteronyssinus, Dermatophagoides Farinae, Lepydoglyphus Destructor y Tyrophagus Putrescentiae).

Las concentraciones correspondientes a alérgenos estandarizados biológicamente son las siguientes:

	Ácaros(*)
Volumen	2 ml
Concentración	100 HEP/ml

(\*) Blomia tropicalis, D. pteronyssinus, D. farinae, y Euroglyphus maynei. La concentración del resto de ácaros es 30 HEP/ml.

## V.4 MÉTODOS:

### V.4.1. Pruebas cutáneas: Prick by prick.

El prick test es, en Alergología, una técnica diagnóstica básica para el estudio de hipersensibilidad inmediata, que nos permite demostrar la presencia de IgE. Son los equivalentes in vivo, a la determinación de IgE específica en suero, aunque los resultados no son siempre paralelos. El prick by prick es idéntico al prick test con la diferencia que se usan alimentos frescos en lugar de extractos comerciales.

Normalmente, se realiza en la cara anterior del antebrazo del siguiente modo:

1° Los puntos en que se realiza la prueba se marcan con un rotulador indeleble y deben estar separados, al menos, 3 cm entre ellos.

2° Se punciona, un par de veces, con la lanceta (Figura 33) el cuerpo o la cabeza, del langostino a estudio.

3° Inmediatamente se realiza una punción superficial, con dicha lanceta, sin llegar a provocar sangrado. De este modo se expone el antígeno con una solución de continuidad de la piel.

4° Se coloca un pañuelo de papel sobre la piel, sin arrastrar para evitar la contaminación de zonas adyacentes.

5° Se administra un control positivo (clorhidrato de histamina) y un control negativo (solución salina al 0,9%) (Figura 34)

6° Se lee el resultado a los 15 minutos y se apunta el tamaño de la pápula en milímetros.

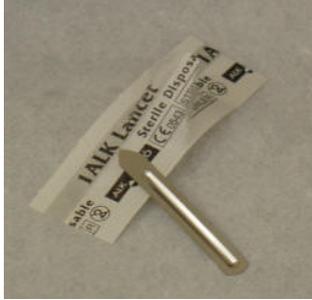


Figura 33. Tipo de lanceta usada para realizar prick test y prick by prick en este estudio.

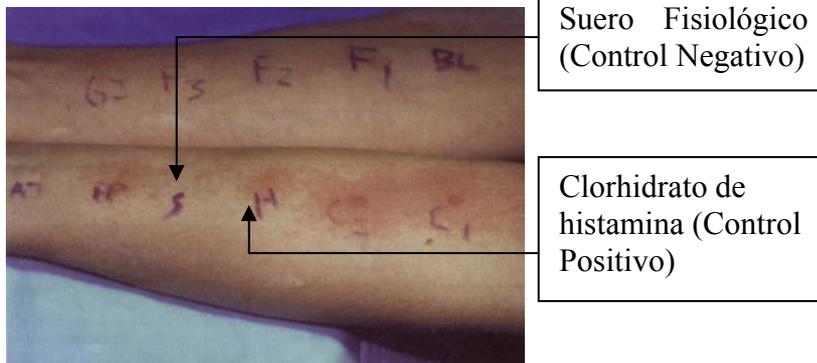


Figura 34. Resultado del prick by prick, el control positivo (clorhidrato de histamina) y un control negativo (solución salina al 0,9%).

Las pruebas cutáneas se realizaron siguiendo los siguientes estándares:

- Se realizaron en la cara anterior de ambos antebrazos, disponiéndose en línea y comenzando con una separación de 3 cm de la zona de flexión del codo y de la muñeca.
- El tiempo de lectura, tras la realización del prick by prick y del prick test, fue constante para todos los pacientes (15 minutos).
- Ningún paciente había recibido en los 5 días previos ninguna medicación que pudiera modificar la respuesta cutánea.
- Se realizaron todas las pruebas entre las 17:00 y las 18:30 horas para evitar las diferencias circadianas en la sensibilidad cutánea. Se citaban 3 pacientes por día cada 30 minutos, durante 4 días no consecutivos.

- En la lectura inmediata (15 minutos), se valoraron tanto la pápula como el eritema. Una prueba se consideró positiva, si el valor del diámetro mayor de la pápula era mayor de 1 mm, siempre que el suero salino (control negativo) fuera negativo.
- Se utilizó una lanceta en cada prick by prick para evitar pruebas cutáneas positivas por arrastre.

#### **V.4.2. Extracción y almacenamiento de los sueros.**

Los sueros de los pacientes incluidos en el estudio se obtuvieron por punción venosa y se separaron por centrifugación. Posteriormente los sueros fueron alicuotados y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización.

#### **V.4.3. Determinación de IgE específica para camarón (F24) y langosta (F80).**

Se realizó la determinación de las 12 muestras de suero de los pacientes para determinar la IgE específica frente a camarón (F24) y langosta (F80) mediante UniCap100 (Figura 35), un instrumento totalmente automatizado que incluye un software para realizar pruebas inmunodiagnósticas de laboratorio. El instrumento está diseñado para distribuir muestras, ImmunoCAP/EliA Wells (pocillos) y reactivos, y procesa todos los pasos, desde la incubación, el lavado, y la medición hasta el cálculo y la impresión de los resultados.



Figura 35. Obsérvese 2 aparatos UniCap®100 conectados a un ordenador y una impresora para procesar e imprimir los resultados.

El funcionamiento de este aparato consiste en poner en contacto el antígeno en fase sólida (F24 y F80) con el anticuerpo en fase líquida (IgE del suero del paciente), se lava, para eliminar la IgE, que no se ha unido de forma específica al antígeno. Posteriormente, la IgE fijada al alérgeno es detectada por una mezcla de anticuerpos mono y policlonales, dirigidos contra la porción constante (Fc) de la IgE, conjugados con la enzima beta- galactosidasa. Tras parar la reacción, se mide la fluorescencia mediante calibradores (Figura 36)

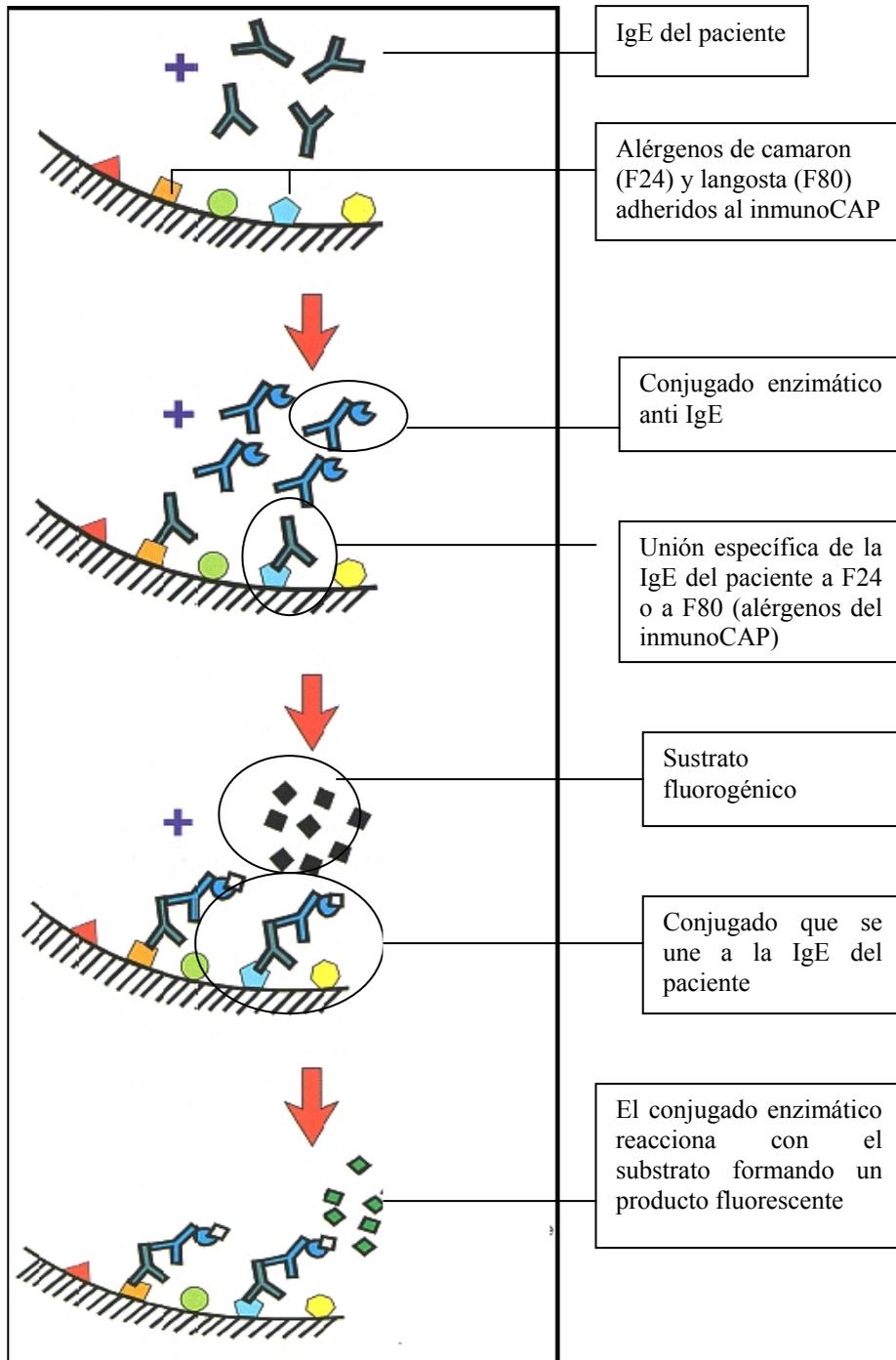


Figura 36. Representación esquemática del funcionamiento del UniCap®100

El ensayo está calibrado frente al standard de la OMS para IgE, con un rango entre 0,35 KU/L y 100 KU/L. Así obtendremos los valores de IgE específica, en clases, que corresponden a la escala representada en la Tabla 6.

<b>RESULTADOS CUANTITATIVOS</b>	<b>NIVEL DE ALERGENO</b>	<b>CLASES DE IgE ESPECIFICA</b>
< 0,35 KU/L	Ausente o indetectable	0
0,35-0,7 KU/L	Bajo	1
0,7-3,5 KU/L	Moderado	2
3,5-17,5 KU/L	Alto	3
17,5-50 KU/L	Muy alto	4
50-100 KU/L	Muy alto	5
> 100 KU/L	Muy alto	6

Tabla 6. Resultados cuantitativos y semicuantitativos de los valores del CAP para determinación de IgE específica.

#### **V.4.4. Método Bradford de cuantificación de proteínas (Bio Rad protein assay en placa microtiter®).**

Dado que para realizar el inmunoblotting se debe cargar la misma cantidad de proteínas en todos los carriles era necesario saber la concentración de proteínas de cada uno de los extractos. Por otra parte, la cantidad de proteínas que hay en el cuerpo de un langostino es muy superior a los de la cabeza. Por todo ello, fue necesario recurrir a esta técnica.

Este método se basa en que todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético (VIS, UV, IR, etc.). Ésta es una propiedad característica de ella, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación.

La absorción de luz depende de la estructura química del compuesto absorbente, y en especial de ciertos grupos funcionales, de modo que es posible identificar un compuesto por medio de las características de su espectro de absorción.

### **A) Análisis espectrofotométrico.**

Todo método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce y a la cual se denomina solución patrón o estándar.

La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer y la de otros componentes del sistema (solventes, reactivos) que absorben también a esa longitud de onda. Estos compuestos se denominan interferencias. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir. Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de éste debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a 0, o sea 100% de transmisión.

### **B) Ley de Lambert-Beer.**

Lambert y Beer demostraron que la absorbancia ( $A$ ), también llamada densidad óptica (D.O.) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración ( $c$ ) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz ( $l$ ) (espesor de la solución) y una constante denominada coeficiente de extinción o coeficiente de absorción ( $a$ ), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) determinada.

Para medir la absorbancia de una sustancia se utiliza el espectrofotómetro, instrumento destinado a medir la absorción por especies inorgánicas y orgánicas de luz monocromática en la región ultravioleta / visible del espectro. El espectrofotómetro, en este caso, el

lector de la absorbancia en microplacas Titerket Multiscan Plus® (Figura 37) da la lectura directa de la absorbancia de cada uno de los 96 pocillos (wells) contenidos en una placa Microtiter.



Figura 37. Lector de la absorbancia en microplacas (Titerket Multiscan Plus®)

### C) Curva de calibrado.

Se obtiene la curva de calibrado midiendo la absorbancia de una serie de soluciones de concentraciones conocidas de una misma sustancia tratadas con un mismo método y medidas a igual longitud de onda en el mismo instrumento. Para medir la concentración de una sustancia se elige por lo general, la región de máxima absorción del espectro, denominada longitud de onda analítica.

El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia ( $A$ ) en función de la concentración ( $c$ ). Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen; de cuya pendiente se puede obtener el coeficiente de extinción ( $a$ )

Es posible determinar gráficamente la concentración de una muestra desconocida ( $c_x$ ) midiendo la absorbancia de la muestra ( $A_x$ ) e interpolando en la curva de calibrado.

Normalmente la concentración del extracto problema, se estima, a partir de la ecuación de la curva de calibrado.

#### **D) Principios básicos del análisis de la proteína Bio rad.**

El análisis de la proteína Bio-Rad, está basado en el método de Bradford. Es un procedimiento simple y exacto para determinar la concentración de la proteína soluble. Consiste en añadir un tinte ácido (dye) a la solución de la proteína problema, y posteriormente medir la absorbancia con un espectrofotómetro a 595 nanómetros. La comparación del extracto problema con una curva estándar proporciona una medida relativa de la concentración de la proteína.

Este análisis de la proteína Bio-Rad consiste en las variaciones de color de un tinte que ocurre en respuesta a diferentes concentraciones de proteína<sup>92</sup>. La absorbancia máxima para una solución ácida con el tinte azul brillante Coomassie® G-250 cambia desde 465 nanómetros a 595 nanómetros al unirse a las proteínas<sup>93,94,95</sup>, ya que el tinte azul de Coomassie se une a los residuos sobre todo básicos y aromáticos de los aminoácidos, especialmente de arginina<sup>96</sup>. Spector<sup>97</sup> encontró que el coeficiente de variación del complejo dye-albúmina era constante sobre una gama de concentración de diez veces. Así, esta ley puede ser aplicada para la cuantificación exacta de la proteína de un extracto problema seleccionando un cociente apropiado del volumen del tinte a la concentración de la muestra.

#### **E) Realización de la curva estándar.**

Se preparó por duplicado 7 diluciones en PBS de la proteína estándar (BSA) entre 0,05 mg/ml a 1 mg/ml. También incorporar a la curva el valor "blanco" (PBS solo). Se administró 200 µl del reactivo de Bradford a los 96 pocillos de una placa microtiter® (Figura 38).

Posteriormente, se agregó 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución del estándar (y del blanco), cuidando de cambiar el tip entre muestras, (o utilizando el mismo tip, pero tomando siempre desde la muestra más diluida a la más concentrada)

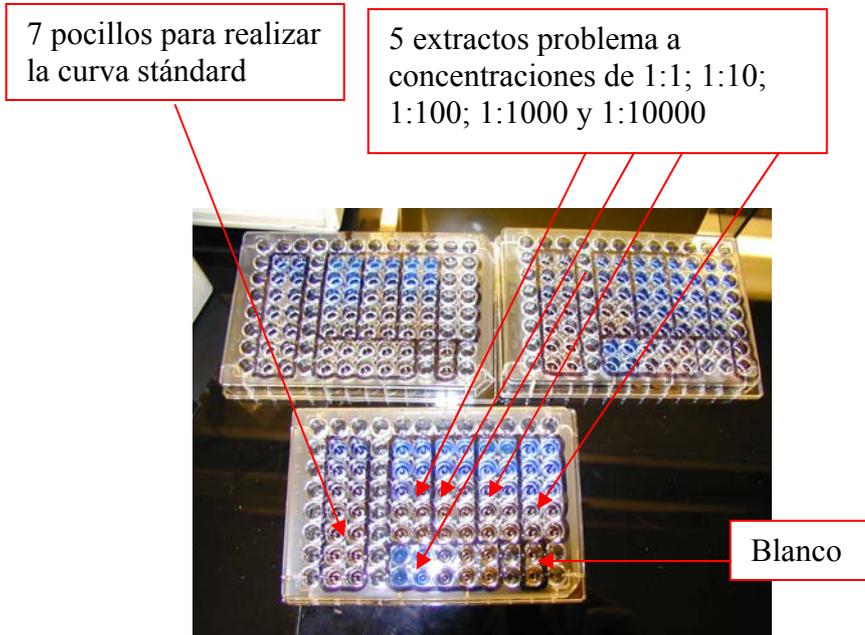


Figura 38. 3 Placas microtiter® que contiene 96 pocillos (wells) en los que se aprecia los 7 pocillos para la curva estándar, el blanco y los extractos problema a distintas concentraciones, todos ellos por duplicado.

### F) Cuantificación de las muestras.

Se realizó primero 5 diluciones seriadas de cada una de los extractos con una concentración 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000 y 1:10000 en PBS. Se añadió 200  $\mu\text{l}$  del reactivo y 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra y sus diluciones en los pocillos, también por duplicado. Fue necesario cambiar el tip (cono de la micropipeta) en cada muestra. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por un mínimo de 5, 15 y 30 minutos.

### G) Realización de los cálculos:

Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Figura 37) a los 5, 15 y 30 minutos. Se apuntaron los resultados (Figura 39) en un papel específico para el cálculo de las proteínas de una muestra, que contiene la distribución de los 96 pocillos en donde el eje de ordenadas cada columna se corresponde con una letra, desde la A hasta la H, y en el eje de abcisas cada fila se corresponde con un número del 1 al 12. La primera fila y la primera columna no se usaron en ninguno de los extractos. Posteriormente en una hoja cuadriculada, en cuyo eje de abcisas está la absorbancia, desde 0 a 1,4 y en el eje de ordenadas la cantidad de proteínas expresada en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , desde 0 a 1,6 se realizó la gráfica de la curva estándar y de cada uno de los extractos, para posteriormente calcular la cantidad de proteína, mediante el punto de corte entre la curva estándar y la del extracto (Figura 40)

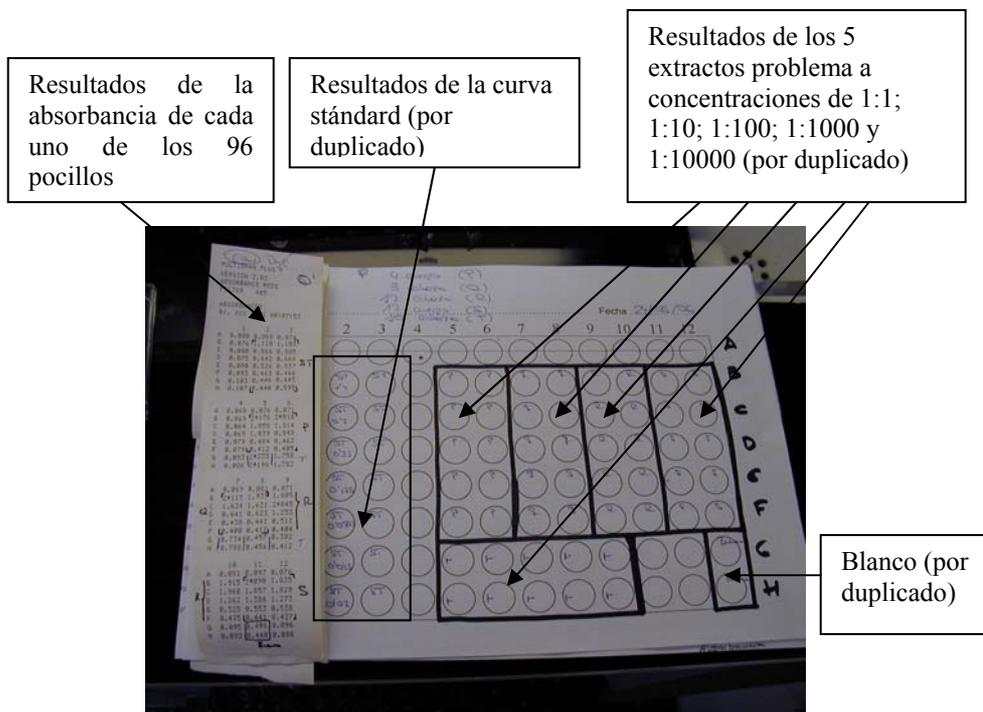


Figura 39. Resultados obtenidos de la absorbancia de 5 extractos de langostino, así como 2 blancos y la curva estándar. Todos ellos por duplicado.

Tras obtener los resultados de cada uno de los pocillos, se procede a realizar la gráfica en la que se representa la curva estándar y el extracto problema para determinar la cantidad de proteínas de éste último. En el eje de abscisas se representa la absorbancia y en el eje de ordenadas la concentración en  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 40).

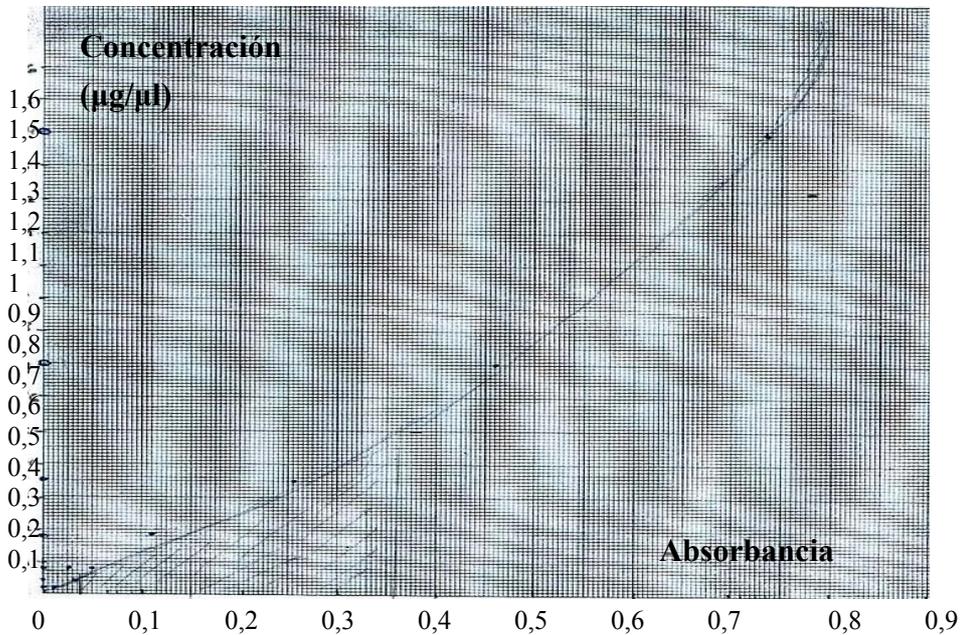


Figura 40. Gráfica en la que se representa la curva estándar y el extracto problema para determinar la cantidad de proteínas de éste último en  $\mu\text{g/ml}$ .

#### V.4.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE).

##### A) Preparación de geles SDS-PAGE. (Laemmli U.K. 1970).

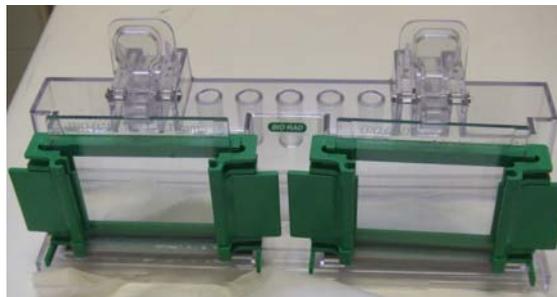
La electroforesis se realiza según la metodología descrita por Laemmli en el año 1970. Los geles son de 7 x 10 cm con un espesor de 0.75 mm. El gel separador se prepara a una concentración de acrilamida del 12% y el gel concentrador del 4% cuya preparación es la siguiente:

1. Se limpian los cristales con jabón y enjuagarlos con abundante agua destilada. Después limpiarlos con metanol para deslipidizarlos.

2. Fijar los cristales procurando que queden a la misma altura con el fin de que el gel no se salga. Para ello se utiliza el soporte (BioRad®) (Figuras 41 y 42) de las placas donde posteriormente se polimerizará el gel. En el soporte para las placas se colocan las gomas inferiores.



Figura 41. Soporte de biorad® en el que se colocan 2 cristales y entre ambos se solidificará el gel, por separado y antes de su montaje.



Figuras 42. Resultado tras colocar las piezas anteriormente citadas.

3. Se comprueba que está perfectamente ajustado llenándolo de alcohol y asegurándose de que éste no se sale por debajo.

4. Se retira el alcohol dejando escurrir, y se prepara el gel separador (acrilamida al 12%) (Ver Tabla 7). Sin perder tiempo se añade

dicho gel entre las placas hasta una altura aproximada de 1 cm del final del cristal pequeño. Después de añadir el gel se pone agua destilada sobre la superficie.

5. Mientras polimeriza el gel de separación, se prepara el gel de inicio o stacking (Tabla 8). Una vez polimerizado el primero, se retira el agua con una jeringa con aguja. Se añade el gel de inicio o también llamado stacking (cuya finalidad es que todas las proteínas comiencen a correr al mismo tiempo) y se coloca el peine, para formar los pocillos, se introduce por un extremo y se eliminan las burbujas.

6. Se deja polimerizar y mientras tanto preparamos el antígeno (ver pasos 8 y 9).

7. Una vez polimerizado el gel de inicio (stacking), retiramos el peine con cuidado de no romper el gel. Se colocan los geles en el soporte para electroforesis (Mini Protean® III de BioRad) (Figura 43).



Figura 43. BioRad Mini Protean 3 con la tapa que presenta dos electrodos para la fuente de alimentación.

8. Se rellena con solución de electroforesis (Tabla 9) la cámara interna del electrodo hasta cubrir el gel por completo y el resto se deposita en la cubeta de electroforesis hasta que el centro del sistema

quede bien cubierto y con jeringa se retiran las burbujas que hayan podido quedar en la parte inferior de los geles.

9. Se añaden siempre 20  $\mu\text{l}$  por pocillo, pero de éstos, dado que conocemos la concentración de cada uno de los extractos, se administra la cantidad ( $\mu\text{l}$ ) de DYE, agua destilada y extracto adecuada para administrar en 4 pocillos adyacentes una concentración de proteína de 12,5  $\mu\text{g}$ , 25  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$  y más de 50  $\mu\text{g}$ . Posteriormente se eligió aquel SDS PAGE que tuviera mejor calidad.

10. Las muestras de cada uno de los extractos y el dye (x3), introducidos individualmente en tubos eppendorf se calientan a 100°C durante 15 minutos mediante el calentador P-Selecta Multiplaces® antes de añadirse a los geles (Figura 44).

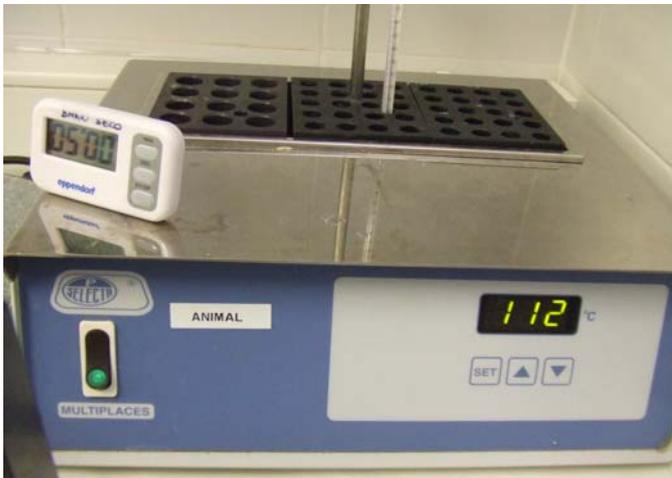


Figura 44. Aparato (P-Selecta Multiplaces®) utilizado para calentar la muestra con DYE (3x) hasta los 100° C.

11. En los últimos 9 pocillos (wells) se cargan 20  $\mu\text{l}$  de nuestro extracto con el dye hasta completar los 10 carriles del gel (Figura 45). En el último pocillo de cada gel, se colocan 7  $\mu\text{l}$  de un patrón de pesos moleculares (Pm) llamado Novex® (Figura 46).

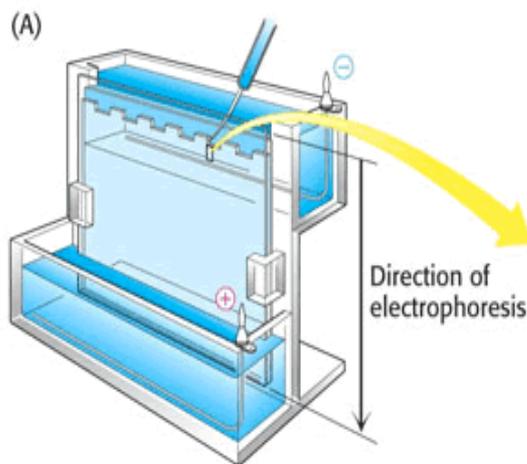


Figura 45. Imagen que ilustra la carga de los carriles con una micropipeta.

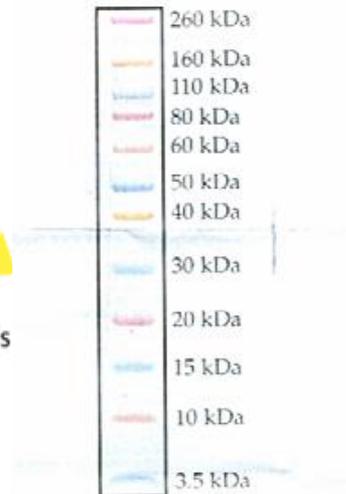


Figura 46. Patrón de pesos moleculares (Novex®).

12. Se coloca la tapa, se conectan los electrodos rojo y negro con su propio color a la fuente de alimentación Hoefer® EPS 2A200 o Powerpac de Biorad® (Figura 47) a 0,04 amperios por gel en corriente continua. Cuando el frente de azul de bromofenol ha llegado hasta el final del gel (Figura 48) se para la fuente de alimentación. El tiempo de este proceso es variable, pero normalente es de 1 hora a 1 hora y 30 minutos.

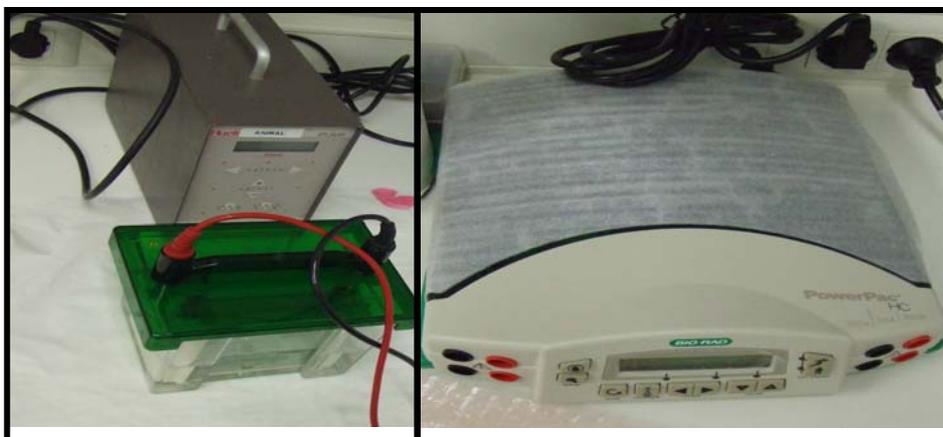


Figura 47. Diferentes fuentes de alimentación. A la izquierda, Hoefer® EPS 2A200 y a la derecha Powerpac de Biorad®. Ambos fueron usados en este estudio.

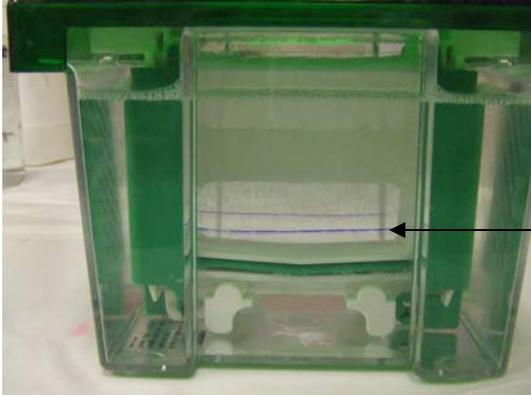


Figura 48. La flecha indica el frente de azul de bromofenol llegando hasta el final del gel

13. Se desmonta el gel y se separa de las placas ayudándose de agua destilada.

14. Teñir y desteñir el gel tal y como se describe a continuación.

## **B) TINCION DE PROTEÍNAS**

Para observar las bandas proteicas de cada uno de los extractos con una concentración de proteínas de 12,5  $\mu\text{g}$ ; 25  $\mu\text{g}$ ; 50  $\mu\text{g}$  y más de 50  $\mu\text{g}$ , fue necesario teñir los geles.

La tinción de proteínas se efectuó por inmersión de los geles durante 8 horas en solución de azul de Coomassie 0,5 g/L, ácido acético glacial al 6%, metanol al 45% y agua al 49% tal y como describió Wilson en el año 1983. La decoloración del fondo del gel se efectuó por lavado durante 24 horas y varios cambios, con una solución decolorante que contenía: 10% de ácido acético glacial, 25% de metanol, 2% de glicerol y 63% de agua. Finalmente se secaron entre dos láminas de papel de celofán humedecidas en la misma solución preservadora y sujeta a un vidrio soporte para evitar que se distorsionaran.

### C) REACTIVOS NECESARIOS PARA UNA ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

#### GEL SEPARADOR (resolving)

	5%	7,50%	9%	10%	<b>12%</b>	13%	15 %
H2O destilada	5.45ml	4.7ml	4.3ml	4ml	<b>1,67ml</b>	2.9ml	2.3ml
1.5 M Tris -HCL ph: 8,8	2.5 ml	2.5 ml	2.5ml	2.5ml	<b>1,25ml</b>	2.5ml	2.5ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100µl	100µl	<b>50 µl</b>	100µl	100µl
30% Acrilamida	1.70ml	2.5 ml	3 ml	3.3ml	<b>2 ml</b>	4.5ml	5 ml
APS 10%	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	<b>100 µl</b>	70 µl	70 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	<b>10 µl</b>	7 µl	7 µl

Tabla 7. Listado de los componentes del gel separador (resolving)

#### GEL STACKING (12% 2,5 ML)

Agua Destilada	1,5 ml
Tris/HCL Ph: 6,8. 0,5 M (stacking)	630 µl
SDS 10%	25 µl
30% Acrilamida bis	325 µl
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Tabla 8. Listado de los componentes del gel de inicio o stacking.

#### RUNNING BUFFER 10X PARA 1 LITRO ( ph: 8,3)

TRIS	30,3 g
Glicina	144,6 g
SDS	10 g

Tabla 9. Composición de la solución de electroforesis (running buffer 10x)

## TRANSFER PARA 1 LITRO (ph: 8,3)

TRIS	7,26 g
Glicina	3,75 g
SDS	0,46 g

Tabla 10. Composición de la solución de transferencia o transfer buffer.

## STACKING BUFFER PARA 1 LITRO ( ph: 6,8)

Tris/HCL 0,5 M	60,57 g
----------------	---------

Tabla 11. Composición del stacking para 1 litro.

## RESOLVING BUFFER PARA 1 LITRO ( ph: 8,8)

Tris/HCL 1,5 M	181,71 g
----------------	----------

Tabla 12. Composición del resolving para 1 litro.

**V.4.6. INMUNOBLOTTING.****V.4.6.1. Generalidades del Inmunoblotting.**

La transferencia de proteínas o “*blotting*” supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de “*blot*”. El método más potente es el denominado “*Western blot*” en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern “*Southern blotting*” y por esta razón se le denominó “*Western*”. Hay sin embargo otros métodos de transferir o aplicar proteínas sobre una membrana. El más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una pequeña gota de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o “*dot*” (es el caso del “*dot blot*”).

Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión que facilita la penetración de la solución, y reciben los nombres de “*dot blot*” o “*slot blot*” en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea.

Todo procedimiento de “*blotting*” consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión,...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del “*blot*” con anticuerpos primarios contra las proteínas de interés.
4. Incubación del “*blot*” con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

Hay tres métodos para transferir proteínas a las membranas:

1. Transferencia capilar
2. Transferencia por difusión
3. Transferencia electroforética (“*electroblotting*”)

En el caso de los geles de poliacrilamida el método de elección es la transferencia electroforética. La transferencia es mucho más efectiva si se realiza aplicando una diferencia de potencial entre el gel y la membrana.

#### **V.4.6.2. Inmunoblotting: Protocolo usado con los extractos de langostino.**

En este método, descrito por Towbin et al en 1979, las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente.

Se realizó la transferencia de proteínas separadas mediante SDS PAGE a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham-Biosciences) (Figura 49). Para realizar dicha transferencia, se humedeció la membrana, mediante la inmersión en metanol durante 2 minutos. A continuación se lavó con agua destilada. Posteriormente se monta un “sandwich” en el que se apiló, sucesivamente sobre una esponja plana, papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, otro papel de filtro y finalmente una esponja plana (Figura 50).



Figura 49. Membrana de nitrocelulosa (PVDF) de la casa comercial Amersham Biosciences.

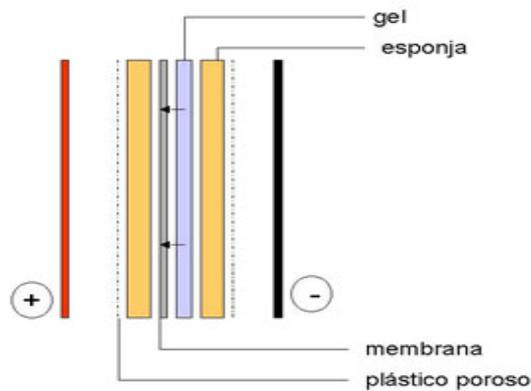


Figura 50. Transferencia electroforética desde gel de poliacrilamida a membranas.

Se realizó la transferencia electroforética mediante el sistema conocido como “*Semi-Dry blotting*” (Figura 51) en el que los geles se someten a una intensidad de corriente elevada entre dos electrodos planos entre los que se coloca el “sandwich” citado anteriormente. El único líquido que hay es el que empapan los papeles. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje de 20 Voltios, 400 miliamperios, durante 55 minutos



Figura 51. Semi-Dry blotting usado para transferir las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.

### A) Bloqueo de la membrana.

Las membranas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4°C, con una solución de leche en polvo en PBS. Seguidamente las membranas se lavaron 4 veces durante 5 minutos, con

agitación vigorosa (Figura 52), con una solución que contenía NaCl 0,12 M, TRIS-HCl 0,01 M, Tween- 20 0,5% (p/v), Ph 8 (Tampón B).

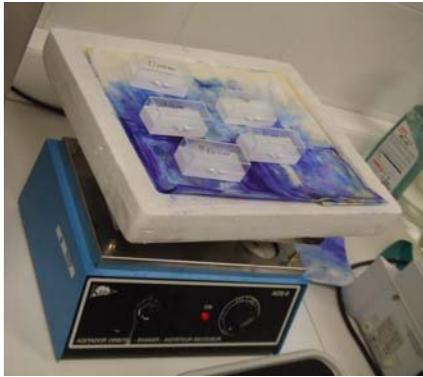


Figura 52. Agitador continuo usado para el bloqueo y lavado de las membranas, así como para el contacto de ésta con el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> Ac

### **B) El 1<sup>er</sup> Anticuerpo.**

En este caso el primer anticuerpo no será comercial, sino que será el suero de los pacientes, ya que éste contiene la IgE específica, que se unirá a la proteína (antígeno) fijada en la membrana.

Se incubaron durante 1 hora con el antisuero específico (suero de cada uno de los pacientes) disuelto en Tampón B con leche en polvo. La dilución del antisuero (1<sup>er</sup> Ac) fue de 1:10000. Finalizada la incubación se lavaron 4 veces durante 5 minutos, con agitación vigorosa (Figura 52), con una solución que contenía NaCl 0,12 M, TRIS-HCl 0,01 M, Tween-20 0,5% (p/v), Ph 8 (Tampón B). Este anticuerpo será posteriormente fijado por un segundo anticuerpo.

### **C) El 2<sup>o</sup> Anticuerpo.**

Existen excelentes anticuerpos policlonales con alta especificidad y sensibilidad como monoclonales. Sin embargo los monoclonales se pueden obtener en mayor cantidad y mantienen siempre sus propiedades de reconocimiento independientemente del lote.

En este caso usaremos el anticuerpo policlonal de cabra anti IgE humana de la casa comercial SIGMA (Figura 53), que está marcado con peroxidasa. Estos anticuerpos se obtienen inoculando en la especie productoras inmunoglobulinas de la especie a detectar (anticuerpos anti-especie).

Las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo (2° Ac), un anti IgE humana marcado con peroxidada y diluido en tampón B con leche en polvo, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Finalizada la incubación se lavaron 4 veces durante 5 minutos, con agitación vigorosa, con una solución que contenía NaCl 0,12 M, TRIS-HCl 0,01 M, Tween- 20 0,5% (p/v), Ph 8 (Tampón B).



Figura 53. Anti IgE humana marcada con peroxidada (2° Ac)

#### **D) Sustrato de la peroxidasa: Luminol (ECLplus-Amersham®).**

Tras los lavados, la membrana de nitrocelulosa se introduce entre dos láminas de plástico transparente, y se añade 1000 µl de supersignal® west pico Chemiluminescent por membrana obtenida de la mezcla de 500 µl de la solución A y 500 µl de la solución B, a temperatura ambiente (Figura 54). Se distribuye bien para cubrir toda la superficie de la membrana y se deja 5 minutos. A continuación se retiró el exceso de

reactivo y se expusieron las membranas en contacto con películas de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences®) (Figura 55) desde 5-10 minutos hasta 20 minutos.



Figura 54. Supersignal® west pico Chemiluminescent substrate

Figura 55. Películas de autorradiografía Hyperfilm ECL de la casa comercial Amersham Biosciences.



### **E) Sistema de revelado.**

El revelado a través de las películas de autorradiografía se realizó en un cuarto oscuro, introduciendo la membrana en el revelador GBX Developer/replenisher (Sigma Aldrich) durante 5, 15 y 30 minutos, en 3 placas diferentes seguido de un lavado con agua destilada y, seguidamente, se introduce en el fijador GBX fixer/replenisher (Sigma Aldrich) durante 2 minutos. Por último se lavan y se dejan secar.

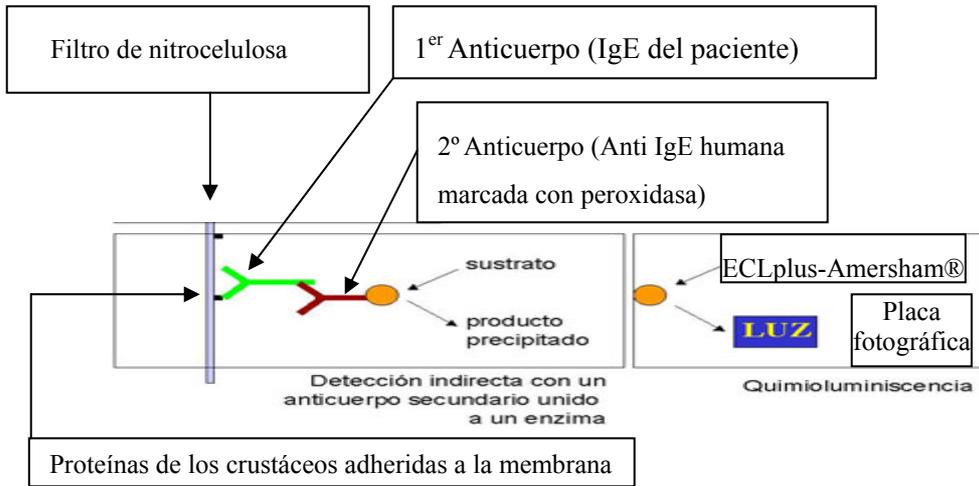
**F. Resumen:**

Figura 56. Detalle del método de detección en “Western-blot” mediante quimioluminiscencia de este estudio.

**V.4.7. ANALISIS ESTADÍSTICO.**

Es un estudio descriptivo y transversal en el que se registraron todos los datos en el año 2005. Se ha realizado una estadística descriptiva con diferentes medidas como las frecuencias, medias, desviación estándar y porcentajes.

Todos los datos fueron procesados con el programa informático SPSS v15.

## **VI. RESULTADOS**

---



## VI. RESULTADOS:

### VI.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA: DATOS DEMOGRÁFICOS.

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística, la provincia de Álava contaba en el año 2005 con una población aproximada de 300.000 habitantes. En este contexto demográfico debe referirse que entre los años 2000 y 2005 un total de 89 pacientes fueron remitidos al Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol por sospecha de alergia al marisco.

De estos 89 pacientes, el 41,57% (37 pacientes) eran hombres, y un 58,42% (52 pacientes) mujeres. El 77,52% de los pacientes (69) fueron diagnosticados de alergia a los crustáceos y el resto a otros tipos de marisco, tales como moluscos cefalópodos o bivalvos.

Las principales manifestaciones clínicas que han presentado los pacientes con alergia al marisco han sido (Tabla 13):

MANIFESTACIÓN CLÍNICA	CÓDIGO	NÚMERO DE PACIENTES
Anafilaxia	780	12
Urticaria-angioedema	100	55
Alergia alimentaria + síntomas respiratorios	201	6
SAO	204	7
Otras causas	101, 999, 200, 041	7
No consta		2

Tabla 13. Relación del número de pacientes, el código y las manifestaciones clínicas de alergia a marisco.

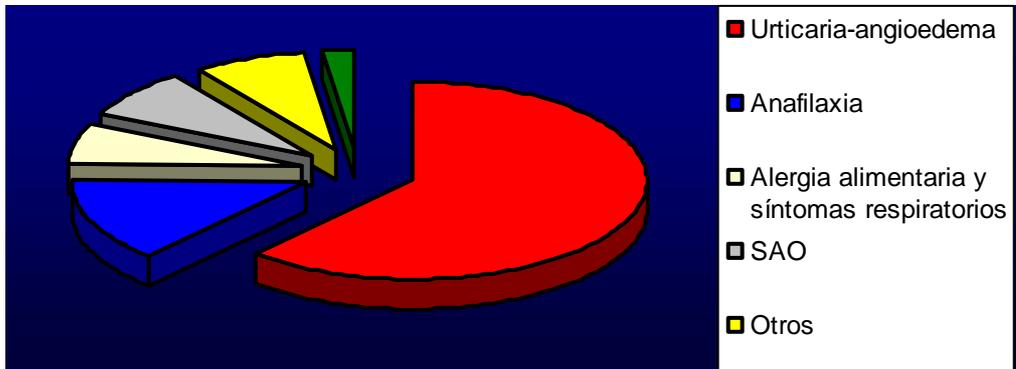


Figura 14. Representación de los principales síntomas clínicos por lo que los pacientes con sospecha de alergia a marisco fueron remitidos al Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria.

La urticaria-angioedema es la manifestación clínica más frecuente de la alergia a marisco con un 61,79%, seguido de la anafilaxia que supone un 13,48%. Entre las dos causas mencionadas previamente suponen el 75,27% de los motivos de consulta en pacientes alérgicos a marisco.

En cuanto al sexo, de los 89 pacientes, 37 fueron hombres (41,57%) y 52 mujeres (58,43%). De los 55 pacientes que presentaron urticaria, 24 (43,6%) fueron hombres y 31 (56,4%) mujeres. Así como de los 12 pacientes que presentaron anafilaxia, 5 (41,6%) eran hombres y 7 (58,4%) mujeres.

Por rango de edades, agrupadas cada 10 años, incluyendo ambos extremos, los resultados fueron los siguientes, 18 pacientes eran menores de 20 años, el mismo número de pacientes sus edades estaban comprendidas entre 20 y 29 años, 21 pacientes entre 30 y 39 años, 11 pacientes entre 40 y 49 años, 12 pacientes entre 50 y 59 años, 3 pacientes entre 60 y 69 años y en 6 pacientes no constaba cual era la causa por la que fueron remitidos al Servicio de Alergia del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria (Figura 57)

El 64% de los pacientes son diagnosticados de alergia a marisco

en los primeros 39 años. El 36% de los pacientes son diagnosticados entre los 39 y 60 años de vida. A partir de los 60 años, el número de pacientes diagnosticados de alergia a marisco cae espectacularmente (sólo 3 pacientes) alcanzando los valores más bajos.

La mayor proporción de pacientes que acuden a un Servicio de Alergia y posteriormente son diagnosticados de alergia a marisco está entre los rangos de edad de 30 a 39 años, y supone un 23,6%.

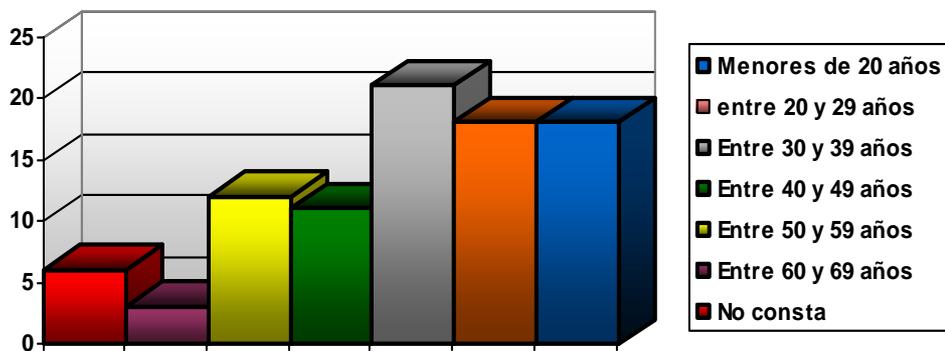


Figura 57. Representación de las edades de los pacientes agrupadas cada 10 años.

Si relacionamos la distribución de la edad de los pacientes con el sexo de los mismos, apreciamos que en el rango entre 60 y 69 años, no hay ninguna mujer. Entre 50 y 59 años, 2 de cada 3 pacientes son mujeres (8 casos) mientras que solo 1 cada 3 son hombres (4 casos). Entre 40 y 49 años, 7 casos son mujeres (63,63%) y 4 casos (36,37%) son hombres. Entre 30 y 39 años, la distribución por sexos es muy homogénea, si bien es mayor la proporción de mujeres que de hombres, ya que 11 casos se corresponden con mujeres (52,38%) mientras que 10 casos (47,62%) son hombres. Entre 20 y 29 años, la proporción de mujeres es mayor que la de los hombres, ya que 11 casos se corresponden con mujeres (61,11%) frente a 7 casos (38,89%) que se corresponden con hombres. En el grupo de los menores de 20 años, 2 de

cada 3 pacientes son mujeres (12 casos) mientras que sólo 1 de cada 3 son hombres (6 casos) (Figura 58)

Por tanto, las mujeres entre 30 y 39 años son las más afectadas, por el contrario los menos afectados serían las mujeres entre 60 y 69 años, ya que no se apreció ni un solo caso con estas características. (Tabla 58)

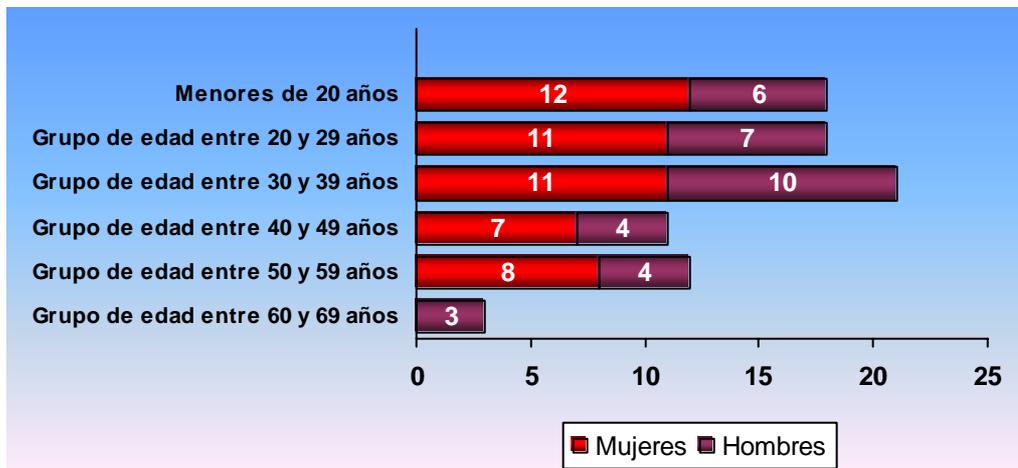


Figura 58. Representación de las edades de los pacientes agrupadas cada 10 años y la proporción en cada grupo de hombres y mujeres.

## VI.2. RESULTADOS DE LAS PUEBAS IN VIVO: PRICK TEST

### VI.2.1. Asignación de un número a cada una de las especies y variedades de crustáceos, así como su nombre comercial y científico.

Se decide tipificar cada una de las especies con un número en vez de escribir en cada Tabla el nombre del crustáceo para evitar sobrecargar en exceso las Tablas y hacer más fácil su visualización. Así mismo, debajo de cada Tabla se explica detalladamente que especies de langostino han resultado positivas mediante su nombre científico o común. Los números de los crustáceos siguen el mismo orden que las fotografías realizadas con cada una de las especies (Figuras 8 -14).

NÚMERO ASIGNADO SEGÚN  
ESPECIE DE CRUSTÁCEO      NOMBRE CIENTÍFICO/ COMUN

1	<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)
2	<i>Palaemon serratus</i> (camaron)
3	<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)
4	<i>Penaeus indicus</i>
5	<i>Litorraneus vannamei</i>
6	<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocerá)
7	<i>Parapenaeus longirostris</i>
8	<i>Litopenaeus vannamei</i> extra (langostino REV M)
9	<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)
10	<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva
11	<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)
12	<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)
13	<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)

Figura 15. Nombre científico, nombre común y número asignado a cada una de crustáceos estudiados.

### **V1.2.2. Resultados de las pruebas cutáneas de alergia mediante prick by prick con las diferentes especies y variedades de langostino.**

Tras la realización en cada paciente de las pruebas cutáneas mediante prick by prick con la cabeza y con el cuerpo de las distintas especies y variedades de crustáceos, detallamos los resultados expresados en milímetros de pápula por milímetros de eritema. Así como el tamaño de la pápula con el suero fisiológico (control negativo) y la histamina (control positivo).

A continuación se presentan los resultados de cada paciente numerados del 1 al 9, y por último los prick test de los pacientes incluidos como control positivo y negativo.

**PACIENTE 1**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	-/-	-/-
2	9x13	12x15
3	-/-	-/-
4	-/-	-/-
5	-/-	-/-
6	-/-	-/-
7	9x14	-/-
8	-/-	4x6
9	-/-	-/-
10	-/-	-/-
11	31x33	-/-
12	-/-	-/-
13	-/-	-/-

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente número 1 presenta 5 pruebas cutáneas de alergia positivas en prick test sobre un total de 26 prick by prick realizados. En estos puede apreciarse claramente como presenta una gran sensibilización a la cabeza del langostino *Parapenaeus longirostris* extra o también llamada gamba padrón (nº 11), así como presenta pruebas cutáneas positivas pero con menor tamaño de la pápula a la cabeza de los langostinos *Parapenaeus longirostris* (nº 7) y el *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2).

Por otra parte, está sensibilizado a un antígeno probablemente proteico localizado en el cuerpo de los langostinos *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8) y el *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2). El resto de las pruebas cutáneas resultaron negativas. Este paciente presenta pruebas cutáneas más positivas frente a las cabezas de los langostinos que a los cuerpos. Así como en algunos crustáceos sólo presenta pruebas cutáneas con la cabeza o con el cuerpo, a excepción del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2), es a ambas partes de este mismo crustáceo.

**PACIENTE 2**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
<b>1</b>	-/-	<b>25x30</b>
<b>2</b>	-/-	-/-
<b>3</b>	-/-	<b>15x19</b>
<b>4</b>	-/-	-/-
<b>5</b>	-/-	-/-
<b>6</b>	-/-	-/-
<b>7</b>	-/-	<b>15x20</b>
<b>8</b>	<b>7x10</b>	-/-
<b>9</b>	<b>6x8</b>	-/-
<b>10</b>	<b>12x12</b>	-/-
<b>11</b>	-/-	-/-
<b>12</b>	-/-	-/-
<b>13</b>	<b>10x10</b>	-/-

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 2 presenta pruebas cutáneas de alergia en prick test a 4 cabezas y a 3 cuerpos de langostino. En cuanto a las pruebas cutáneas positivas con las cabezas de los langostinos, la pápula de mayor tamaño (25 x30) es debida al cuerpo del langostino *Litopenaeus vannamei* o también llamado langostino blanco (nº 1), aunque también está sensibilizado pero de menor intensidad al langostino *Penaeus SSP* o también llamado langostino caribeño (nº 3) y al *Parapenaeus longirostris* (nº 7). En cuanto a la sensibilización a las cabezas de los langostinos son al *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8), al *Litopenaeus vannamei* (langotino GGG) (nº 9), al *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10) y al *Penaeus kerathurus* o también llamado langostino tigre (nº 13).

**PACIENTE 3**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	5x7	5x5
2	5x5	3x4
3	5x7	3x4
4	5x13	4x4
5	5x7	2x4
6	4x4	3x6
7	13x15	12x13
8	3x3	5x11
9	3x9	3x9
10	5x5	5x11
11	3x3	-/-
12	2x3	-/-
13	3x4	2x2

HISTAMINA: 8 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 3 presenta una sensibilización intensa tanto al cuerpo como a la cabeza del langostino *Parapenaeus longirostris* (nº 7), presentando sensibilización de baja intensidad a todos los demás langostinos, tanto de la cabeza como el cuerpo, excepto al cuerpo de los langostinos *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11) y *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12), que resultaron negativos.

**PACIENTE 4**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	6x6	2x2
2	7x9	4x11
3	5x5	4x4
4	4x4	2x5
5	5x9	2x2
6	3x6	3x3
7	4x6	3x10
8	8x12	9x13
9	5x10	2x6
10	4x8	3x6
11	4x9	3x5
12	4x11	2x2
13	8x14	6x9

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 4 presenta una sensibilización más intensa al cuerpo del langostino *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8), aunque está sensibilizado tanto al cuerpo como a la cabeza de todos los langostinos estudiados.

**PACIENTE 5**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	-/-	4x4
2	3x3	8x14
3	2x2	9x16
4	2x2	4x6
5	2x2	4x4
6	-/-	5x7
7	-/-	2x2
8	2x2	3x3
9	-/-	5x5
10	2x2	5x5
11	3x3	2x2
12	-/-	5x6
13	2x2	3x3

HISTAMINA: 7 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 5 presenta una intensa sensibilización al cuerpo del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2) y al *Penaeus SPP* (nº 3) o también llamado caribeño. En el resto de las pruebas cutáneas se aprecia una débil sensibilización, resultando negativo para las cabezas de los langostinos *Parapenaeus longirostris* (nº 7), *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (nº 6), *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9) y *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12).

### PACIENTE 6

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	3x3	2x2
2	2x2	2x2
3	-/-	-/-
4	-/-	2x2
5	3x3	2x2
6	2x2	2x2
7	3x3	2x2
8	2x2	2x2
9	2x2	-/-
10	3x3	2x2
11	3x5	-/-
12	2x2	2x2
13	2x2	2x2

HISTAMINA: 7 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 6 presenta una débil sensibilización a la mayor parte de los cuerpos y las cabezas de casi todos los langostinos estudiados, resultando negativos a la cabeza del *Penaeus indicus* (nº 4), al cuerpo del *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9) y del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11), así como resultó negativo tanto para la cabeza como para el cuerpo del *Penaeus SPP* o también llamado caribeño (nº 3).

**PACIENTE 7**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	2x2	-/-
2	2x2	-/-
3	-/-	-/-
4	-/-	-/-
5	5x7	2x2
6	2x2	-/-
7	6x8	-/-
8	6x6	-/-
9	4x5	-/-
10	5x9	-/-
11	5x9	-/-
12	6x6	-/-
13	5x6	-/-

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 7 presenta 12 pruebas cutáneas positivas de alergia sobre un total de 26 prick by prick realizados. Es muy significativo que 11 de ellas han sido de las cabezas de los langostinos, mientras que solo 1 prueba cutánea ha resultado positiva con los cuerpos de las distintas especies, y además de muy baja intensidad (2x2).

En cuanto a las pruebas cutáneas con las cabezas de las especies estudiadas, presenta una intensa sensibilización a la mayor parte de las cabezas de los langostinos estudiados, resultando negativos para los cabezas de los langostinos *Penaeus SPP* (nº 3) o también llamado caribeño y para *Penaeus indicus* (nº 4).

Por otra parte, las pruebas cutáneas con los cuerpos de las especies estudiadas, resultó negativo para todos ellos excepto para el *Litorraneus vannamei* (nº 5), que resultó débilmente positiva.

**PACIENTE 8**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	3x3	2x2
2	-/-	2x2
3	3x3	4x8
4	-/-	3x3
5	4x8	-/-
6	2x2	5x6
7	6x6	3x3
8	2x2	9x13
9	4x4	-/-
10	5x6	2x2
11	3x4	2x2
12	2x3	2x2
13	9x12	-/-

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 8 presenta 21 pruebas cutáneas positivas de alergia sobre un total de 26 prick by prick realizados. Es destacable que este paciente está sensibilizado a la mayoría de las cabezas y cuerpos de los langostinos, excepto solo 2 cabezas y 3 cuerpos. Las pruebas cutáneas que han resultado positivas no han sido de gran intensidad excepto para un cuerpo y una cabeza de 2 especies diferentes (*Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13).

Este paciente presenta una intensa sensibilización al cuerpo del langostino *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8), y de menor intensidad al resto de cuerpos, permaneciendo negativos frente al *Litorraneus vannamei* (nº 5), al *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9) y al *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13).

En cuanto a las cabezas presentó intensa sensibilización a la cabeza del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13), así como

resultaron positivas pero de menor intensidad para el resto de todas las cabezas estudiadas excepto la del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2) y del *Penaeus indicus* (nº 4) que fueron negativas.

### PACIENTE 9

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	-/-	-/-
2	-/-	-/-
3	-/-	-/-
4	-/-	-/-
5	-/-	-/-
6	-/-	-/-
7	4x5	-/-
8	-/-	-/-
9	-/-	-/-
10	-/-	-/-
11	-/-	-/-
12	-/-	-/-
13	-/-	-/-

HISTAMINA: 6 mm

SF: NEGATIVO

El paciente 9 sólo está sensibilizado a la cabeza del langostino *Parapenaeus longirostris* (nº 7) con una pápula de 4 mm y un eritema de 5 mm.

El resto de las pruebas cutáneas negativas realizadas, tanto con las cabezas como con los cuerpos de las distintas especies y variedades de crustáceos fueron negativas.

A continuación se detallan los resultados de los controles negativo y positivo. El control negativo no presenta sensibilización alérgica a crustáceos ni a pólenes, hongos ni ácaros, mientras que el control positivo está sensibilizado tanto a crustáceos como a ácaros.

**CONTROL NEGATIVO**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	-/-	-/-
2	-/-	-/-
3	-/-	-/-
4	-/-	-/-
5	-/-	-/-
6	-/-	-/-
7	-/-	-/-
8	-/-	-/-
9	-/-	-/-
10	-/-	-/-
11	-/-	-/-
12	-/-	-/-
13	-/-	-/-

HISTAMINA: 6 mm      SF: NEGATIVO

Este paciente es un control negativo y por tanto no presenta sensibilización alérgica a ninguno de los crustáceos estudiados.

**CONTROL POSITIVO**

Número asignado según especie de crustáceo	CABEZA	CUERPO
1	5x5	3x3
2	4x4	2x2
3	5x5	3x3
4	6x6	5x5
5	5x5	6x13
6	6x6	3x3
7	8x9	4x4
8	5x5	6x13
9	5x5	5x11
10	5x5	3x3
11	8x10	3x3
12	5x7	3x3
13	6x6	6x12

El paciente control positivo presenta una mayor sensibilización a la cabeza del langostino *Parapenaeus longirostris* extra o también llamado gamba padrón (nº 11), siendo el resto de las pruebas cutáneas

positivas, tanto de cabeza como del cuerpo de los distintos langostinos estudiados.

### VI.2.3. Resultados agrupados de las pruebas cutáneas.

Una vez obtenidos todos los resultados de las pruebas cutáneas de alergia en prick test de todos los pacientes, queríamos determinar qué especie era más alergénica y cual era menos alergénica en los pacientes estudiados, para ello realizamos la Tabla 16, en la que se refleja el número de pacientes cuyas pruebas cutáneas fueron positivas para cada una de las especies valoradas en conjunto (cabeza y cuerpo).

En este sentido, se considera como caso aquel que tenga pruebas cutáneas positivas con la cabeza, el cuerpo o ambas.

Especie de crustáceo	Pruebas cutáneas positivas a cabeza y/o cuerpo			
	SI		NO	
	Nº	%	Nº	%
Especie 1	7	77,78	2	22,22
Especie 2	7	77,78	2	22,22
Especie 3	5	55,55	4	44,45
Especie 4	5	55,55	4	44,45
Especie 5	6	66,67	3	33,33
Especie 6	6	66,67	3	33,33
Especie 7	9	100,0	0	0,0
Especie 8	8	88,89	1	11,11
Especie 9	7	77,78	2	22,22
Especie 10	7	77,78	2	22,22
Especie 11	7	77,78	2	22,22
Especie 12	6	66,67	3	33,33
Especie 13	7	77,78	2	22,22

Tabla 16. Pacientes con pruebas cutáneas positivas e hipersensibilidad inmediata según especies estudiada.

Se han excluido tanto el control positivo como el control negativo, ya que el porcentaje final no se vería modificado.

En esta Tabla se aprecia que 5 pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas al *Penaeus SPP* (caribeño) (nº 3) y *Penaeus indicus* (nº 4); 6 pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas a *Litorraneus vannamei* (nº 5), *Parapenaeus SPP* (gamba arrozera) (nº 6) y *Pleisopenaeus edwardsianus* (nº 12); 7 pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas a *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) (nº 1), *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2), *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10), *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13); 8 pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas a *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8); 9 pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas a *Parapenaeus longirostris* (nº 7).

Los resultados indican que el 100% de los pacientes, presentaron pruebas cutáneas positivas, bien sea la cabeza o el cuerpo, al *Parapenaeus longirostris* (nº 7).

Por el contrario, los langostinos *Penaeus SPP* (nº 3) y *Penaeus indicus* (nº 4) fueron las especies que menos veces resultaron positivas en las pruebas cutáneas en estos 9 pacientes. Para ser más exacto, ambas especies resultaron positivas en el prick test sólo en 5 pacientes. Ambos son del género *Penaeus*.

Dado que ya hemos descrito los resultados de las pruebas cutáneas de cada una de las especies en conjunto, vamos a describir los resultados del total de las pruebas cutáneas de las cabezas y los cuerpos

de cada uno de los crustáceos por separado. A los 9 pacientes de la muestra se realizaron un total de 234 prick test realizados con diferentes especies y variedades de crustáceos, 117 prick test fueron realizados con las cuerpos y 117 con las cabezas.

Los prick by prick resultaron positivos en 63 ocasiones para los cuerpos, que representa un 53,84%, mientras que resultaron negativos en 54 ocasiones (46,16%).

Respecto a las cabezas de las diferentes especies y variedades de los crustáceos, en 75 ocasiones los prick test resultaron positivos que representa un 64,10%, mientras que resultaron negativos en el 35,90%. (Figura 59).

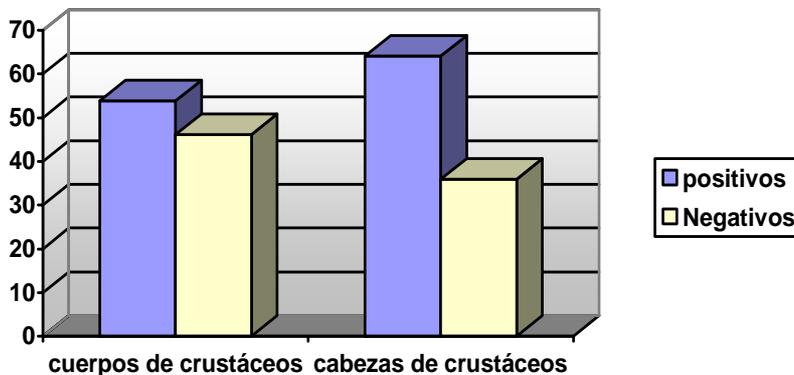


Figura 59. Porcentaje de pruebas cutáneas en prick test tanto positivas como negativas realizadas con los cuerpos y las cabezas de los crustáceos.

Se desglosan los resultados anteriores y se valoran los prick test en 2 grandes grupos, un primer grupo, en el que se incluyen los prick by prick que se realizan con las cabezas y un segundo, que incluyen los que se realizan con los cuerpos de los crustáceos. Véase la Tabla 17 que se detalla a continuación.

Especie de crustáceo	Número de pacientes con pruebas cutáneas			
	POSITIVAS		NEGATIVAS	
	cabeza	cuerpo	cabeza	cuerpo
Especie 1	5	6	4	3
Especie 2	6	6	3	3
Especie 3	4	5	5	4
Especie 4	3	5	6	4
Especie 5	6	5	3	4
Especie 6	5	5	4	4
Especie 7	7	6	2	3
Especie 8	7	6	2	3
Especie 9	6	3	3	6
Especie 10	7	5	2	4
Especie 11	7	3	2	6
Especie 12	5	4	4	5
Especie 13	7	4	2	5
<b>TOTAL</b>	<b>75</b>	<b>63</b>	<b>42</b>	<b>54</b>

Tabla 17. Número de pacientes con pruebas cutáneas positivas de hipersensibilidad inmediata según la parte del crustáceo.

En la siguiente Tabla se reflejan los resultados obtenidos respecto de las cabezas y los cuerpos de las 13 especies de langostinos que han sido objeto de estudio. En los 2 siguientes apartados expondremos los resultados por separado.

#### VI.2.4. Resultados de los prick by prick realizados con las cabezas de los crustáceos.

En las columnas correspondientes a las cabezas, observamos que 3 pacientes presentaron resultados positivos con la especie *Penaeus indicus* (nº 4), 4 pacientes con la especie *Penaeus SSP* (caribeño) (nº 3) y 5 con la especie *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) (nº 1), *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12) y *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (nº 6). El *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2), el *Litorraneus vannamei* (nº 5) y el *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9) provocaron hipersensibilidad en 6 de los 10 pacientes evaluados, en tanto que las especies *Parapenaeus longirostris* (gamba blanca) (nº 7), *Litopenaeus*

*vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (n° 10), *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (n° 11) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (n° 13) la provocaron en 7 de ellos .

Si relacionamos en una gráfica el porcentaje de pacientes que han presentado pruebas cutáneas positivas sólo con las cabezas y las distintas especies y variedades de crustáceos, obtenemos la siguiente Figura 60.

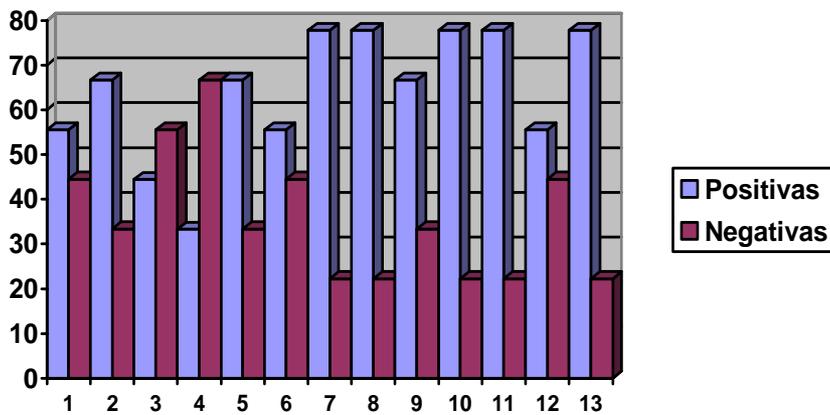


Figura 60. Porcentaje de pacientes (eje de ordenadas) con pruebas cutáneas positivas de hipersensibilidad inmediata con las cabezas de las distintas especies y variedades de crustáceos (eje de abscisas).

Las 2 especies que han obtenido el mayor número de pruebas cutáneas positivas, para las cabezas de las distintas especies y variedades de crustáceos, han sido el *Parapenaeus longirostris* (n° 7) y el *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8).

Por el contrario, las cabezas de las especies 3 y 4, que se corresponden con el *Penaeus SPP* (caribeño) y el *Penaeus indicus*, fueron las que en menos ocasiones resultaron positivas en las pruebas cutáneas.

### VI.2.5. Resultados de los prick by prick realizados con los cuerpos de los crustáceos.

En las columnas correspondientes a los cuerpos de los crustáceos se refleja que el langostino GGG (nº 9) y la gamba padrón (nº 11) provocaron hipersensibilidad cutánea en 3 pacientes, en tanto que el carabinero (nº 12) y el langostino tigre (nº 13) la provocaron en 4. Se observó así mismo que 5 pacientes presentaron resultados positivos tras pruebas cutáneas de alergia prick by prick de la especie *Penaeus SSP* (caribeño) (nº 3), *Penaeus indicus* (nº 4), *Litorraneus vannamei* (nº 5), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10) y el *Parapenaeus SPP* (gamba arrozera) (nº 6). El langostino blanco (nº 1), el camarón (nº 2), la gamba blanca (nº 7) y el langostino REV M (nº 8) provocaron reacciones cutáneas en 6 de los pacientes evaluados.

Si relacionamos en una gráfica el porcentaje de pacientes que han presentado pruebas cutáneas positivas sólo con las cabezas y las distintas especies y variedades de crustáceos, obtenemos la siguiente Figura 61.

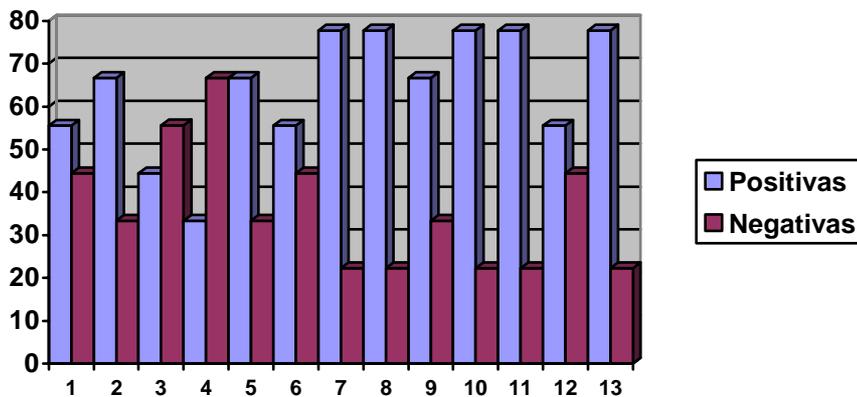


Figura 61. Porcentaje de pacientes (eje de ordenadas) con pruebas cutáneas positivas de hipersensibilidad inmediata con los cuerpos de las distintas especies y variedades de crustáceos (eje de abscisas).

Las 2 especies que han obtenido el mayor número de pruebas cutáneas positivas, tanto para la cabeza como para el cuerpo, han sido el *Parapenaeus longirostris* (nº 7) y el *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (nº 8).

En contraposición a todo lo anteriormente dicho, es importante reseñar, que los cuerpos del *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (nº 9), el *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11), el *Pleisopenaeus edwrsianus* (carabinero) (nº 12) y el *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13) son los que en menos ocasiones han presentado pruebas cutáneas positivas en prick test. En este sentido, es importante apreciar que de 3 de estos 4, son anatómicamente los de mayor tamaño.

#### **VI.2.6. Resultados de los valores del diámetro de la pápula.**

A continuación se detallan los resultados de los diámetros de la pápulas que presentan los 9 pacientes tras realizarles las pruebas cutáneas de alergia en prick test, separados en cabeza y cuerpo. En esta Tabla 18 aparecen reflejados los valores máximos y mínimos, media y desviación típica. No se realizó estudio con el eritema, ya que no se consideró relevante.

Los valores medios de los diámetros de la pápula fueron variables según la especie, observándose el mayor valor (33x31) con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11), seguido del cuerpo del *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) (nº 1).

Los valores mínimos fueron en todos los casos de 0, indicando que el paciente no presentaba ningún tipo de sensibilización.

Especie de crustáceo	cabeza				cuerpo			
	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica.	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Típica.
Especie 1	0	7	2,60	2,675	0	25	4,30	7,469
Especie 2	0	9	3,40	3,406	0	12	3,30	3,889
Especie 3	0	5	2,00	2,309	0	19	4,20	5,922
Especie 4	0	6	1,70	2,406	0	5	2,00	1,944
Especie 5	0	5	2,90	2,234	0	6	1,80	1,989
Especie 6	0	6	1,90	2,025	0	6	2,20	2,201
Especie 7	0	15	4,80	4,826	0	15	4,50	4,994
Especie 8	0	10	3,50	3,274	0	9	4,00	3,528
Especie 9	0	8	3,10	2,644	0	5	1,50	2,121
Especie 10	0	12	4,10	3,414	0	5	2,00	2,000
Especie 11	0	31	6,00	9,080	0	3	1,00	1,333
Especie 12	0	6	2,20	2,251	0	5	1,40	1,713
Especie 13	0	10	4,60	3,627	0	6	1,90	2,424

Tabla 18. Tamaño máximo y mínimo de la pápula que han presentado los pacientes en prueba cutánea, así como la media y desviación típica, separadas en cabeza y cuerpo.

Si observamos los datos por separado, se observa en las pruebas cutáneas que los valores máximos de las pápulas con las cabezas de las especies estudiadas son mayores que los de los cuerpos. Así por ejemplo, el número de especies cuyo tamaño máximo en prick test ha sido inferior a 5, lo han presentado los cuerpos de 5 especies diferentes, mientras que sólo han cumplido esta misma condición las cabezas de 2 especies diferentes.

Como se ha comentado anteriormente, el cuerpo del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11) ha sido con diferencia, el que ha presentado en pruebas cutáneas los resultados más bajos, pero curiosamente, la cabeza de este misma especie es la que ha presentado los resultados mas altos.

Otro dato curioso es que en los mismos pacientes los resultados obtenidos con el *Parapenaeus longirostris* (nº 7) y el *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10) han sido diferentes. Ambas especies tienen etiquetas identificativas idénticas (Figuras 19 y 21), aunque fueron

obtenidas de distintas pescaderías. De hecho, puede observarse que la especie 7 presenta pruebas cutáneas con valores máximos muy altos tanto para cuerpo como para la cabeza de dicha especie (15 mm en ambos casos) mientras que la especie 10, los valores máximos son elevados para la cabeza (12 mm) pero no para el cuerpo (5 mm) de este especie.

Por otra parte, si analizamos la desviación típica del cuerpo y la cabeza por separado, se observa que la desviación típica de mayor valor absoluto (9,080) corresponde con con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11). Por el contrario, si lo que valoramos es la cabeza, esta misma especie es la que ha presentado una desviación típica más pequeña (1,333).

En resumen, los diámetros medios de las pápulas fueron variables según la especie, tanto para la cabeza como para el cuerpo, apreciándose una alta variabilidad en los resultados obtenidos.

Tras una primera aproximación mediante un estudio in vivo mediante prick test, apreciamos que los resultados eran muy variables de unas especies a otras, así como entre las distintas variedades de una misma especie. Se realizaron pruebas in vitro para valorar si estas diferencias se correspondían con las pruebas in vivo. Para ello, se comenzó con la realización de una IgE específica.

### VI.3. ANALISIS DE LAS PRUEBAS IN VITRO.

#### VI.3.1. Resultados de la determinación de la IgE específica del suero de los pacientes.

En la actualidad no existe IgE específica a la proteína muscular tropomiosina ni a extractos de langostino, mediante el sistema CAP de Pharmacia. Es por este motivo, por lo que en los pacientes con sospecha de alérgia, en caso de ser necesario, se solicita una IgE específica a camarón (F24) o a langosta (F80).

En la Tabla 19 se reflejan los valores de la IgE total y la específica para camarón (F24) y langosta (F80) de un total de 9 pacientes de la muestra, así como de un control negativo y un control positivo.

PACIENTE	IgE TOTAL	IgE ESPECÍFICA A CAMARON(F24)	IgE ESPECIFICA A LANGOSTA (F80)
1	13,7 UI/ml	< 0,1 KU/L	< 0,1 KU/L
2	862 UI/ml	0,52 KU/L	0,24 KU/L
3	74,7 UI/ml	0,76 KU/L	< 0,1 KU/L
4	150 UI/ml	15,8 KU/L	11,1 KU/L
5	228 UI/ml	0,86 KU/L	0,40 KU/L
6	17,6 UI/ml	0,18 KU/L	0,11 KU/L
7	197 UI/ml	1,87 KU/L	0,59 KU/L
8	195 UI/ml	0,71 KU/L	0,48 KU/L
9	30,8 UI/ml	< 0,1 KU/L	< 0,1 KU/L
control negativo	105 UI/ml	< 0,1 KU/L	< 0,1 KU/L
control positivo	1010 UI/ml	3,79 KU/L	1,64 KU/L

Tabla 19. Resultados de la IgE total y específica para camarón (F24) y langosta (F80) del suero de los 9 pacientes, así como un control positivo y uno negativo.

Lo lógico sería pensar que el control positivo es el paciente que presenta unos valores más elevados de IgE total, así como de IgE específica para camarón (F24) y langosta (F80). Esta circunstancia se cumple sólo con la IgE total, con 1010 UI/ml.

Los valores de la IgE específica para camarón varían desde valores indetectables ( $< 0,1$  KU/L) hasta 15,8 KU/L. Los valores absolutos más elevados de IgE específica a camarón (F24) son de 15,8 KU/L, y se corresponde con el paciente número 4. En orden decreciente dichos valores son 1,87 KU/L (paciente 7), 0,86 KU/L (paciente 5), 0,76 KU/L (paciente 3), 0,71 KU/L (paciente 8), 0,52 KU/L (paciente 2), 0,18 KU/L (paciente 6), hasta presentar valores indetectables ( $< 0,1$  KU/L) en los pacientes número 1, 9 y control negativo.

De idéntica forma, los valores de la IgE específica para langosta varían desde valores indetectables ( $< 0,1$  KU/L) hasta de 11,1 KU/L. Los valores absolutos más elevados de IgE específica a langosta (F80) son de 11,1 KU/L, y se corresponde con el paciente número 4. En orden decreciente dichos valores son 1,64 KU/L (control positivo), 0,59 KU/L (paciente 7), 0,48 KU/L (paciente 8), 0,40 KU/L (paciente 5), 0,24 KU/L (paciente 2), 0,11 KU/L (paciente 6), hasta presentar valores indetectables ( $< 0,1$  KU/L) en los pacientes número 1, 3, 9 y control negativo.

El paciente número 4 presenta los valores más elevados de IgE específica a langosta (F80) y camarón (F24), pero no la IgE mas elevada. Por otra parte, el paciente número 1 es el que presenta unos valores de IgE total e IgE específica a camarón (F24) y langosta (F80) más bajos y no se corresponde con el control negativo.

Una vez que hemos analizado los resultados por separado, si comparamos la IgE específica a camarón y langosta de estos 9 pacientes los resultados muestran que hay 3 pacientes con una IgE a camarón negativa ( $<0,1$  KU/L) frente a 4 pacientes que presentaron el mismo resultado a langosta.

Los valores absolutos de la IgE específica son mayores para el camarón (F24) que para la langosta (F80) y esta diferencia es de 4,7 KU/L.

La Tabla 20 relaciona los valores máximo y mínimo, media y desviación estándar de la IgE total y las IgE específica a langosta (F80) y camarón (F24):

Tipo IgE	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Estándar
<b>IgE total</b>	13,70	1010,00	277,88	357,35374
<b>IgE específica camarón (F24)</b>	0	15,80	2,4490	4,82641
<b>IgE específica langosta (F80)</b>	0	11,10	1,4560	3,42390

Tabla 20. Valores máximos, mínimos, media y desviación estándar de las IgE total y específica para camarón y langosta.

La media de todos los valores absolutos de IgE total fue de 277,88 UI/ml, con muchas variaciones entre pacientes, como se observa en la desviación estándar y en el rango de valores que van de 13,7 UI/ml a 1010 UI/ml.

La media de los valores de la IgE específica de los pacientes, así como la desviación estándar fue mayor para la determinación de la IgE específica para camarón (F24) que para langosta (F80).

### **VI.3.2. Análisis de la cuantificación de proteínas de cada uno de los extractos (cabeza y cuerpo).**

Para realizar este estudio fueron necesarios como mínimo 2 langostinos de cada una de las especies, uno para realizar pruebas cutáneas (prick by prick) y otro para realizar el extracto. Un error hizo que sólo se obtuviera sólo un *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco), que fue usado íntegramente para realizar pruebas cutáneas. Es por este motivo por el que a partir de ahora sólo nos referiremos a 12 especies de langostino que fueron usadas para realizar el estudio in vitro (SDS e inmunoblotting), aunque fueron 13 las que se estudiaron in vivo (prick test). No obstante se mantendrá la misma numeración.

Para comenzar cualquier estudio in vitro (SDS PAGE e inmunoblotting), es necesario saber qué concentración de proteínas tiene el extracto a estudiar, ya que los resultados pueden ser diferentes según la concentración de proteínas.

En nuestro estudio, la concentración de proteínas de la cabeza y del cuerpo no son similares. En este sentido, es importante resaltar que el cuerpo está formado en su mayoría por proteína muscular (tropomiosina), hecho que no ocurre con la cabeza.

Por tanto, se procedió a calcular la concentración de proteínas tanto de la cabeza como de los cuerpos de las 12 especies de crustáceos. Una vez realizado dicho cálculo se concentraría o se diluiría la muestra del extracto para cargar en todos los carriles del SDS PAGE y del inmunoblotting 50 µg de proteína. Se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla 21.

ESPECIE DE CRUSTACEO	PARTE DEL CRUSTACEO	CONCENTRACION DE PROTEINAS
2. <i>Palaemon serratus</i> (camarón)	CABEZA	25 µg/ µl
	CUERPO	100 µg/ µl
3. <i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	CABEZA	1 µg/ µl
	CUERPO	32 µg/ µl
4. <i>Penaeus indicus</i>	CABEZA	100 µg/ µl
	CUERPO	140 µg/ µl
5. <i>Litorraneus vannamei</i>	CABEZA	60 µg/ µl
	CUERPO	100 µg/ µl
6. <i>Parapenaeus SPP</i> (Gamba arrocera)	CABEZA	8 µg/ µl
	CUERPO	175 µg/ µl
7. <i>Parapenaeus longirostris</i>	CABEZA	3,5 µg/ µl
	CUERPO	200 µg/ µl
8. <i>Litopenaeus vannamei</i> extra (langostino REV M)	CABEZA	50 µg/ µl
	CUERPO	75 µg/ µl
9. <i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	CABEZA	80 µg/ µl
	CUERPO	110 µg/ µl
10. <i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	CABEZA	48 µg/ µl
	CUERPO	180 µg/ µl
11. <i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	CABEZA	3,7 µg/ µl
	CUERPO	8 µg/ µl
12. <i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	CABEZA	180 µg/ µl
	CUERPO	190 µg/ µl
13. <i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	CABEZA	175 µg/ µl
	CUERPO	300 µg/ µl

Tabla 21. Concentración de proteínas de cada uno de los 12 crustáceos estudiados expresados en µg/ ml.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de proteínas de los extracto de cabeza y cuerpo pone de manifiesto que existe una gran variabilidad en la concentración de proteínas de los cuerpos de los extractos, cuyo rango está entre 8 µg/ µl y 300 µg/ µl.

- El cuerpo del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (nº 13) tiene la mayor cantidad de proteínas (300 µg/ µl), seguido del cuerpo del *Parapenaeus longirostris* (nº 7) (200 µg/ µl).
- El cuerpo con menos cantidad de proteínas ha sido el *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11) con 8 µg/ µl seguido del *Penaeus SPP* (caribeño) (nº 3) con un total de 32 µg/ µl.
- La cabeza del *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12) tiene la misma cantidad de proteínas que el cuerpo del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10), ambos con un total de 180 µg/ µl de proteínas.
- Aún cuando la etiqueta identificativa del *Parapenaeus longirostris* (nº 7) y el *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº10) son idénticas, la concentración de proteínas en la cabeza de éste último es aproximadamente 13,7 veces superior.
- El cuerpo del camarón (nº 2), a pesar de ser anatómicamente pequeño, tiene una gran cantidad de proteínas (100 µg/ µl) en proporción con otras especies de mayor tamaño.

### **VI.3.3. Resultados de los SDS Page realizados con las 12 especies de langostino, tanto de la cabeza como del cuerpo a diferentes concentraciones.**

Tras la realización de los extractos y la cuantificación de proteínas, se decide realizar un SDS PAGE, para valorar las bandas de proteínas que están contenidas en cada extracto, así como el peso molecular de cada una de las bandas. En todos los geles, se añadió un patrón de referencia de pesos moleculares llamado Rainbow® de la casa comercial Amersham (Figura 62), para determinar los pesos moleculares de cada banda proteica.

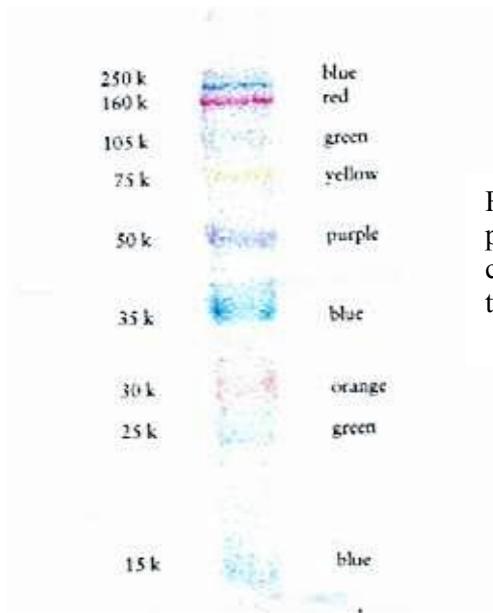


Figura 62. Patrón de referencia de los pesos moleculares Rainbow de la casa comercial Amersham usado en todos los SDS PAGE.

### VI.3.3.1. SDS PAGE con las cabezas de las 12 especies y variedades estudiadas.

A continuación se muestran todos los SDS PAGE (Figuras 63-86) realizados con las cabezas y los cuerpos. En cada gel progresivamente de izquierda a derecha va aumentando la concentración de proteína (12,5  $\mu$ g de proteína, 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, y + de 50  $\mu$ g). En todos ellos se indican los pesos moleculares.

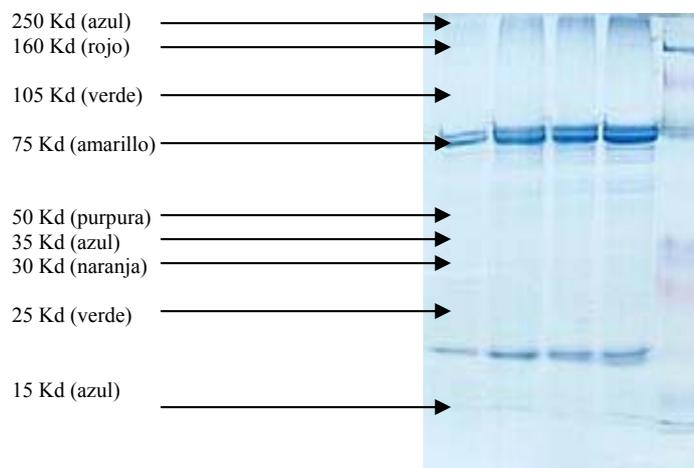


Figura 63. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Palaemon serratus* (camarón) (n° 2).

La cabeza del *Palaemon serratus* (camarón) (n° 2), presenta un total de 4 bandas proteicas muy bien definidas. Las dos primeras, están muy próximas en tre sí, y tienen un peso molecular de 105 Kda cuya intensidad aumenta conforme aumentamos la concentración de proteína, pero visible incluso a concentraciones de carga de 12,5 µg de proteína. Las otras bandas corresponden en orden descendente a los pesos moleculares de 20 Kda y 15 Kda (Figura 63)

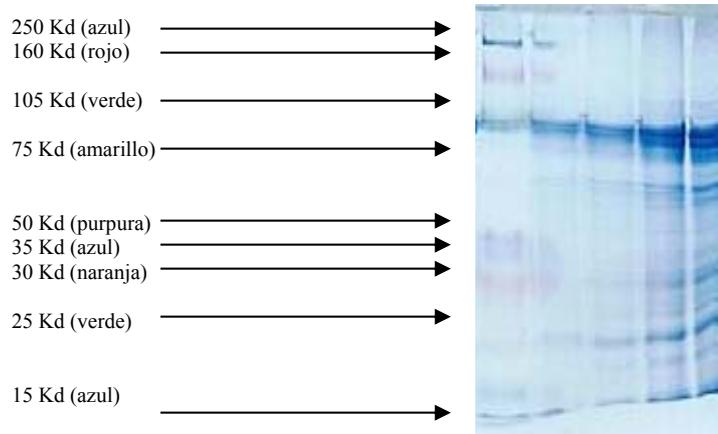


Figura 64. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Penaeus SPP* (caribeño) (n° 3)

La cabeza del *Penaeus SPP* (caribeño) (n° 3), presenta un total de 4 bandas proteicas bien definidas, que se hacen más visibles conforme aumenta la cantidad de proteína cargada. Estas bandas tienen un peso molecular de 105 Kda, una segunda banda de 75 Kda, que se hace visible cuando la dosis de carga es superior a 50 µg de proteína. Las otras bandas corresponden en orden descendente a los pesos moleculares de 30 Kda y 15 Kda (Figura 64).

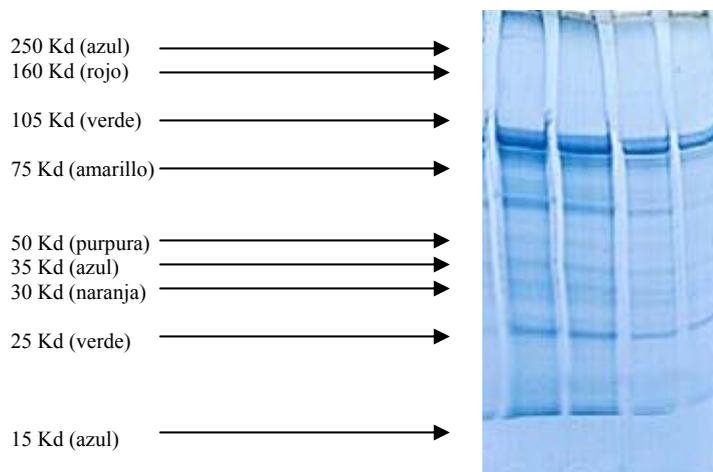


Figura 65. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Penaeus indicus* (n° 4)

La cabeza del *Penaeus indicus* (n° 4) presenta un total de 5 bandas proteicas muy bien definidas, cuyos pesos moleculares se corresponden con 105 Kda, 60 Kda, 30 Kda, 22 Kda y 15 Kda (Figura 65).

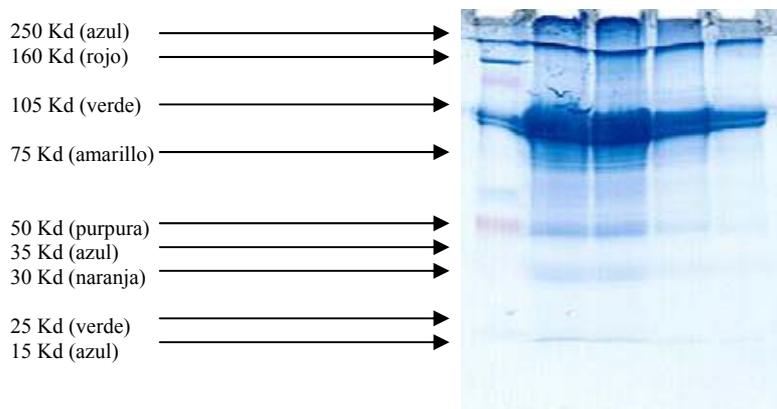


Figura 66. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Litornaneus vannamei* (n° 5)

La cabeza del *Litornaneus vannamei* (n° 5), presenta un total de 4 bandas proteicas. Encontramos una primera banda de muy alto peso molecular, al principio del pocillo del gel, que tiene un peso molecular superior a 250 Kda, las restantes bandas están algo más alejadas y tienen un peso molecular de 250 Kda, 105 Kda y 30 Kda (Figura 66).

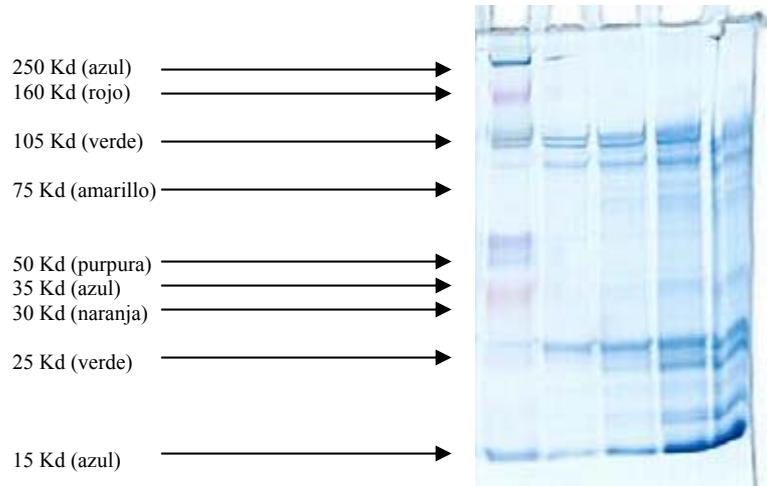


Figura 67. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (n° 6)

La cabeza del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (n° 6), presenta un total de 6 bandas proteicas muy bien definidas y de bajo peso molecular. Dichas bandas no se ven modificadas aunque aumente la cantidad de proteína cargada en cada pocillo y todas ellas tienen un peso molecular inferior a 105 Kda. Las restantes se corresponden con los pesos moleculares de 75 Kda, 50 Kda, 30 Kda, 22 Kda y 15 Kda (Figura 67).

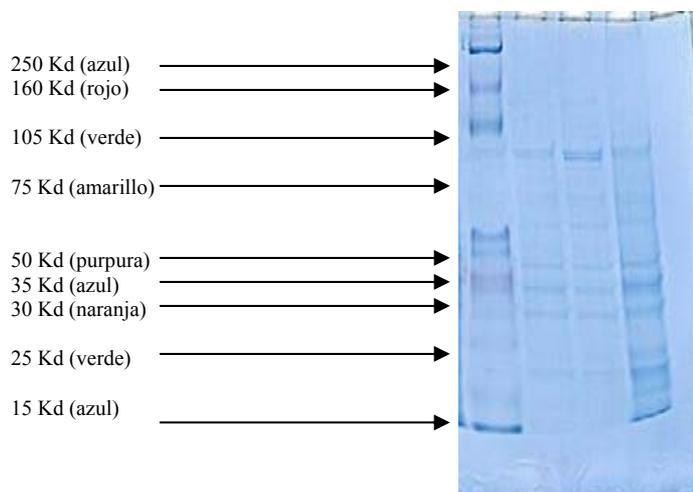


Figura 68. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* (n° 7)

El SDS PAGE con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* (n° 7) presenta una gran homología con el realizado con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (n° 11), con la diferencia esencial que las bandas de los pesos moleculares más altos no aparecen.

De hecho ni a concentraciones altas de proteínas apreciamos bandas con pesos moleculares por encima de 75 Kda. Por el contrario, a altas concentraciones de proteína (más de 50 µg) apreciamos una banda con un peso molecular de 20 Kda.

En esta especie podemos apreciar bandas de bajo peso molecular, que en orden descendente se corresponden con los pesos moleculares de 75 Kda, 50 Kda, 35 Kda, 30 Kda, 25 y 20 y 15 Kda (Figura 68)

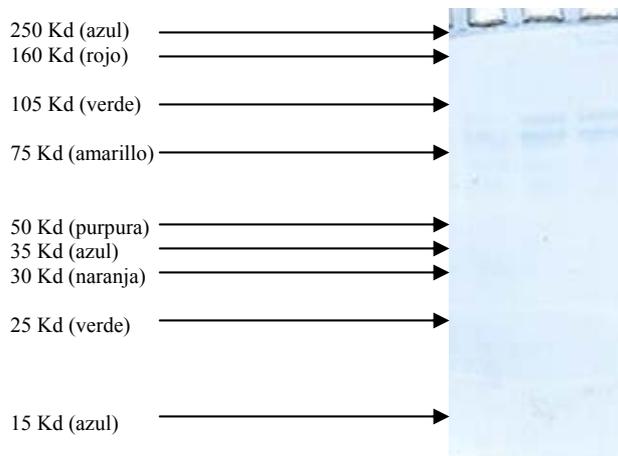


Figura 69. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8)

El SDS PAGE realizado con la cabeza del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8), presenta un total de 2 bandas proteicas poco definidas y de bajo peso molecular. Dichas bandas se corresponden con los pesos moleculares de 105 Kda y 75 Kda (Figura 69).

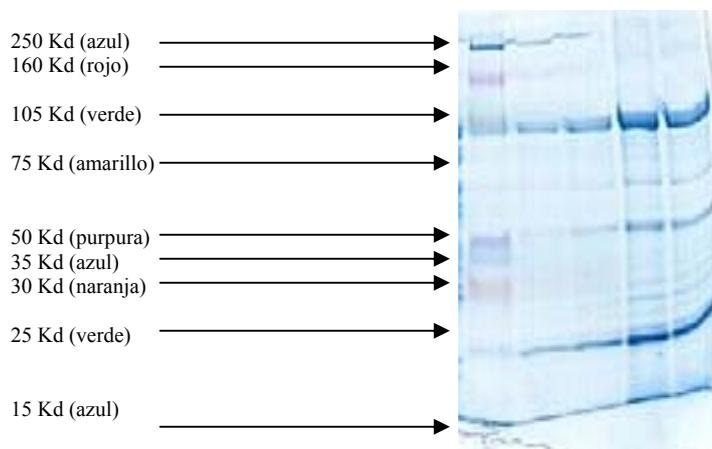


Figura 70. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Litopenaeus Vannamei* (langostino GGG) (nº 9)

El SDS PAGE realizado con la cabeza del *Litopenaeus Vannamei* (langostino GGG) (nº 9), presenta un total de 6 bandas proteicas que comienzan a partir de los 105 Kda, y progresivamente van descendiendo. Los pesos moleculares de estas bandas se localizan en los 105 Kda, 100 Kda, 75 Kda, 50 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 70).

250 Kd (azul)  
 160 Kd (rojo)  
 105 Kd (verde)  
 75 Kd (amarillo)  
 50 Kd (púrpura)  
 35 Kd (azul)  
 30 Kd (naranja)  
 25 Kd (verde)  
 15 Kd (azul)



Figura 71. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10).

El SDS PAGE realizado con la la cabeza del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (nº 10), presenta un total de 6 bandas proteicas mal definidas y de bajo peso molecular. Dichas bandas no se ven

modificadas aunque aumente la cantidad de proteína cargada en cada pocillo y todas ellas tienen un peso molecular inferior a 75 Kda. Las restantes se corresponden con los pesos moleculares de 75 Kda, 50 Kda, 30 Kda, 25 Kda, 20 Kda y 10 Kda (Figura 71).

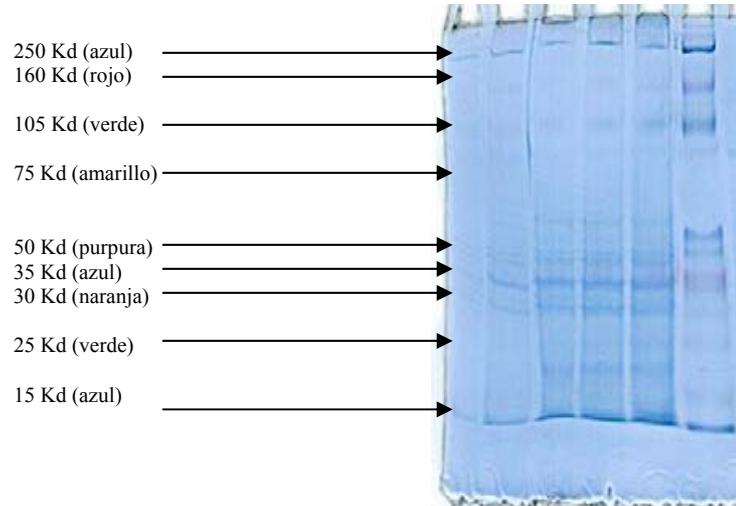


Figura 72. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11).

El SDS PAGE realizado con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11), presenta un total de 8 bandas proteicas. La primera comienza en los 250 Kda, posteriormente encontramos otra banda en los 160 Kda, que sólo es visible cuando aumentamos la cantidad de proteína en los pocillos por encima de 50 µg de proteína. Lo mismo ocurre con la banda que presenta un peso molecular de 105 Kda y para ser visible precisa una alta cantidad de proteína. Posteriormente aparecen otras bandas que se corresponden en orden descendente a los pesos moleculares de 50 Kda, 35 Kda, 30 Kda, 25 y 15 Kda (Figura 72).

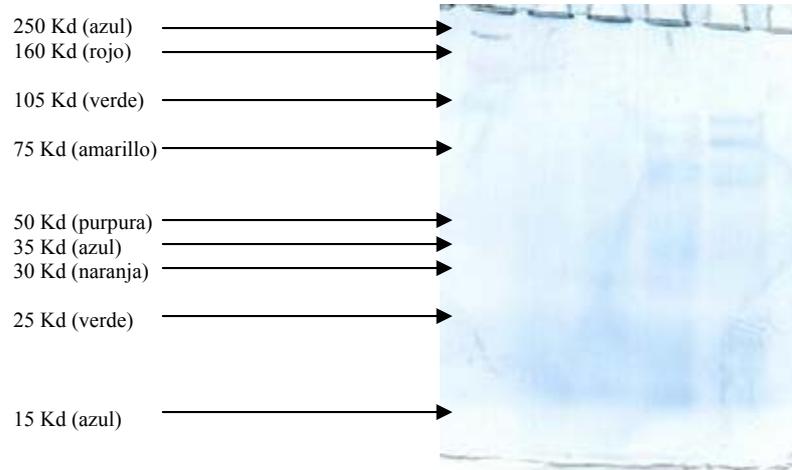


Figura 73. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (n° 12).

La cabeza del *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (n° 12), presenta un total de 3 bandas proteicas de bajo peso molecular. Dichas bandas no se ven modificadas aunque aumente la cantidad de proteína cargada en cada pocillo. Dichas bandas tienen un peso molecular de 105 Kda, 90 Kda y 75 Kda (Figura 73).

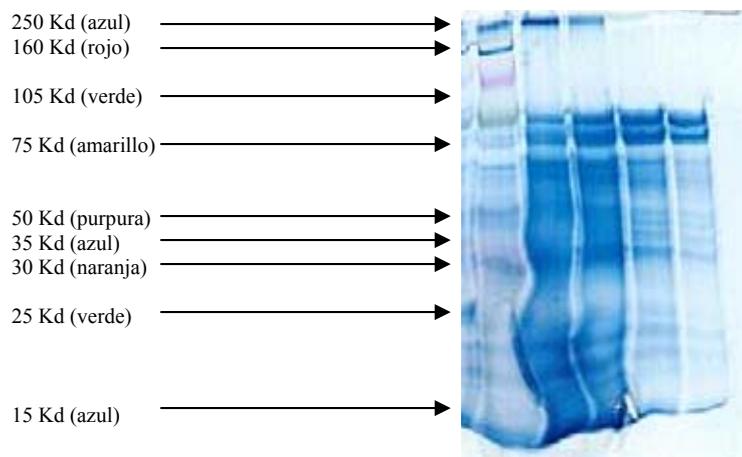


Figura 74. SDS PAGE realizado con la cabeza del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (n° 13).

El SDS PAGE realizado con la cabeza del langostino *Penaeus kerathurus* (langostino tigre), presenta un total de 7 bandas proteicas que comienzan a partir de los 105 Kda, y progresivamente van descendiendo. Los pesos moleculares de estas bandas se localizan en los 105 Kda, 100 Kda, 75 Kda, 70 Kda, 50 Kda, 30 Kda y 15 Kda (Figura 74).

### VI.3.3.2. SDS PAGE con los cuerpos de las 12 especies y variedades estudiadas.

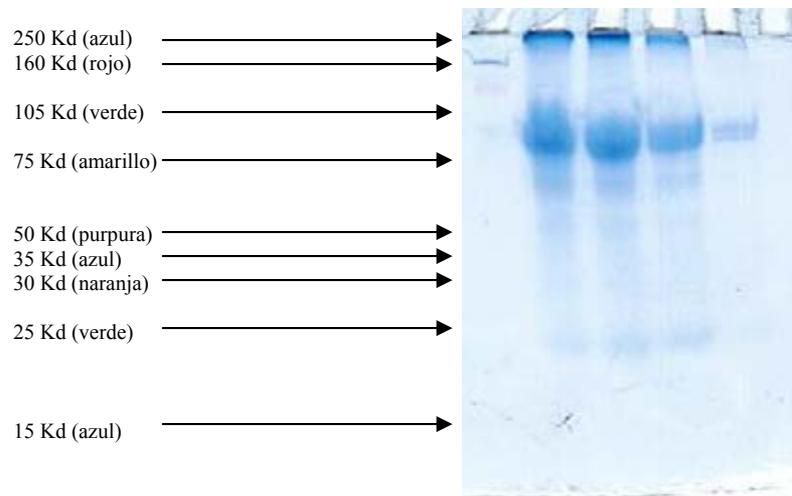


Figura 75. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Palaemon serratus* (camarón) (n° 2).

El cuerpo del *Palaemon serratus* (camarón) (n° 2), presenta un total de 4 bandas proteicas. Dichas bandas están localizadas en el extremo superior del gel, que se correspondería con un peso molecular superior a 250 Kda, y las restantes tienen un peso molecular de 105 Kda, 100 Kda y 20 Kda. Dichas bandas son claramente visibles por encima de 25 µg de proteína cargada en los pocillos (Figura 75).

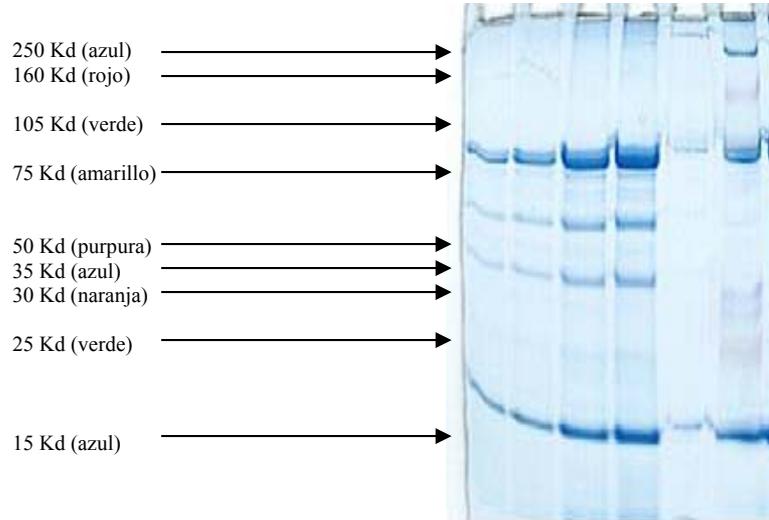


Figura 76. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Penaeus SPP* (caribeño) (n° 3).

El cuerpo del *Penaeus SPP* (caribeño) (n° 3), presenta un total de 4 bandas proteicas muy bien definidas. La primera comienza en los 105 Kda cuya intensidad aumenta conforme aumentamos la concentración de proteína, pero visible incluso a 12,5 µg de proteína. Las otras 3 bandas corresponden en orden descendente a los pesos moleculares de 55 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 76).

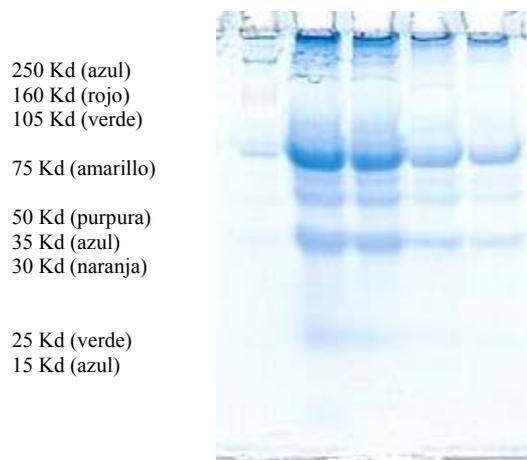


Figura 77. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Penaeus indicus* (n° 4).

El cuerpo del *Penaeus indicus* (n° 4), presenta un total de 8 bandas proteicas. Encontramos una primera banda de muy alto peso molecular, al principio del pocillo del gel, que tiene un peso molecular superior a 250 Kda, las restantes bandas están algo más alejadas y tienen un peso molecular de 250 Kda, 200 Kda, 105 Kda, 90 Kda, 75 Kda, 50 Kda y 20 Kda (Figura 77).

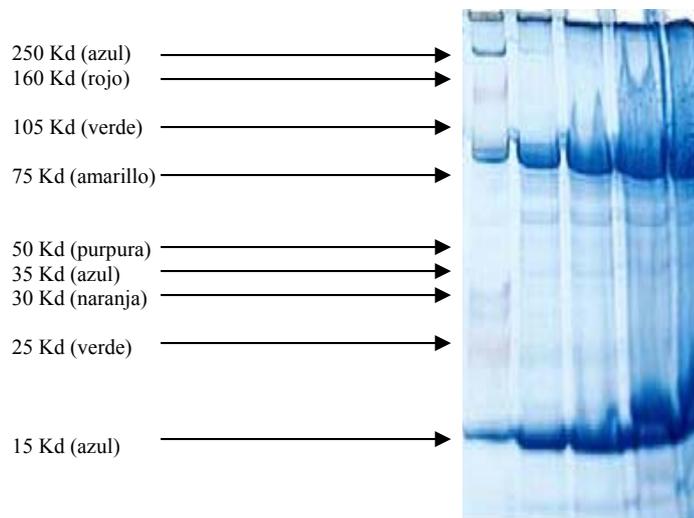


Figura 78. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Litornaneus vannamei* (n° 5).

El cuerpo del *Litornaneus vannamei* (n° 5), presenta un total de 4 bandas proteicas de alto peso molecular, que comienzan por encima de los 250 Kda, y progresivamente van descendiendo. Las otras 3 bandas proteicas tienen un peso molecular de 105 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 78).

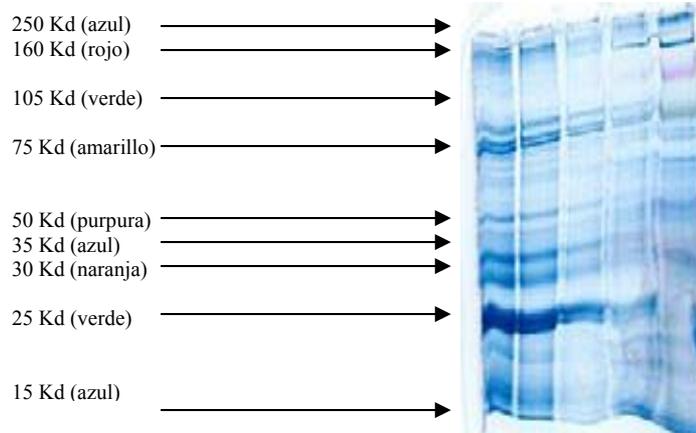


Figura 79. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (n° 6)

El cuerpo del *Parapenaeus SPP* (gamba arrocera) (n° 6), presenta un total de 9 bandas proteicas de alto peso molecular, que comienzan por encima de los 250 Kda, y progresivamente van descendiendo. Los pesos moleculares de estas bandas se localizan en los + de 250 Kda, 250 Kda, 105 Kda, 100 Kda, 50 Kda, 35 Kda, 30 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 79).

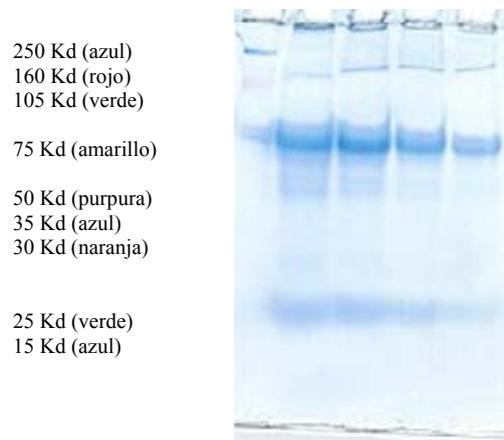


Figura 80. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Parapenaeus longirostris* (n° 7)

El cuerpo del *Parapenaeus longirostris*, presenta un total de 4 bandas proteicas. Encontramos una primera banda de muy alto peso molecular, al principio del pocillo del gel, que tiene un peso molecular

superior a 250 Kda, las restantes bandas están algo más alejadas y tienen un peso molecular de 200 Kda, 105 Kda y 15 Kda (Figura 80).

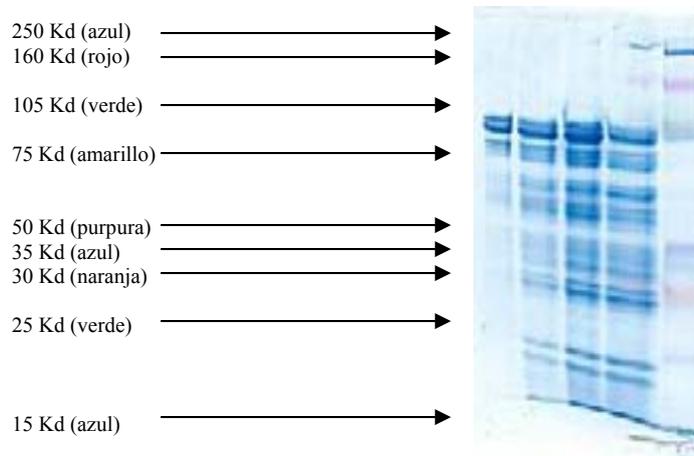


Figura 81. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Litopenaeus longirostris* extra (langostino REV M) (n° 8)

El cuerpo del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) (n° 8), presenta un total de 5 bandas proteicas que comienzan a partir de los 105 Kda, y progresivamente van descendiendo. Los pesos moleculares de estas bandas se localizan en los 105 Kda, 100 Kda, 75 Kda, 70 Kda, 65 Kda, 50 Kda, 45 Kda, 40 Kda, 30 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 81).

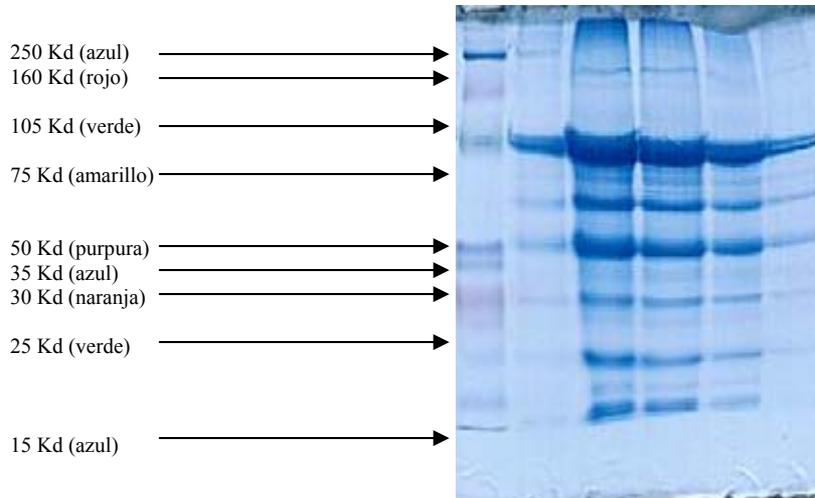


Figura 82. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Litopenaeus vannamei* (langostino GGG) (n° 9)

El cuerpo del langostino GGG (n° 9), presenta un total de 8 bandas proteicas de alto peso molecular, que comienzan por encima de los 250 Kda, y progresivamente van descendiendo. Los pesos moleculares de estas bandas se localizan en los + de 250 Kda, 200 Kda, 105 Kda, 75 Kda, 55 Kda, 30 Kda, 25 Kda y 15 Kda.

Cuanto mayor es la concentración de proteínas se ponen en evidencia algunas bandas poco nítidas o desaparecen en concentraciones inferiores. En este caso, la banda proteica de 200 Kda, que no se aprecia a concentraciones de 12,5 µg de proteína, se vuelven más nítidas a la concentración de más de 50 µg de proteína (Figura 82).

Nos planteamos si esta misma situación in vitro tiene relación con la clínica. Dicho de otro modo, si determinados pacientes con alergia alimentaria, pueden consumir una cantidad de alimento determinada, y si sobrepasan este límite presentarían reacciones alérgicas de intensidad variable. Es decir, concentraciones bajas de un alimento, no pondrían de relieve suficiente cantidad de alérgeno para desencadenar una reacción alérgica, mientras que dosis altas sí la producirían.

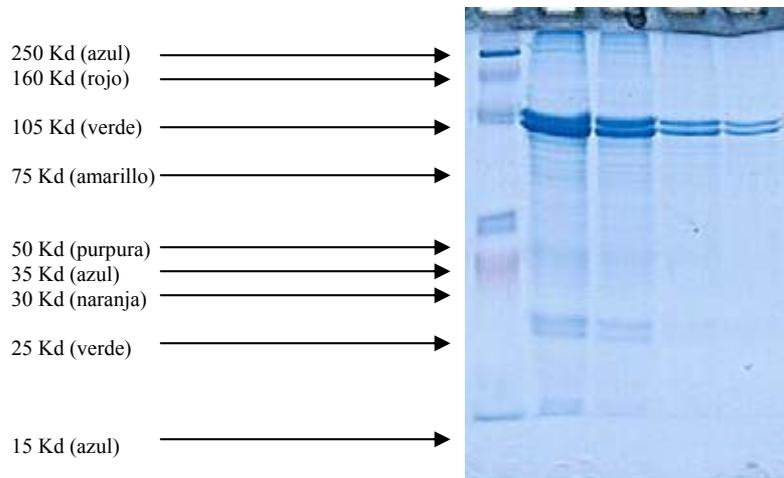


Figura 83. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (n° 10)

El cuerpo del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (n° 10), presenta un total de 5 bandas proteicas. Encontramos una primera banda de muy alto peso molecular, al principio del pocillo del gel, que tiene un peso molecular superior a 250 Kda, las restantes bandas están algo más alejadas y tienen un peso molecular de 105 Kda, 100 Kda, 25 Kda y 15 Kda (Figura 83).

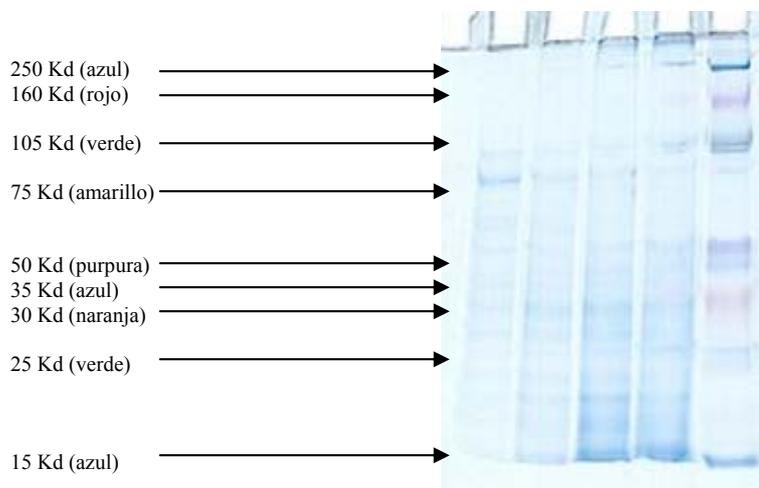


Figura 84. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (n° 11)

El cuerpo del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón) (nº 11), presenta un total de 5 bandas proteicas de bajo peso molecular. Dichas bandas tienen un peso molecular de 105 Kda, 75 Kda, 50 Kda, 30 Kda y 22 Kda (Figura 84).

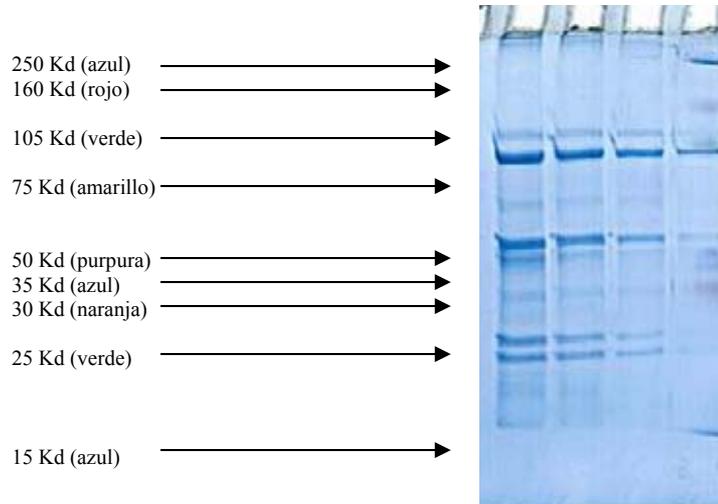


Figura 85. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) (nº 12)

El cuerpo del *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero), presenta un total de 5 bandas proteicas muy bien definidas. Las dos primeras, están muy próximas entre sí, y tienen un peso molecular de 105 Kda cuya intensidad aumenta conforme aumentamos la concentración de proteína, pero visible incluso a concentraciones de carga de 12,5 µg de proteína. Las otras bandas corresponden en orden descendente a los pesos moleculares de 60 Kda, 30 Kda y 22 Kda (Figura 85).

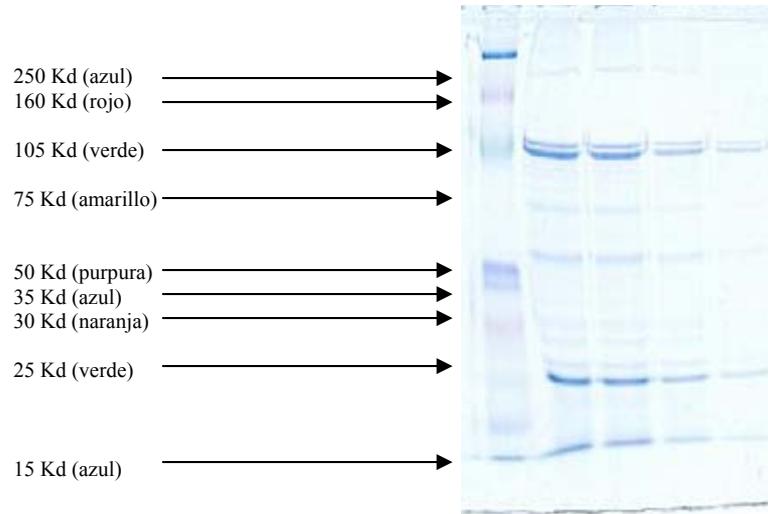


Figura 86. SDS PAGE realizado con el cuerpo del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (n° 13)

El cuerpo del *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (n° 13), presenta un total de 8 bandas proteicas. La primera está localizada entre los 250 Kda y los 160 Kda, y se corresponde aproximadamente sobre los 200 Kda. Esta banda sólo se aprecia cuando la concentración de cada pocillo está por encima de 25 µg de proteína. Las siguientes bandas en orden descendente están ubicadas en los pesos moleculares de 200 Kda, 105 Kda, 75 Kda, 55 Kda, 30 Kda, 25 Kda, 20 Kda y 15 Kda (Figura 86).

### **VI.3.3.3 Análisis de los resultados de los pesos moleculares obtenidos de las bandas proteicas del SDS PAGE realizados con las 12 especies de langostino, tanto de la cabeza como del cuerpo.**

Todos los resultados obtenidos y descritos anteriormente pueden resumirse en la Tabla 22, en la que se detalla todas las bandas proteicas y su correspondiente peso molecular, tanto de la cabeza como del cuerpo de cada una de las especies de langostinos estudiadas.

ESPECIES y VARIETADES	Pesos moleculares de las CABEZAS [Kd]	Pesos moleculares de los CUERPOS [Kd]
<i>Palaemon Serratus</i> (camarón)	15, 20, 105	20, 100, 105, >250
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	15, 30, 75, 105	15, 25, 55, 105
<i>Penaeus indicus</i>	15, 22, 30, 60, 105	20, 50, 75, 90, 105, 200, 250, >250
<i>Litorraeneus vannamei</i>	15, 20, 30, 100, 105, 250, >250	15, 25, 105, 250
Gamba arrocera	15, 22, 30, 50, 75, 105	15, 25, 30, 35, 50, 100, 105, 250, >250
<i>Parapenaeus Longirostris</i>	10, 20, 25, 30, 35, 75	15, 105, 200, >250
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra (langostino REV M)	75, 105	15, 25, 30, 40, 45, 50, 65, 70, 75, 100, 105
Langostino GGG	15, 50, 75, 100, 105	15, 25, 30, 55, 75, 105, 200, >200
<i>Parapenaeus longirostris</i>	10, 20, 25, 30, 50, 75	15, 25, 100, 105, >250
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	15, 25, 30, 35, 250	22, 30, 50, 75, 105
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	75, 90, 105	22, 30, 60, 105
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	15, 30, 50, 70, 75, 100, 105	15, 20, 25, 30, 55, 75, 105, 200

Tabla 22. Pesos moleculares de las bandas proteicas de todos los crustáceos estudiados, separados en cuerpo y cabeza.

Los resultados obtenidos indican que los extractos de las cabezas tienen un mínimo de 2 bandas y un máximo de 7 bandas, con una media de 4,92 bandas por cada extracto. Si analizamos los cuerpos tienen un mínimo de 4 y un máximo de 11 bandas siendo la media de 6,16 bandas por cada extracto. Estos resultados indican que hay más bandas proteicas en los cuerpos de estos crustáceos que en las cabezas, donde el contenido proteico es menor, aunque el contenido en fosfolípidos y grasas es

mayor. En total, hemos encontrado un total de 59 bandas proteicas para las cabezas y 74 para los cuerpos.

Si los analizamos por separado, las cabezas y los cuerpos, observamos que las bandas proteicas de los primeros, van desde pesos moleculares de 10 kda hasta más de 250 Kda, mientras que los pesos moleculares de los segundos van desde 15 Kda hasta más de 250 Kda. Es importante resaltar que aún cuando los pesos moleculares de las cabezas y los cuerpos de los langostinos están entre 250 Kda y 10 Kda, las bandas de más alto peso molecular son debidas al pellet de la muestra, y en realidad sólo existen bandas proteicas a partir de 105 Kda. De hecho, se repitió el SDS PAGE de cada uno de los extractos centrifugando de nuevo todas las muestras, presentando gran cantidad de pellet, así como desaparecieron las bandas de pesos moleculares por encima de 105 Kda (vease SDS PAGE del mix24 más adelante).

Tras analizar los resultados de los SDS PAGE podemos apreciar que la banda de 105 Kda está presente en absolutamente todos los de los cuerpos de los crustáceos estudiados, y que también está en la mayoría de las cabezas, a excepción de las cabezas del *Parapenaeus longirostris*, *Parapenaeus longirostris* de Huelva (presenta la misma etiqueta identificativa del producto) y *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón). Esto indica que los 3 *Parapenaeus* estudiados presentan características comunes.

Otra característica común a todas las especies, tanto el cuerpo como la cabeza, es que presentan muchas bandas de pesos moleculares bajos, que van desde los 75 hasta los 10 Kda. Es decir, de un total de 74 bandas proteicas detectas en los cuerpos de las distintas especies, 44 de éstas, tienen un peso molecular igual o inferior a 75 kd, esta proporción

supone el 59,45%. Este hecho es mucho más relevante y marcado en las cabezas, ya que de un total de 59 bandas proteicas detectadas en todas las especies, 43 de éstas tiene un peso molecular igual o inferior a 75 kda, esta proporción es el 72,88%. Por tanto, se puede resumir que las cabezas presentan menos proteínas agrupadas en distintas bandas y la mayor parte de ellas son de bajo peso molecular. Por otra parte, los cuerpos presentan más proteínas agrupadas en diferentes bandas proteicas y tienen una proporción de pesos moleculares más alta en comparación con las cabezas.

Las especies en las que se ha detectado menos bandas proteicas para la cabeza son el *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M), con sólo 2 bandas proteicas de alto peso molecular, seguido del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2), el *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero) y el *Penaeus SPP*, con un total de 3 bandas respectivamente. Las especies con menos bandas proteicas para el cuerpo son el *Penaeus SPP*, el *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2), el *Litorraneus vannamei*, el *Parapenaeus longirostris* y el *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero), con un total de 4 bandas proteicas.

#### **VI.3.4. Inmunoblotting.**

##### **VI.3.4.1. Puesta a punto de la técnica.**

Se decide realizar un extracto que contuviera todos los antígenos de las 12 variedades de langostino, incluyendo la cabeza y el cuerpo. Dado que la realización de un inmunoblotting con cada extracto de langostino y un único suero haría más difícil la visualización de las distintas bandas y la comparación entre ellas, dado que siempre existen pequeños “errores” en una misma técnica que pueden modificar parcialmente los resultados (por ejemplo, más tiempo en la electroforesis,

variaciones en la carga de proteínas...etc).

Se decide realizar un nuevo SDS PAGE con una mezcla de los 24 extractos, que incluyen la cabeza y el cuerpo de las 12 especies de langostino, al que llamaremos “mix24”. Posteriormente se realizó el inmunoblotting en el que se expuso cada uno de los sueros de los pacientes frente a esta mezcla antigénica, así como en cada inmunoblotting se contrastaba con un control positivo y otro negativo. Se reveló a los 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

Este “mix24” fue realizado con 50 µg de proteína de cada uno de los extractos, posteriormente se centrifugó este homogeneizado durante 10 minutos a 800g, para eliminar el pellet o sedimento, que contiene los núcleos, es decir la fracción nuclear. Los núcleos son las primeras partículas en sedimentar ya que poseen el coeficiente de sedimentación más grande ( $10^6$ - $10^7$ Svedberg). Tras realizar este procedimiento se procedió a realizar el SDS PAGE.

Puede apreciarse que han desaparecido las bandas proteicas de más alto peso molecular correspondiente al pellet. Apareciendo todas las bandas por debajo de 110 kda. Se realizó el SDS PAGE, en gel de poliacrilamida al 12%, ya que previamente se había utilizado este mismo porcentaje para realizar todos los SDS PAGE realizados con cada una de las cabezas y de los cuerpos de las distintas especies.

La dosis de carga de los pocillos y la proporción de extracto con el 3x, fue idéntica a la realizada con el SDS PAGE de los extractos de cabeza y cuerpo por separado, así como la técnica empleada.

Se cargó en el primer pocillo (well), los pesos moleculares de referencia llamado Novex®, y en el segundo, se cargó la mezcla de todos

los extractos de cuerpo y cabeza tras la centrifugación durante 10 minutos a 800g. Se extrajo el sobrenadante y se alicuotó en eppendorf, obteniéndose el siguiente resultado (Figura 87)

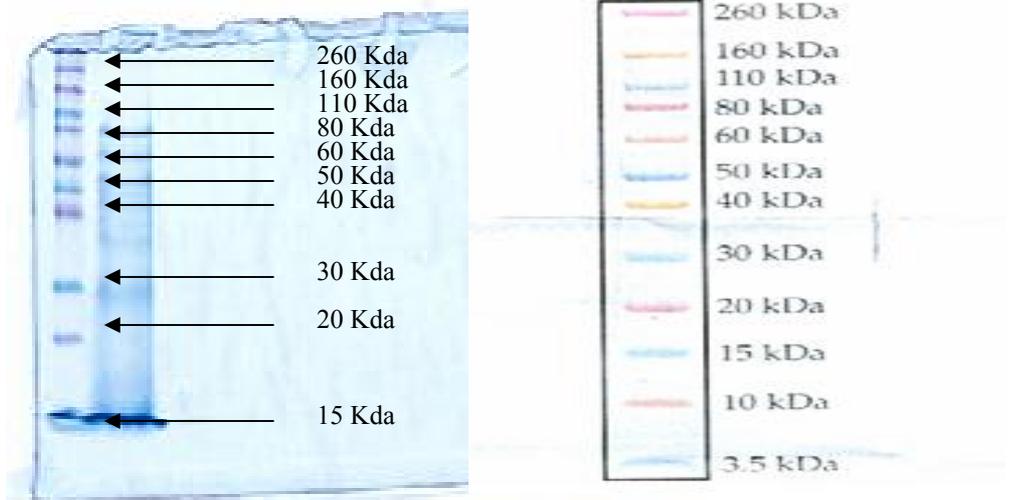


Figura 87. A la izquierda, el SDS PAGE de los 12 extractos de langostino, tanto de la cabeza como del cuerpo. A la derecha, una ampliación de los pesos moleculares de referencia (Novex®).

En este nuevo extracto se aprecian multitud de bandas muy proximas entre sí, que van desde los 105 Kda, en orden descendente hasta un mínimo de 10 Kda. Este SDS PAGE se usó como referencia para realizar los inmunoblotting con el suero de cada uno de los pacientes.

#### **VI.3.4.2. Resultados de los inmunoblotting realizado con los sueros de los pacientes expuestos a las 12 especies de langostino, tanto de la cabeza como del cuerpo.**

Inicialmente se decidió realizar un inmunoblotting en el que se exponía a cada paciente (10 pacientes, 1 control positivo y un control negativo) con cada una de las 24 extractos (12 de cabeza y 12 de cuerpo),

por lo que era necesario efectuar un total de 288 inmunoblotting. Dado la laboriosidad del proceso, así como la dificultad para interpretar tantos resultados obtenidos, se decide realizar un inmunoblotting que contenga todos los antígenos posibles, tanto de la cabeza como del cuerpo de los langostinos y exponerlo a cada suero por separado. De este modo la comparación de las bandas detectadas por los sueros de los pacientes hace más fácil la visualización de las diferencias, así como disminuye los posibles sesgos que aparecen siempre que se realizan pruebas de laboratorio.

Se presentan inicialmente varios inmunoblotting juntos, para que pueda apreciarse las diferencias entre unos y otros, ya que si se presentan de forma aislada cuando las diferencias entre pesos moleculares es pequeña hace difícil su visualización. No obstante más adelante, se detallan los pesos moleculares de cada una de las bandas proteicas.



Figura 88. El mismo Inmunoblotting realizados con el suero de los 3 primeros pacientes numerados del 1 al 3. Revelado al cabo de 30 minutos.

En primer lugar en la Figura 88, están los inmunoblotting de los 3 primeros pacientes en donde se aprecian a simple vista diferencias significativas en la detección de bandas, ya que en el paciente 1 sólo se detectan 2 bandas de muy leve intensidad, se decide aumentar la dosis de carga, sin modificar la concentración del 1º ni del 2º anticuerpo, obteniéndose la imagen de las Figuras 90 y 95, donde se visualizan mejor las bandas existentes y aparece una tercera, que no estaba descrita previamente. En los pacientes 2 y 3 se aprecian 4 y 3 bandas de gran intensidad respectivamente. Más adelante se analizarán por separado y se precisará a qué pesos moleculares corresponde. Las bandas de cada uno de los pacientes no presenta el mismo peso molecular, ya que como se aprecia en la imagen, dichas bandas no están a la misma altura.

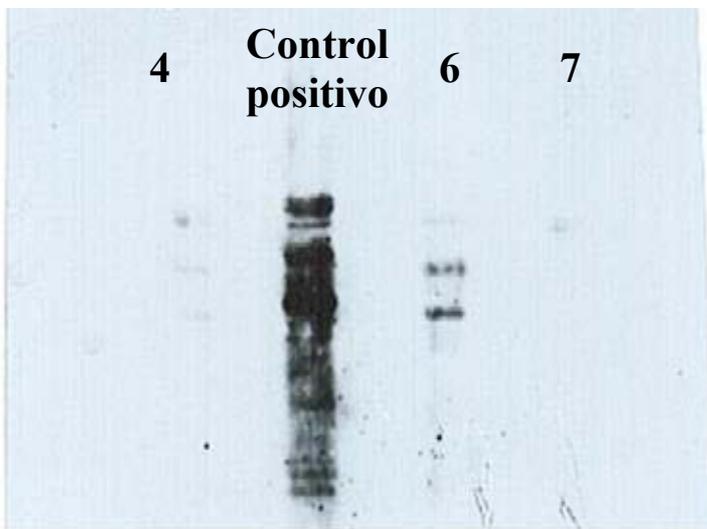


Figura 89. Imagen del Inmunoblotting, a tamaño real, realizada con el suero de los siguientes pacientes 4, 6 y 7, así como el control positivo. Revelado al cabo de 30 minutos.

En la Figura 89, están los inmunoblotting de los pacientes 4, 5 y 6, así como el control positivo. En el paciente 4, que inicialmente presenta pocas bandas proteicas, se decide aumentar la dosis de carga en el gel, sin modificar la concentración del 1º ni del 2º anticuerpo

obteniéndose multitud de bandas proteicas como puede apreciarse en la Figuras 90 y 95. El control positivo contiene multitud de bandas proteicas muy próximas unas a otras, llegando hasta casi el final de la membrana. El paciente 6, sólo reconoce 3 bandas proteicas, 2 de las cuales son de alta intensidad. El paciente 7 sólo reconoce una banda proteica de muy baja intensidad.

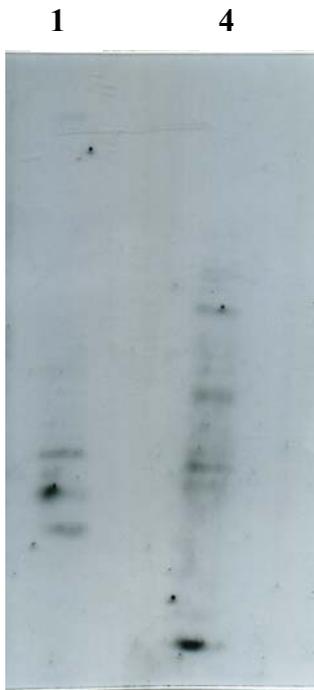


Figura 90. Imagen del inmunoblotting, a tamaño real, realizada con el suero de los pacientes 1 y 4, aumentando la dosis de carga. Revelado al cabo de 30 minutos. La aparición de nuevas bandas proteicas, así como el aumento de la intensidad de las ya existentes al aumentar la dosis de carga, sólo se han dado estos casos con los sueros de los pacientes 1 y 4.

En la Figura 91, se observa los inmunoblotting de los pacientes 8, 9, 10 y 11, así como el control negativo. El paciente 8, sólo presenta una banda proteica de moderada intensidad, el paciente 9 sólo reconoce una banda proteica de baja intensidad y poco peso molecular, el paciente 10 reconoce 3 bandas de moderada intensidad y próximas entre sí y por último, el paciente 11 presenta una banda de gran intensidad y de muy bajo peso molecular. El paciente que no estaba sensibilizado a ningún especie (control negativo), no reconoce ninguna banda proteica, lo cual

nos indica, que el segundo anticuerpo usado en el inmunoblotting no reconoce de forma inespecífica las bandas proteicas. Esto nos indica una clara especificidad del primer anticuerpo (suero del paciente), o dicho de otra forma, que todas las bandas que aparecen son debidas a una fijación del antígeno por el primer anticuerpo (IgE del paciente).

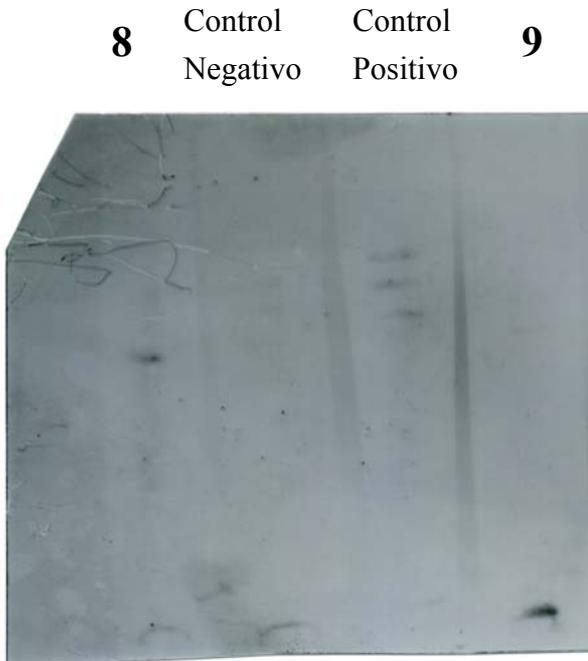
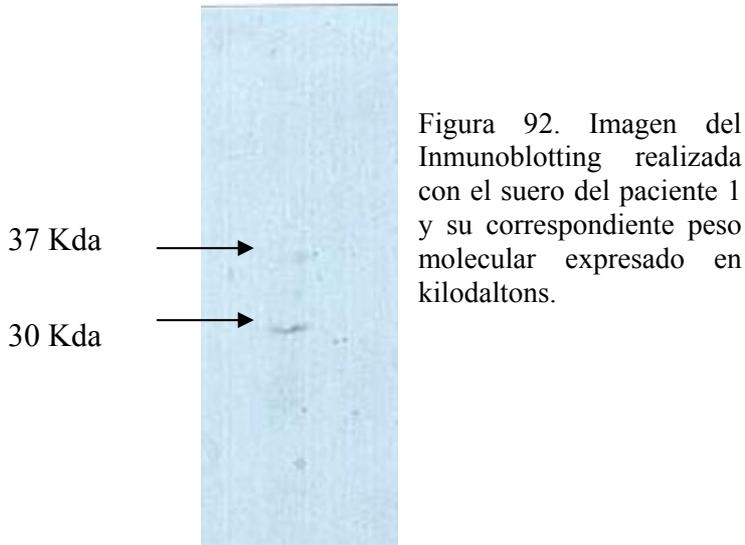


Figura 91. Imagen del Inmunoblotting, a tamaño real, realizada con el suero de los siguientes pacientes, de izquierda a derecha, paciente 8, control negativo, control positivo y paciente 9. Revelado al cabo de 30 minutos.

Tras visualizar todos los inmunoblotting de forma agrupada y ver que existen diferencias, debemos analizarlo individualmente, así como describir los pesos moleculares de cada una de las bandas de proteínas. En las siguientes Figuras 92-100 se detallan cada uno de ellos por separado. Se ha elegido el inmunoblotting en el que se aprecia mejor calidad de imagen, ya que en todos los casos durante el revelado han sido expuestos a una placa fotográfica durante 5 minutos, y posteriormente se

han revelado con otra placa a los 15 y a los 30 minutos.



El suero del paciente 1 reconoce sólo 2 bandas de proteínas, de bajo peso molecular, de 30 Kda y 37 Kda respectivamente. Estas bandas tienen poca intensidad y como se ha comentado anteriormente, tras aumentar la dosis de carga, se hizo visible una banda de 20 Kda, así como aumentó la intensidad de las 2 bandas ya conocidas (Figura 92).

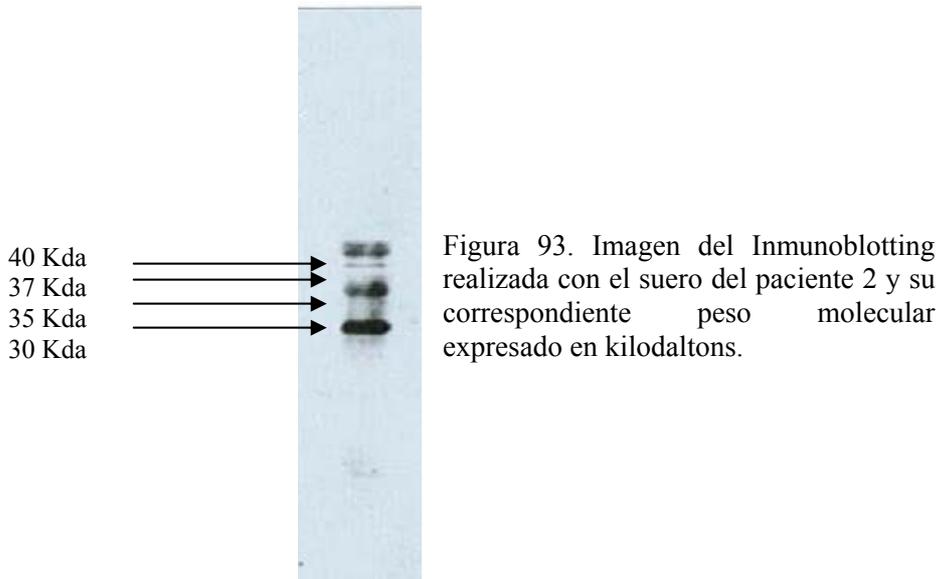
En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 3 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del *Penaeus kerathurus* (20 y 30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (30 Kda) (carabinero), el *Palaemon serratus* (camarón) (20 Kda), *Penaeus indicus* (20 Kda), gamba arrocera (30 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón), así como las cabezas del *Palaemon serratus* (camarón) (20 Kda), del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (30 Kda), *Litorraneus vannamei* (20 y 30 Kda), gamba arrocera (30 Kda),

*Parapenaeus longirostris* (20 y 30 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (20 y 30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón) y *Penaeus kerathurus* (30 Kda) (langostino tigre) (Tabla 23).

Las pruebas cutáneas para el paciente 1 fueron positivas para el cuerpo y la cabeza del camarón, la cabeza del *Parapenaeus longirostris*, el cuerpo del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) y la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón). En este caso, de las 4 sensibilizaciones que presenta el paciente, en 2 de ellas se cumple que cuando la misma banda proteica está implicada en el cuerpo y en la cabeza de la misma especie el paciente está sensibilizado a esa especie. En el caso de estar 2 bandas diferentes en el mismo cuerpo o en la misma ccabeza no siempre existe sensibilización.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)				
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	9x13	20 Kda	12x15	20 Kda
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	-/-	30 Kda	-/-	
<i>Penaeus indicus</i>	-/-	30 Kda	-/-	20 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-/-	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	-/-	30 Kda	-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	9x14	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	-/-		4x6	30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	-/-		-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	-/-	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	31x33	30 Kda	-/-	30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	-/-		-/-	30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	-/-	30 Kda	-/-	20 y 30 Kda

Tabla 23. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 1.



El suero del paciente 2 reconoce 4 bandas de proteínas, con un peso molecular que se corresponden en orden descendente con 40 kd, 35 kd y 30 kd. Se aprecia una pequeña banda muy fina localizada entre 35 y 40 Kd, que correspondería con un peso molecular aproximado de 37 Kda. Dichas bandas tienen una intensidad moderada excepto la de 30 kd, que es de gran intensidad. En cuanto a la banda proteica de 35 Kda, presenta una porción izquierda de menor intensidad que la de porción derecha, aunque este dato no tiene ninguna relevancia (Figura 93).

En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 4 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del *Penaeus kerathurus* (30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (30 Kda), la gamba arrocera (30 y 35 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (30 y 40 Kda), langostino GGG (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón), así como las cabezas del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (30 Kda), *Litorraneus vannamei* (30 Kda), gamba arrocera (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* (30 y 35 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 y 35 Kda) y *Penaeus kerathurus* (30 Kda) (Tabla 24).

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)				
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	-/-	20 Kda	25x30	20 Kda
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	-/-	30 Kda	-/-	
<i>Penaeus indicus</i>	-/-	30 Kda	15x19	20 Kda
<i>Litorraneus vannamei</i>	-/-	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	-/-	30 Kda	-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	-/-	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	7x10		15x20	30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	6x8		-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	12x12	20 y 30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	-/-	30 Kda	-/-	30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	-/-		-/-	30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	10x10	30 kda	-/-	20 y 30 Kda

Tabla 24. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 2.

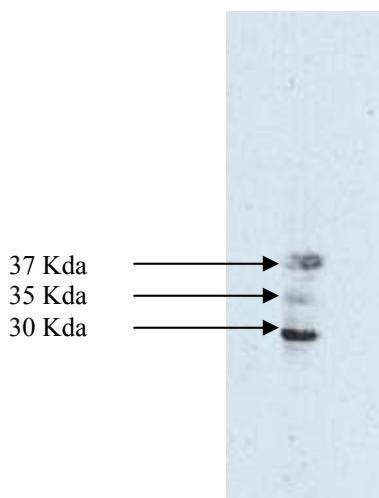


Figura 94. Imagen del Immunoblotting realizada con el suero del paciente 3 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 3 reconoce 3 bandas de proteínas, con un peso molecular localizado entre 30 y 37 kda. Estas bandas se corresponden en orden descendente con 37 kd, 35 kd y 30 kd, aunque

puede apreciarse una pequeña banda muy fina localizada entre las bandas de 35 y 37 Kd, que correspondería con un peso molecular aproximado de 36 Kda. Dichas bandas tienen una intensidad moderada excepto la de 30 kd, que es de gran intensidad (Figura 94).

En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 3 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del *Penaeus kerathurus* (30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (30 Kda) (carabinero), gamba arrocera (30 y 35 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón), así como las cabezas del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (30 Kda), *Litorraneus vannamei* (30 Kda), gamba arrocera (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (30 Kda) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre)(30 Kda) (Tabla 25).

Las pruebas cutáneas para el paciente 3 fueron positivas para el cuerpo y la cabeza del camarón, la cabeza del *Parapenaeus longirostris*, el cuerpo del *Litopenaeus vannamei* extra (langostino REV M) y la cabeza del *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón). En este caso, de las 4 sensibilizaciones que presenta el paciente, en 2 de ellas se cumple que cuando la misma banda proteica está implicada en el cuerpo y en la cabeza de la misma especie se produce una sensibilización a esa especie. En el caso de estar 2 bandas diferentes en el mismo cuerpo o en la misma cabeza no siempre existe sensibilización. No todas las especies que tienen una única banda el paciente está sensibilizado.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	5x7		25x30	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	5x5		-/-	
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	5x7	30 Kda	15x19	
<i>Penaeus indicus</i>	5x13	30 Kda	-/-	
<i>Litorraneus vannamei</i>	5x7	30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	4x4	30 Kda	-/-	30 y 35 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	13x15	30 Kda	15x20	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	3x3		-/-	30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	3x9		-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	5x5	30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	3x3	30 Kda	-/-	30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	2x3		-/-	30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	3x4	30 Kda	-/-	30 Kda

Tabla 25. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 3.

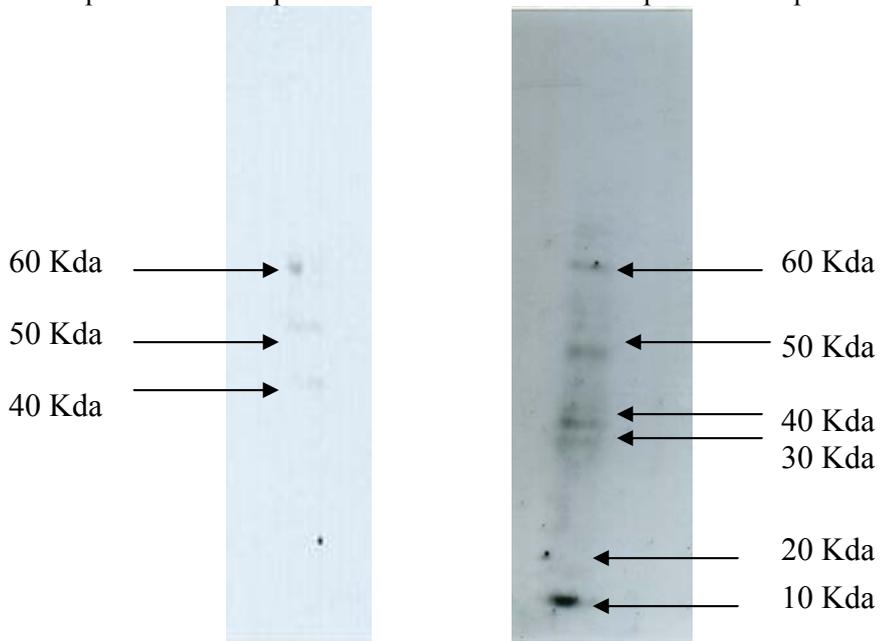


Figura 95. Imagen del Inmunoblotting realizada con el suero del paciente 4 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons. A la derecha el

mismo inmunoblotting pero aumentando la dosis de carga (x2). Apareciendo una banda proteica de gran intensidad de 5 Kda.

El suero del paciente 4 con una dosis de carga de 50 µg de proteína, reconoce sólo 3 bandas que en orden descendente se corresponden con los pesos moleculares de 60 Kda, 50 Kda y 40 Kda respectivamente. Estas bandas tienen poca intensidad y como se ha comentado anteriormente, tras aumentar la dosis de carga a una concentración de 100 µg, sorprendentemente se hicieron visibles nuevas bandas, así como aumentó la intensidad de las bandas ya conocidas. Así en el inmunoblotting en el que se aumentó la dosis de carga se aprecian nuevas bandas con pesos moleculares de 60 Kda, 50 Kda, 40 Kda, 30 Kda, 20 Kda y 10 kda. Esta última banda es de una gran intensidad (Figura 95).

En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 6 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del camarón ( 20 Kda), *Penaeus indicus* (50 y 20 Kda), gamba arrocera (50 y 30 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (50, 40, 30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* extra (50 y 30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (60 y 30 Kda) (carabinero), *Penaeus kerathurus* (20 y 30 Kda), así como las cabezas del *Palaemon serratus* (20 Kda), del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (60 y 30 Kda), *Litorraneus vannamei* (20 y 30 Kda), gamba arrocera (50 y 30 Kda), *Parapenaeus longirostris* (20 y 30 Kda), langostino GGG (50 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (50, 30 y 20 Kda), *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (50 y 30 Kda) (Tabla 26).

Las pruebas cutáneas para el paciente 4 fueron positivas para todas las especies de langostino, tanto el cuerpo como la cabeza.

En este caso se aprecia como la banda proteica de 20 Kda de forma aislada da pruebas cutáneas en prick test muy positivas. Este hecho no aparece cuando dicha banda está asociada a otras. La asociación de las bandas con pesos moleculares de 30 y 50 Kda, da pruebas cutáneas muy poco positivas, excepto si esta última se asocia con una de banda con un peso molecular de 40 Kda.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	6x6		2x2	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	7x9	20 Kda	4x11	20 Kda
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	5x5	30 Kda	4x4	
<i>Penaeus indicus</i>	4x4	60 y 30 Kda	2x5	50 y 20 Kda
<i>Litorraneus vannamei</i>	5x9	20 y 30 Kda	2x2	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	3x6	50 y 30 Kda	3x3	50 y 30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	4x6	20 y 30 Kda	3x10	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	8x12		9x13	50, 40 y 30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	5x10	50 Kda	2x6	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	4x8	50, 30 y 20 Kda	3x6	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	4x9	30 Kda	3x5	50 y 30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	4x11		2x2	60 y 30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	8x14	50 y 30 Kda	6x9	20 y 30 Kda

Tabla 26. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 4.

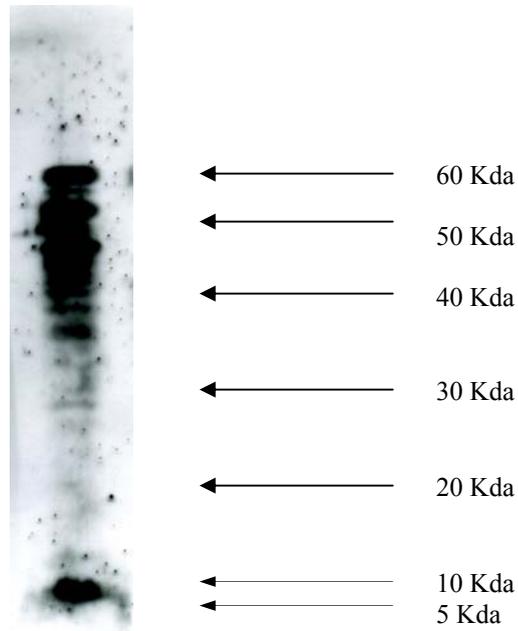


Figura 96. Imagen del Immunoblotting realizada con el suero del paciente 5 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 5 con una dosis de carga de 50  $\mu$ g de proteína, reconoce 7 bandas que en orden descendente se corresponden con los pesos moleculares de 60 Kda, 50 Kda, 40 Kda, 30 Kda, 20 Kda, 10 y 5 kda. Las bandas proteicas de los pesos moleculares de zonas extremas, presentan una gran intensidad, mientras que aquellos que están en zonas más centrales la intensidad disminuye (Figura 96).

En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 7 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del *Palaemon serratus* ( 20 Kda), *Penaeus indicus* (50 y 20 Kda), gamba arrozera (50 y 30 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (50, 40, 30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* extra (50 y 30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (60 y 30 Kda) (carabinero), *Penaeus*

*kerathurus* (20 y 30 Kda), así como las cabezas del camarón (20 Kda), del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (60 y 30 Kda), *Litorraneus vannamei* (20 y 30 Kda), gamba arrocera (50 y 30 Kda), *Parapenaeus longirostris* (20 y 30 Kda), langostino GGG (50 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (50, 30 y 20 Kda), *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (50 y 30 Kda) (Tabla 27).

Las pruebas cutáneas para el paciente 5 fueron positivas para todas las especies de langostino, excepto para las cabezas de las especies *Litopenaeus vannamei* (langostino blanco), gamba arrocera, *Parapenaeus longirostris*, langostino GGG y el *Pleisopenaeus edwardsianus* (carabinero). El resto de las cabezas y todos los cuerpos fueron positivos con mayor o menor intensidad.

En este caso los resultados son contradictorios, ya que la asociación de los bandas con los pesos moleculares de 30 y 50 Kda, dan pruebas cutáneas en 2 casos, mientras que resultan negativas en un tercero. Este mismo hecho ocurre con la banda proteica de 20 Kda que de forma aislada da pruebas cutáneas en prick test muy positivas en algunos casos, mientras que en otros son positivas pero de leve intensidad y en otras ocasiones son negativas. En cuanto a la banda de 50 Kda, si aparece de forma aislada resulta positiva pero de baja intensidad, mientras que si va asociada a otras bandas su comportamiento es variable, desde negativo hasta positivo de baja intensidad o de alta intensidad según la especie de langostino.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	-/-	20 Kda	4x4	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	3x3	30 Kda	8x14	20 Kda
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	2x2	60 y 30 Kda	9x16	
<i>Penaeus indicus</i>	2x2	20 y 30 Kda	4x6	50 y 20 Kda
<i>Litorraneus vannamei</i>	2x2	50 y 30 Kda	4x4	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	-/-	20 y 30 Kda	5x7	50 y 30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	-/-		2x2	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	2x2	50 Kda	3x3	50, 40 y 30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	-/-	50, 30 y 20 Kda	5x5	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	2x2	30 Kda	5x5	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	3x3		2x2	50 y 30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	-/-	50 y 30 Kda	5x6	60 y 30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	2x2	20 Kda	3x3	20 y 30 Kda

Tabla 27. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 5.

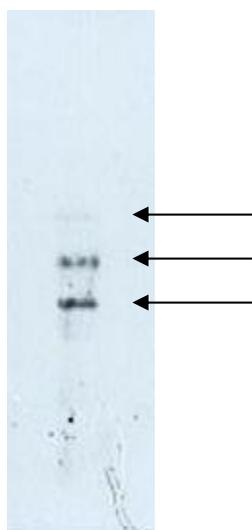


Figura 97. Imagen del Inmunoblotting realizada con el suero del paciente 6 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 6 reconoce sólo 3 bandas de proteínas, de bajo peso molecular, de 30, 28 y 25 Kda respectivamente. Estas bandas tienen poca intensidad y van aumentandola conforme disminuye el peso molecular. Estas 3 bandas proteicas que son reconocidas por el suero de este paciente, 2 de ellas (25 y 30 Kda) son muy frecuentes en la mayoría de las especies estudiadas (Figura 97).

Las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE cualquiera de los pesos moleculares de las 3 bandas proteicas citadas se corresponden con los cuerpos del *Penaeus kerathurus* (25 y 30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (30 Kda) (carabinero), *Penaeus SPP* (25 Kda), *Litorraneus vannamei* (25 Kda), gamba arrocera (30 y 25 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (25 y 30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (25 y 30 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (25 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón), así como las cabezas del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (30 y 22 Kda), *Litorraneus vannamei* (30 Kda), gamba arrocera (30 y 22 Kda), *Parapenaeus longirostris* (25 y 30 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (25 y 30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (25, 30 y 35 Kda) (gamba padrón) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (30 Kda) (Tabla 28).

Las pruebas cutáneas para el paciente 6 fueron positivas para todas las cabezas de las especies estudiadas excepto del *Penaeus SPP* (caribeño) y el *Penaeus indicus*. Por otra parte, las pruebas cutáneas fueron positivas para todos los cuerpos excepto para el *Penaeus SPP* (caribeño), el langostino GGG y el *Parapenaeus longirostris* extra (gamba padrón).

En este caso los resultados indican que cuando sólo está sensibilizado a una banda aislada ya sea de 25 Kda o de 30 Kda, el

paciente presenta pruebas cutáneas negativas cuando se realizan con los cuerpos de las distintas especies. Este hecho no ocurre de igual forma cuando se realizan pruebas cutáneas con las cabezas de los crustáceos, resultando en su mayoría positiva pero de baja intensidad o negativas.

Por el contrario cuando se asocian varias bandas con pesos moleculares de 25 y 30 Kda, las pruebas cutáneas resultan en su mayoría positivas de baja intensidad, excepto en 2 casos que resultan negativas. Un resultado muy parecido ocurre con la asociación de las pesos moleculares de 22 y 30 Kda, donde en la mayoría de las ocasiones presentan pruebas cutáneas positivas pero de poca intensidad excepto en un caso que resulta negativa.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	3x3			
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	2x2		12x15	
<i>Penaeus</i> SPP (caribeño)	-/-	30 Kda	-/-	25 Kda
<i>Penaeus indicus</i>	-/-	22 y 30 Kda	-/-	
<i>Litorraneus vannamei</i>	3x3	30 Kda	-/-	25 Kda
<i>Parapenaeus</i> SPP (gamba arrocera)	2x2	22 y 30 Kda	-/-	25 y 30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	3x3	25 y 30 Kda	-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	2x2		4x6	25 y 30 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	2x2		-/-	25 y 30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	3x3	25 y 30 Kda	-/-	25 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	3x5	25, 30 y 35 Kda	-/-	30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	2x2		-/-	30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	2x2	30 Kda	-/-	25 y 30 Kda

Tabla 28. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 6.

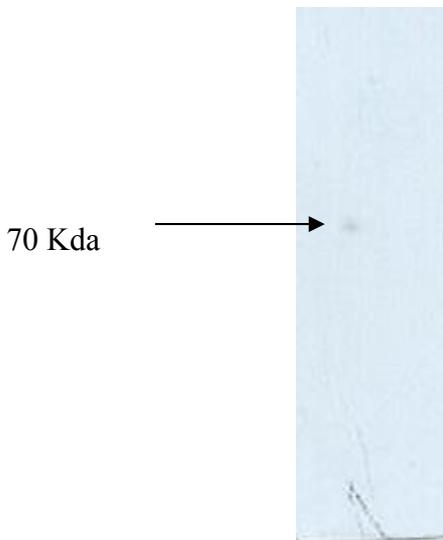


Figura 98. Imagen del Inmunoblotting realizada con el suero del paciente 7 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 7 sólo reconoce una banda de proteínas, cuyo peso molecular es de 70 Kda. Esta banda tiene muy poca intensidad. En este caso registraremos no sólo las bandas de 70 Kda, sino también las de 75 kda, dado que están muy próximas entre sí y la diferencia de una o de otra puede variar según el observador (Figura 98)

En este sentido, las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE una banda proteica cuyo peso molecular es de 70 o 75 Kda se corresponde con los cuerpos del *Penaeus indicus* (75 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (70 y 75 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (75 Kda), *Parapenaeus longirostris* extra (75 Kda), *Penaeus kerathurus* (75 Kda), así como las cabezas del *Penaeus SPP* (75 Kda), gamba arrocera (75 Kda), *Parapenaeus longirostris* (75 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (75 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (75 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (75 Kda), *Penaeus edwardsianus* (75 Kda) (carbinero) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (70 y 75 Kda) (Tabla 29).

Las pruebas cutáneas para el paciente 7 fueron positivas para todas las cabezas de las distintas especies de langostino, excepto para el *Penaeus SPP* (caribeño) y el *Penaeus indicus*, así como sólo resultó positiva para el cuerpo del *Litorraneus vannamei*. El resto de las pruebas cutáneas resultaron negativas.

En este caso los resultados vuelven a ser contradictorios, ya que aunque las bandas con pesos moleculares de 70 o 75 Kda son mucho más frecuentes en las cabezas de las especies estudiadas, el paciente 7 presenta pruebas cutáneas positivas en algunos casos y negativas en otros. La asociación de las bandas con los pesos moleculares de 70 y 75 Kda, resulta positiva en caso de realizarse con la cabeza del crustáceo o negativa si se realiza con el cuerpo.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	2x2		-/-	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	2x2		-/-	
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	-/-	75 Kda	-/-	75 Kda
<i>Penaeus indicus</i>	-/-		-/-	
<i>Litorraneus vannamei</i>	5x7		2x2	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arroceras)	2x2	75 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i>	6x8	75 Kda	-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	6x6	75 Kda	-/-	70 y 75 Kda
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	4x5	75 Kda	-/-	75 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	5x9	75 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	5x9		-/-	75 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	6x6	75 Kda	-/-	
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	5x6	70 y 75 Kda	-/-	75 Kda

Tabla 29. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 7.

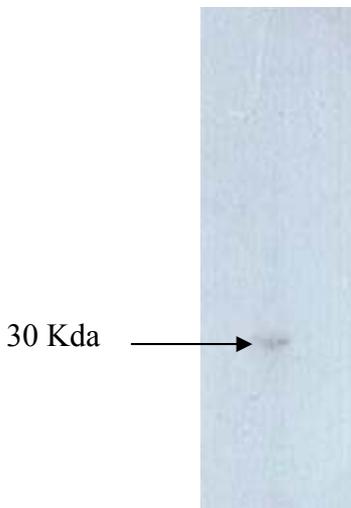


Figura 99. Imagen del Immunoblotting realizada con el suero del paciente 8 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 8 sólo reconoce una banda de proteínas, cuyo peso molecular es de 30 Kda. Esta banda tiene una intensidad moderada (Figura 99).

Las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE bandas proteicas con un peso molecular de 30 Kda se corresponden con los cuerpos del *Penaeus kerathurus* ( 30 Kda), *Pleisopenaeus edwardsianus* (30 Kda) (carabinero), gamba arrocera (30 Kda), *Litopenaeus vannamei* extra (30 Kda) (langostino REV M), langostino GGG (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra (30 Kda) (gamba padrón), así como las cabezas del *Penaeus SPP* (30 Kda), *Penaeus indicus* (30 Kda), *Litorraneus vannamei* (30 Kda), gamba arrocera (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* (30 Kda), *Parapenaeus longirostris* de Huelva (30 Kda) y *Parapenaeus longirostris* extra ( 30 Kda) (gamba padrón) y *Penaeus kerathurus* (langostino tigre) (30 Kda) (Tabla 30).

Las pruebas cutáneas para el paciente 8 fueron positivas para todas las cabezas de las especies estudiadas excepto del *Palaemon serratus* (camarón) (nº 2) y del *Penaeus indicus*. Por otra parte, las pruebas cutáneas fueron positivas para todos los cuerpos excepto para

*Litorraneus vannamei*, el langostino GGG y el *Penaeus kerathurus* (langostino tigre).

En este caso los resultados son contradictorios, ya que aunque el suero del paciente 8 reconoce las bandas con pesos moleculares de 30 Kda, no existe una buena concordancia con las pruebas cutáneas. En este sentido, se destaca que especies que en su estructura están formadas por proteínas de 30 Kda, las pruebas cutáneas resultan negativas.

No obstante es importante destacar que la bandas proteicas cuyo peso molecular se corresponden con 30 Kda, son muy frecuentes en la mayoría de las especies estudiadas.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	3x3		2x2	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	-/-		2x2	
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	3x3	30 Kda	4x8	
<i>Penaeus indicus</i>	-/-	30 Kda	3x3	
<i>Litorraneus vannamei</i>	4x8	30 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	2x2	30 Kda	5x6	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	6x6	30 Kda	3x3	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra(langostino REV M)	2x2	30 Kda	9x13	30 Kda
<i>Langostino GGG</i>	4x4		-/-	30 Kda
<i>Parapenaeus longirostris</i>	5x6	30 Kda	2x2	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	3x4	30 Kda	2x2	30 Kda
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	2x3		2x2	30 Kda
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	9x12	30 Kda	-/-	30 Kda

Tabla 30. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 8.



Figura 100. Imagen del Inmunoblotting realizada con el suero del paciente 9 y su correspondiente peso molecular expresado en kilodaltons.

El suero del paciente 9 reconoce sólo una banda de proteínas, de muy bajo peso molecular, que se corresponde con 10 Kda. Esta banda tiene poca intensidad (Figura 100).

Las especies de langostino que contienen en su SDS PAGE una banda proteica con un peso molecular de 10 Kda se corresponde con la cabeza del *Parapenaeus longirostris* (10 Kda) y del *Parapenaeus longirostris* de Huelva (10 Kda) (Tabla 31).

Las pruebas cutáneas para el paciente 9 sólo fueron positivas para la cabeza *Parapenaeus longirostris*.

En este caso los resultados indican que el inmunoblotting y las pruebas cutáneas tienen una buena concordancia. Por el contrario, la prueba resulta negativa para la cabeza del *Parapenaeus longirostris* de Huelva.

	CABEZA		CUERPO	
	Prick test	Banda proteica	Prick test	Banda proteica
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino blanco)	-/-		-/-	
<i>Palaemon serratus</i> (camarón)	-/-		-/-	
<i>Penaeus SPP</i> (caribeño)	-/-		-/-	
<i>Penaeus indicus</i>	-/-		-/-	
<i>Litorraneus vannamei</i>	-/-		-/-	
<i>Parapenaeus SPP</i> (gamba arrocera)	-/-		-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i>	4x5	10 Kda	-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> extra (langostino REV M)	-/-		-/-	
<i>Litopenaeus vannamei</i> (langostino GGG)	-/-		-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> de Huelva	-/-	10 Kda	-/-	
<i>Parapenaeus longirostris</i> extra (gamba padrón)	-/-		-/-	
<i>Pleisopenaeus edwardsianus</i> (carabinero)	-/-		-/-	
<i>Penaeus kerathurus</i> (langostino tigre)	-/-		-/-	

Tabla 31. Tabla que relaciona las pruebas cutáneas con las bandas proteicas del paciente 9.

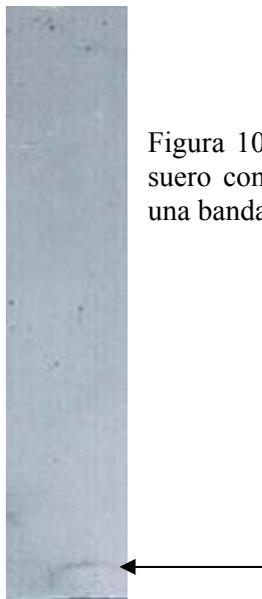


Figura 101. Imagen del Immunoblotting realizada con el suero control negativo. La imagen que se aprecia no es una banda proteica sino el frente del gel.

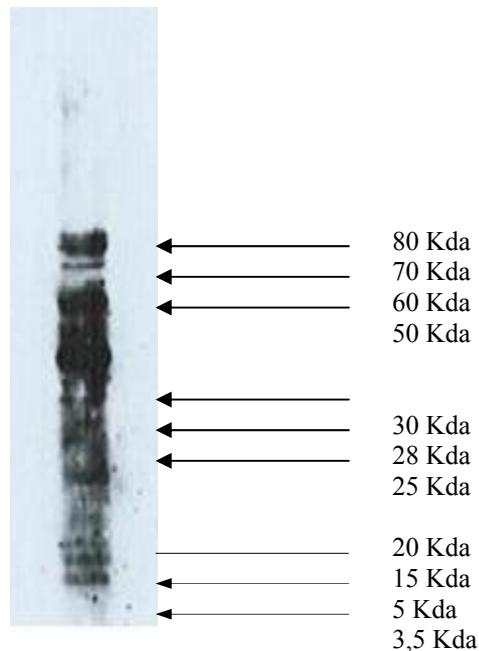


Figura 102. Imagen del Inmunoblotting realizada con el suero control positivo. Se aprecian multitud de bandas proteicas de distinto peso molecular.

En este inmunoblotting del paciente control positivo, pueden apreciarse multitud de bandas muy próximas unas a otras, y cuyos pesos moleculares son 80, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 20, 15, 5 y 3,5 Kda. En este caso este inmunoblotting es el patrón de referencia de todos los demás. No es necesario compararlo con sus pruebas cutáneas, ya que estas son todas positivas.

La realización de todos los inmunoblotting se realizó con un control positivo y otro negativo para confirmar que no existían uniones inespecíficas del segundo anticuerpo a bandas proteicas de las distintas especies de langostino.



## **VII.DISCUSION**

---



## VII. DISCUSION.

La alergia de origen alimentario está experimentando un notable incremento. Su incidencia se ha duplicado en los últimos 25 años, y además de factores genéticos y ambientales, una serie de circunstancias parecen influir decisivamente en el aumento de este tipo de patologías. Entre ellos, la introducción de cereales en la dieta de los lactantes, el crecimiento del consumo de frutas exóticas, de reciente introducción en el mercado, el bajo peso al nacer (los bebés con peso inferior a 2.500 gramos, que suponen el 9% de los recién nacidos en España, muestran una respuesta inmune alterada, deficiente, y son más propensos a las enfermedades alérgicas e infecciosas) y la supresión temprana de la lactancia materna, para pasar al biberón, es otro factor que explica el incremento de la alergia.

Se estima que el 5% de niños menores de tres años y el 1,5% de la población general padece algún tipo de alergia alimentaria, que en España equivaldría a unos 600.000 afectados. La alergia alimentaria infantil es, en la mayoría de los casos, el preludio de posteriores enfermedades alérgicas respiratorias, como rinitis y asma por sensibilización a pólenes, ácaros, animales u hongos. En el caso de los niños, se dan principalmente durante los dos primeros años de vida. La leche, el huevo y el pescado son responsables del 90% de los casos en los menores de un año, y el huevo se revela como el alimento más alergénico en niños de 1 a 2 años.

El pronóstico de esta alergia es bueno, ya que los niños alérgicos a la leche o al huevo los acaban tolerando, casi siempre, cuando superan los dos o tres años. Pero a partir de los dos años, la lista de alimentos

alergénicos se amplía: pescado, legumbres, frutos secos, frutas y mariscos son los que más frecuentes causan problemas.

No existen datos sobre la prevalencia exacta pero, según los resultados de diferentes estudios, los mariscos son los causantes del 2,8 al 8% de la alergia alimentaria<sup>104-106</sup>. La prevalencia es mayor en las regiones costeras con alto consumo. Castillo encuentra, en la población de Canarias, una prevalencia del 0,7%<sup>107</sup>. En EEUU son considerados la principal causa de alergia a los alimentos en el adulto: el 2% de la población general refiere padecer alergia al marisco (0,5% en menores de 18 años, 2,5% en los adultos)<sup>108,109</sup>. En Sudáfrica estos alimentos provocan el 80% de las reacciones por alimentos de origen marino y, en Asia son también causa frecuente de alergia a alimentos. En general se trata de una alergia persistente y frecuente causa de anafilaxia<sup>110</sup>

La prevalencia de la alergia al marisco es mayor entre la población adulta que en la infantil<sup>111</sup>, hecho que se corrobora en nuestro estudio. De hecho el perfil del paciente que acude por primera vez a un Servicio de alergia por sospecha de alergia a marisco es una mujer de 29 a 39 años, con urticaria.

Los crustáceos y los moluscos son una causa frecuente de reacciones alérgicas. El alérgeno mayor identificado en los langostinos y gambas (shrimp) es una proteína muscular llamada tropomiosina. Al menos el 80% de los pacientes alérgicos a los langostinos y gambas (shrimp) reaccionan frente a la tropomiosina. No obstante, la tropomiosina es un importante alérgeno en otros crustáceos como langosta, cangrejos y moluscos, así como otros artrópodos como los ácaros del polvo, y las cucarachas se han relacionado como causas de reactividad cruzada entre invertebrados. Este porcentaje es algo más

elevado en nuestra muestra, ya que suponen un 90% de los pacientes o dicho de otro modo, solo el 10% presentaron pruebas cutáneas positivas frente a diferentes crustáceos y negativas a ácaros.

En un estudio publicado en el año 2002 (Ayuso et al) ya se menciona que la alergenicidad está relacionada con la estructura proteica<sup>56</sup>. Posteriormente, un estudio publicado en el año 2005 (Zhen-sing et al) realizado en China, pone de manifiesto que los alérgenos de langostinos purificados y sometidos a ultrasonidos de alta intensidad durante 30 a 180 minutos<sup>112</sup>, podían reducir la alergenicidad de los mismos. Este efecto era producido por la modificación de la estructura proteica. Por tanto, es lógico pensar que la estructura proteica de diferentes especies de crustáceos no son idénticas entre sí al 100%, lo que justificaría que la IgE de los pacientes reconocieran a algunas especies y no a otras.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en esta tesis no son comparables a otros estudios descritos en la bibliografía por varios motivos. El primero, en la bibliografía, la mayoría de los estudios compara una única especie de crustáceo contra diferentes sueros de pacientes. Sólo hay un estudio realizado por Morgan en 1989 que compare dos diferentes especies de crustáceos *Panaeus setifecus* (langostino blanco) y *Panaeus aztecus* (langostino marrón) en 31 pacientes con antecedentes de reacciones de hipersensibilidad inmediata tras la ingesta de marisco<sup>67</sup>. Otro estudio que ha comparado diferentes variedades de un mismo alimento se realizó con manzanas<sup>15</sup> en el año 2006. En segundo lugar, los pacientes de este estudio han sido seleccionados y todos ellos tienen unas características comunes específicas y poco frecuentes entre la población. Estas características son que ningún paciente es atópico, todos ellos tienen pruebas cutáneas frente

a ácaros y Anisakis negativa, así como no presentan dermografismo. Cada uno de estos aspectos los iremos detallando a continuación. En nuestro estudio la proporción de la muestra que cumple estas 4 características es un 10%, es decir, que sólo un 10% de todos los pacientes que acudieron al Servicio de Alergología del Hospital Santiago Apóstol de Vitoria por alergia a marisco, podrían tolerar algunas especies de crustáceos.

Para evitar posibles sesgos, se decidió excluir de la muestra a todos los pacientes atópicos, ya que los resultados en la bibliografía son algo contradictorios, por ejemplo, Thursday en el año 2004, no encuentra diferencias en los alérgenos implicados entre los atópicos y los que no lo son, pero encuentra, un grupo de pacientes con anafilaxia que reconoce una única banda de 40 Kda<sup>113</sup>. Por el contrario, Waring en el año 1985 describe que los niveles de IgE específica frente al marisco son más elevados en los pacientes atópicos<sup>11</sup>.

En cuanto a los pacientes que presentan sensibilización a los ácaros, los alérgenos Der p 10 y Der f 10 de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *farinae* respectivamente, son tropomiosinas con una gran homología estructural entre sí. De hecho, en un estudio publicado en 1996 por Van Ree, se comprueba que la inmunoterapia con *D. pteronyssinus* puede inducir anticuerpos IgE frente a gamba y caracol<sup>114</sup>, mientras en otros casos puede actuar como factor protector de dicha sensibilización alimentaria<sup>115</sup>. Fernandes en el año 2003, demuestra que una población judía ortodoxa, cuyas leyes les prohíben comer marisco, está sensibilizada a langostinos, por lo que obviamente, dichos pacientes no habían sido expuestos previamente<sup>3</sup>.

En cuanto a la hipersensibilidad a Anisakis, siguiendo el ciclo biológico los huevos del parásito, no embrionados, acceden al agua de mar envueltos en las heces y en este medio tiene lugar su desarrollo embrionario que necesita 2 mudas (L1 a L2 y L2 a L3), las cuales se producen dentro del huevo y, ya en forma L3, se liberan al medio después de la eclosión. Para que el ciclo continúe han de ser ingeridas por un hospedador intermedio, bien directamente (en el caso de eufásidos, un tipo de pequeños crustáceos) o indirectamente a través de un copépodo que actúa como un hospedador de transporte que sirven como alimento a los crustáceos. En los crustáceos, las L3 pierden su vaina cuticular y completan su desarrollo en el hemocele. Por tanto, para evitar posibles factores de confusión se decide realizar prick test con Anisakis y se excluye de la muestra.

Por último, el dermatografismo, tiene como resultado que todas las pruebas cutáneas sean positivas y actúa como factor de confusión.

Al final del apartado de resultados, se relaciona las pruebas in vitro (bandas proteicas reconocidas por el suero y SDS) e in vivo (pruebas cutáneas) de cada uno de los pacientes, obteniéndose multitud de variables y resultados. Se intentó por todos los medios realizar una estadística para obtener algún resultado, incluso se solicitó consejo en el Departamento de Bioestadística de la Facultad de Medicina, donde tras su colaboración inestimable fue imposible realizarla ya que las variables no son comparables. Este estudio es meramente descriptivo y hace referencia a distintas especies de crustáceos, aunque puede ser el inicio de un campo muy interesante de diagnóstico de alergia a variedades o especies de alimentos.

Este estudio quiere aportar nuevas perspectivas de la alergia a

crustáceos que han sido poco prodigas en la bibliografía, como son la potencial alergenicidad de las cabezas de los crustáceos, el diagnóstico más preciso de un 10% de los pacientes que acuden a consulta por alergia a marisco y que no presentan alergia a la tropomiosina. En estos pacientes hay datos que son comunes a todos, como son la baja concordancia entre las pruebas in vivo (prick test) e in vitro (IgE específica), así como la presencia de una banda proteica muy frecuente en la mayoría de los inmunoblotting con un peso molecular de 30 Kda, que no ha sido identificada.

Tras una búsqueda exhaustiva en la bibliografía no hemos encontrado artículos que comparen la alergenicidad de los cuerpos con los de las cabezas de crustáceos. En la todos los artículos se hace referencia exclusivamente al cuerpo donde reside la tropomiosina. En nuestro estudio, y tras analizar las pruebas cutáneas en prick by prick, llegamos a la conclusión que las cabezas de los langostinos son más alergénicas que los cuerpos ya que las primeras han resultado positivas en más ocasiones. De hecho, se realizaron un total de 130 prick by prick, de éstas resultaron positivas 73 pruebas cutáneas para las cabezas (56%), frente a un total de 63 para los cuerpos (48%).

Lehrer en 1992, describe que las pruebas cutáneas muestran una buena correlación con las manifestaciones clínicas<sup>116</sup>. Sin embargo, no existe tan buena correlación con las pruebas in vitro como la determinación de IgE específica sérica, técnica usada habitualmente en la práctica clínica para ayudar a confirmar y cuantificar la sensibilización a un determinado marisco. Daul en 1993, demostró que en los pacientes alérgicos a crustáceos la IgE específica se elevaba en más del 75% de los casos<sup>10</sup>. En nuestro estudio existe una mala correlación clínica entre las pruebas de alergia in vitro, mediante la determinación de IgE específica y

las pruebas cutáneas in vivo (prick test). Si comparamos las pruebas in vivo e in vitro, las pruebas in vivo se aproximan mucho más a la realidad que las pruebas in vitro. Este hecho se justifica porque la IgE solicitada en los casos de alergia al marisco son IgE específicas frente a camarón (F24) y langosta (F80), que presentan el alérgeno mayor: la tropomiosina, pero en los alérgenos menores pueden existir diferencias.

No se ha establecido un valor umbral de sensibilización en cuanto a la expresividad clínica, pero algunos autores como por ejemplo Crespo en el año 1994, la han relacionado con valores superiores a 17,5 PRU/L<sup>117</sup>.

En cuanto al inmunoblotting y al SDS page en el que se detectan proteínas que posteriormente algunas de ellas serán fijadas por el suero de los pacientes, decir que el marisco contiene una gran cantidad de proteínas, aunque sólo unas pocas son alergénicas. La tropomiosina, con un peso molecular de 38-41 Kda, es el alérgeno mayoritario de los mariscos, muestra una gran homología en la secuencia de sus aminoácidos y algunos de sus epitopos han sido caracterizados<sup>118</sup>. Recientemente, se han identificado, clonado y aislado otro alérgeno, con actividad arginina cinasa, con un peso molecular de 40 Kda, que es reconocido por el 27% de un grupo de pacientes alérgicos a la gamba<sup>64</sup>. La gamba es el marisco mejor estudiado desde el punto de vista alérgico. Cualitativamente, las bandas proteicas de los extractos crudos y cocidos de gambas, y del agua de cocción son muy similares<sup>30</sup>. El rendimiento de los extractos de marisco cocido para diagnóstico es mejor, quizás en relación con que los alérgenos son proteínas muy termoestables, y a que el calor produzca cambios estructurales que den lugar a un aumento de la exposición de los epitopos de unión a la inmunoglobulina IgE<sup>103</sup>.

En nuestro estudio las bandas proteicas con un peso molecular de 20 y 30 Kd, son las que más veces han sido detectadas por el suero de los pacientes de la muestra, que no coincide ni con la tropomiosina, cuyo peso molecular es de 38-41 Kda, ni con la proteína con actividad arginina cinasa, con un peso molecular de 40 Kda. Siendo la más frecuente la banda proteica de 30 Kda.

Es lógico pensar que el marisco es un alimento perecedero y como tal, precisa de productos químicos para su conservación pero que éstos no deben modificar las características organolépticas del producto. Todos estos conservantes, estabilizantes y antioxidantes están legislados y se han demostrado que son muy seguros, ya que es preciso aumentar hasta 100 veces la cantidad de ingesta diaria admisible (IDA) para producir algún daño para la salud. Los estudios realizados con sulfitos demuestran que todas las reacciones alérgicas son de tipo retardado.

Actualmente se está relacionando la sintomatología alérgica con graves problemas de salud. James Bower, neurólogo de la Clínica Mayo, relaciona la rinitis alérgica con el riesgo de padecer posteriormente la enfermedad de Parkinson, llegándose a la conclusión que esta relación se incrementa hasta 3 veces. Por otra parte, el avance en las técnicas de diagnóstico por la imagen pone de manifiesto nuevos avances médicos, pero también pone de manifiesto nuevos problemas alérgicos. De hecho en un estudio realizado en 2003 (Schlifke et al) indica que el tener alergia a marisco es la única contraindicación para la administración de medios de contraste iónico <sup>119</sup>. Por otra parte, en la investigación PARSIFAL, publicado en *Pediatrics* en marzo del 2009, revela que los procesos infecciosos protegen a los niños de las enfermedades alérgicas, como así lo demuestra el estudio realizado a 12.540 niños de 5 a 13 años criados en granjas, con estilos de vida menos ligados al uso de antibióticos,

medicinas para tratar la fiebre y vacunas. En este estudio se concluye que los niños no vacunados que habían desarrollado naturalmente la infección del sarampión, eran menos propensos a las enfermedades alérgicas y en concreto a rinitis. En septiembre de 2008 (Di Felice) hace referencia que el uso de bacterias probióticas podrían ser usadas como prevención y tratamiento de las enfermedades alérgicas<sup>120</sup>.

Para concluir, quisiera recalcar que la hipersensibilidad a crustáceos es un fenómeno más complejo de lo que tradicionalmente se ha considerado. El hecho de que no todos los pacientes alérgicos a los crustáceos son sensibles al alergeno principal, la tropomiosina, debe ser tenido en cuenta por los alergólogos a la hora de evaluar estos procesos. Espero que estos hallazgos contribuyan a diagnosticar mejor a los pacientes alérgicos al marisco. El reto futuro se centra en el estudio biomolecular de la banda proteica de 30 Kd que detecta la IgE de nuestros pacientes en los extractos de las diversas especies de crustáceos estudiados.



## **VIII.CONCLUSIONES**

---



## VIII. CONCLUSIONES

1. El rango de edad por el que se acude a un Servicio de alergia por sospecha de alergia alimentaria por marisco está entre 30 y 39 años, con una mayor proporción de mujeres que de hombres.
2. Para establecer la posibilidad de una tolerancia selectiva a algunas especies de crustáceos, los pacientes deben cumplir previamente los siguientes requisitos:
  - a. No sean atópicos,
  - b. Prick test a Anisakis: Negativo
  - c. Prick test con la batería de ácaros<sup>(nota)</sup>: Negativa.

**Nota:** Este último requisito hace referencia a que sólo en los casos en los que dichas pruebas fueran negativas indicaría que el paciente NO está sensibilizado a la tropomiosina, proteína muscular presente en todos los crustáceos, algunos bivalvos y gasterópodos.

3. Las proteínas contenidas en los cuerpos de los crustáceos ofrecen una respuesta cutánea más intensa que las contenidas en la cabeza.
4. La sensibilización a las cabezas de los crustáceos (56,93%) son más frecuentes que a la de los cuerpos (48,46%), por lo que para evitar cualquier tipo de reacción alérgica, independientemente de la intensidad de la clínica que produzca, sería más aconsejable evitar el contacto o la ingesta de las cabezas de los crustáceos, que los cuerpos de éstos.

5. En los pacientes estudiados, los crustáceos del género *Penaeus* son los menos alergénicos y por tanto los que podrían producir menos probabilidad de sensibilización. Por el contrario, el *Parapenaeus longirostris* es el más alergénico y el que potencialmente puede producir reacciones alérgicas más severas en estos pacientes.
6. No existe una buena correlación entre los resultados obtenidos con la IgE específica in vitro (CAP) y los resultados obtenidos in vivo. Los resultados in vivo son mucho más fidedignos y presentan pruebas de mayor intensidad que las pruebas in vitro.
7. Los pesos moleculares de las bandas proteicas que reconocen los pacientes son diferentes entre sí, aunque todos están por debajo de 80 Kda. No se ha encontrado ninguna banda de alto peso molecular que haya sido reconocida por el suero de los pacientes.
8. Si un paciente reconoce una banda proteica de un determinado peso molecular, no reacciona a todas las especies que contengan dicha banda proteica, por lo que son necesarios otros factores asociados para desencadenar una reacción alérgica.

## **IX.BIBLIOGRAFIA**

---



**IX. BIBLIOGRAFIA:**

1. Torres Borrego J, Martínez Cuevas JF, Tejero García J. Cross reactivity between fish and shellfish. *Allergol Immunopathol* 2003;31:146-51. Review. Spanish.
2. Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Shellfish hypersensitivity: Clinical and immunological characteristics. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1994;22:83-7.
3. Fernandes J, Reshef 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;33:956-61.
4. Leung PSC, Chu KH. Molecular and immunological characterization of shellfish allergens. *Front Biosci* 1998;3:d306-12.
5. Martínez A, Martínez J, Palacios R, Panzani R. Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts. *Allergol. Immunopathol* 1997;25:118-26.
6. Asturias JA, Eraso E, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Inácio F, Martínez A. Cloning, isolation, and IgE-binding properties of *Helix aspersa* (brown garden snail) tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:90-6.
7. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, 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;104:329-37.

8. 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 Clin Immunol* 1994;105:49-55.
9. Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:882-90.
10. Daul CB, Morgan JE, Lehrer SB. Hypersensitivity reactions to crustacea and mollusks. *Clin Rev Allergy* 1993;11:201-22.
11. Waring NP, Daul CB, Deshazo RD, McCants ML, Lehrer SB. Hypersensitivity reactions to ingested crustacea: clinical evaluation and diagnostic studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:440-5.
12. Daul CB, Morgan JE, Waring NP, McCants ML, Hughes J, Lehrer SB. Immunologic evaluation of shrimp allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:716-22.
13. Hoffman DR, Day ED Jr, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 1981;47:17-22.
14. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *J Immunol* 1993;151:5354-63.
15. Carnés J, Ferrer A, Fernández-Caldas E. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:564-70.

16. American College of Allergy, Asthma, & Immunology. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:S1-68.
17. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Björkstén B, Moneret-Vautrin D, et al. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy* 1995;50:623-35.
18. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-6.
19. Fritsch R, Bohle B, Vollmann U, Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Krebitz M, et al. Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:679-86.
20. Scheiner O, Aberer W, Ebner C, Ferreira F, Hoffmann-Sommergruber K, Hsieh LS, et al. Cross-reacting allergens in tree pollen and pollen-related food allergy: implications for diagnosis of specific IgE. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:105-8.
21. Iikura Y, Imai Y, Imai T, Akasawa A, Fujita K, Hoshiyama K, et al. Frequency of immediate-type food allergy in children in Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:251-2.
22. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:99-107.

23. Bellanti JA, Zeligs BJ, Malka-Rais J, Sabra A. Abnormalities of Th1 function in non-IgE food allergy, celiac disease, and ileal lymphonodular hyperplasia: a new relationship?. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;90:84-9.
24. Kokkonen J, Karttunen TJ. Lymphonodular hyperplasia on the mucosa of the lower gastrointestinal tract in children: an indication of enhanced immune response? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:42-6.
25. Bellanti JA, Sabra A, Zeligs BJ. Gastrointestinal immunopathology and food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:S26-32.
26. Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Ians-Mills TAE. Allergen nomenclature. *Bull WHO* 1986;64:767-70
27. Greene WK, Cyster JG, Chua KY, O'Brien RM, Thomas WR. IgE and IgG binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen Der p I. *J Immunol* 1991;147:3768-73.
28. Lin RY, Shen HD, Han SH. Identification and characterization of a 30 kd major allergen from *Parapenaeus fissurus*. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:837-45.
29. Nagpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Rao PV. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus Indicus*). *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:26-36.
30. Lehrer SB, Ibañez MD, McCants ML, Daul CB, Morgan JE. Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:1.005-13.

31. Pascual C, Martín Esteban M, Crespo JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr* 1992;121:S29-34.
32. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm RM. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:962-9.
33. Lahti A, Björkstén F, Hannuksela M. Allergy to birch pollen and apple, and cross-reactivity of the allergens studied with the RAST. *Allergy* 1980;35:297-300.
34. Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy* 1982;37:437-43.
35. Halmepuro L, Vuontela K, Kalimo K, Björkstén F. Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;74:235-40.
36. Enberg RN, Leickly FE, McCullough J, Bailey J, Ownby DR. Watermelon and ragweed share allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:867-75.
37. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992;175:377-85.
38. Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics* 2003;111:1609-16.

39. Reese G, Jeung BJ, Daul CB, Lehrer SB. Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:240-2.
40. Lin RY, Shen HD, Han SH. Identification and characterization of a 30 Kd major allergen from *Parapenaeus fissurus*. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:837-45.
41. Maulitz RM, Pratt DS, Schocket AL. Exercise-induced anaphylactic reaction to shellfish. *J Allergy Clin Immunol* 1979;63:433-4.
42. Halmepuro L, Salvaggio JE, Lehrer SB. Crawfish and lobster allergens: identification and structural similarities with other crustacea. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;84:165-72.
43. Lehrer SB, McCants ML, Salvaggio JE. Identification of crustacea allergens by crossed radioimmuno-electrophoresis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77:192-4.
44. Carlston JA. Injection immunotherapy trial in inhalant food allergy. *Ann Allergy* 1988;61:80-82.
45. Morgan JE, Daul CB, Lehrer SB. The relationships among shrimp-specific IgG subclass antibodies and immediate adverse reactions to shrimp challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:387-92.
46. Morgan JE, O'Neil CE, Daul CB, Lehrer SB. Species-specific shrimp allergens: RAST and RAST-inhibition studies. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:1112-7.

47. Nagano T, Kanao K, Sugai T. Allergic contact urticaria caused by raw prawns and shrimps: three cases. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:489-93.
48. Kavli G, Gram IT, Moseng D, Orpen G. Occupational dermatitis in shrimp peelers. *Contact Dermatitis* 1985;13:69-71.
49. Crespo JF, Pascual C, Helm R, Sánchez-Pastor S, Ojeda I, Romualdo L, et al. Cross-reactivity of IgE-binding components between boiled Atlantic shrimp and German cockroach. *Allergy* 1995;50:918-24.
50. 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.
51. Daul CB, Morgan JE, Lehrer SB. The natural history of shrimp hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:88-93.
52. Reese G, Tracey D, Daul CB, Lehrer SB. IgE and monoclonal antibody reactivities to the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) and vertebrate tropomyosins. *Adv Exp Med Biol* 1996;409:225-30.
53. Reese G, Daul CB, Lehrer SB. Antigenic analysis (IgE and monoclonal antibodies) of the major shrimp allergen Pen a 1 (Tropomyosin) from *Penaeus aztecus*. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:245-7.
54. Liebers V, Sander I, Van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Baur X. Overview on denominated allergens. *Clin Exp Allergy* 1996;26:494-516.

55. McSharry C, Anderson K, McKay IC, Colloff MJ, Feyerabend C, Wilson RB, 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;97:499-504.
56. Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:27-37.
57. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119:247-58.
58. 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;7:12-20.
59. Leung PS, Chen YC, Gershwin ME, Wong SH, Kwan HS, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatius* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:847-52.
60. Leung PS, Chow WK, Duffey S, Kwan HS, Gershwin ME, Chu KH. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:954-61.
61. 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;129:38-48.

62. Martínez A, Martínez J, Palacios R, Panzani R. Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts. *Allergol Immunopathol* 1997;25:118-26.
63. Pascual CY, Crespo JF, San Martin S, Ornia N, Ortega N, Caballero T, et al. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy* 1997;52:514-20.
64. Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003;170:445-53.
65. Arruda LK, Chapman MD. The role of cockroach allergens in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2001;7:14-9.
66. Helm RM, Pomés A. Cockroach and other inhalant insect allergens. *Clin Allergy Immunol* 2004;18:271-96.
67. Alonso A, Albónico JF, Rodríguez SM, Mouchián K, Marino GA, Scavini LM. Cross reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996; 6: 301-6.
68. Eriksson NE, Ryden B, Jonsson P. Hypersensitivity to larvae of chironomids (non-biting midges). Cross-sensitization with crustaceans. *Allergy* 1989;44:305-13.
69. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol* 2003;5:339-48.

70. Asturias JA, Gómez-Bayón N, Arilla MC, Martínez A, Palacios R, Sanchez-Gascón F, et al. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *J Immunol* 1999;162:4342-8.
71. Pajno GB, La Grutta S, Barberio G, Canonica GW, Passalacqua G. Harmful effect of immunotherapy in children with combined snail and mite allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:627-9.
72. Meglio P, Plantamura M, Arabito E, Falagiani P, Torre A, Rossi P. Does SIT to Der p protect from snail sensitization? *Allergy* 2002;57:868-9.
73. 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;137:62-5.
74. Graham DT, Wolf S, Wolff HG. Changes in tissue sensitivity associated with varying life situations and emotions; their relevance to allergy. *J Allergy* 1950;21:478-86.
75. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988;61:47-52.
76. Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics* 2003;111:1609-16.
77. Sampson HA, Anderson JA. Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:S87-94.

78. James JM, Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. Respiratory reactions provoked by double-blind food challenges in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:59-64.
79. Raphael G, Raphael MH, Kaliner M. Gustatory rhinitis: a syndrome of food-induced rhinorrhea. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:110-5.
80. Novembre E, de Martino M, Vierucci A. Foods and respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:1059-65.
81. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992;327:380-4.
82. Gaddie J, Legge JS, Friend JA, Reid TM. Pulmonary hypersensitivity in prawn workers. *Lancet* 1980;2:1350-3.
83. Lehrer SB, Ibanez MD, McCants ML, Daul CB, Morgan JE. Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:1005-13.
84. Carino M, Elia G, Molinini R, Nuzzaco A, Ambrosi L. Shrimp-meal asthma in the aquaculture industry. *Med Lav* 1985;76:471-5.
85. Cartier A, Malo JL, Forest F, Lafrance M, Pineau L, St-Aubin JJ, et al. Occupational asthma in snow crab-processing workers. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:261-9.
86. Jyo T, Komoto K, Tsuboi S, Katsutani T, Otsuka T. Seasquirt asthma -- occupational asthma induced by inhalation of antigenic substances contained in seasquirt body fluid. *Allerg Immunol (Leipz)* 1974-1975;20-21:435-48.

87. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56:813-24.
88. Brown AF, McKinnon D, Chu K. Emergency department anaphylaxis: A review of 142 patients in a single year. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:861-6.
89. Sampson HA. Fatal food-induced anaphylaxis. *Allergy* 1998;53:125-30.
90. Yocum MW, Khan DA. Assessment of patients who have experienced anaphylaxis: a 3-year survey. *Mayo Clin Proc* 1994;69:16-23.
91. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Morisset M, Rancé F, Fardeau MF, Beaudouin E. Severe food anaphylaxis: 107 cases registered in 2002 by the Allergy Vigilance Network. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2004;36:46-51.
92. Wood RA. Food manufacturing and the allergic consumer: accidents waiting to happen. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:920-2.
93. Huggett AC, Hischenhuber C. Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy* 1998;53:S89-92.
94. Moreno Escobosa MC, Alonso Lebrero E, Sánchez Alonso A, Méndez Alcalde J, Rico Díaz A, García Álvarez G, et al. Barnacle hypersensitivity. *Allergol Immunopathol* 2002;30:100-3.

95. Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, Reese G, Daul CB, Lehrer SB, et al. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:948-53.
96. Lopata AL, Zinn C, Potter PC. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal-m-1) in abalone (*Haliotis midae*). *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:642-8.
97. Vázquez-Cortés S, Robledo Echarren T, Bartolomé B, García-Rubio I, González Gutiérrez ML, Martínez-Cócerca C. Anaphylaxis after carrying out prick tests. *An Med Interna* 2007;24:72-4.
98. Valyasevi M, Maddox DE, Li JT. Systemic reactions to allergy skin test. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:132-6.
99. Novembre E, Bernardini R, Bertini G, Massai G, Vierucci A. Skin-prick-test-induced anaphylaxis. *Allergy* 1995;50:511-3.
100. Devenney I, Fälth-Magnusson K. Skin prick test may give generalized allergic reactions in infants. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:457-60.
101. Palacios Benito R, Álvarez-Lovel MC, Martínez-Cócerca C, del Castillo Payá MM, Romanillos RA. Allergy to meat. *Allergy* 2002;57:858-9.
102. Daul CB, Morgan JE, Hughes J, Lehrer SB. Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:1180-6.

103. Musmand JJ, Daul CB, Lehrer SB. Crustacea allergy. *Clin Exp Allergy* 1993;23:722-32.
104. Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet* 1994;343:1127-30.
105. Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T, et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy* 2004;59:338-45.
106. Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:133-40.
107. Castillo R, Delgado J, Quiralte J, Blanco C, Carrillo T. Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol* 1996;24:93-7.
108. Pongracic JA. Update on food allergy. *Pediatr Ann* 2008;37:516-7.
109. 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;114:159-65.
110. Bohlke K, Davis RL, DeStefano F, Marcy SM, Braun MM, Thompson RS, et al. Epidemiology of anaphylaxis among children and adolescents enrolled in a health maintenance organization. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:536-42.
111. Pascual CY, Crespo JF, Perez PG, Esteban MM. Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:S75-8.

112. Li ZX, Lin H, Cao LM, Jameel K. Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7:251-6.
113. Samson KT, Chen FH, Miura K, Odajima Y, Iikura Y, Rivas MN, 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;133:225-32.
114. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996;51:108-13.
115. Petrus M, Nyunga M, Causse E, Chung E, Cossarizza G. Allergy to squid and acari in a child. *Arch Pediatr* 1999;6:1075-6.
116. Lehrer S, Helbling A, Daul C. Seafood allergy: prevalence and treatment. *J Food Safety* 1992;13:61-76.
117. Crespo JF, Pascual C, García MC, Sánchez S, Martín M. Relación entre el grado de sensibilización IgE específica a alérgenos alimentarios y la aparición de manifestaciones clínicas. *Allergol Immunopathol* 1994;22:269-74.
118. Subba Rao PV, Rajagopal D, Ganesh KA. B- and T-cell epitopes of tropomyosin, the major shrimp allergen. *Allergy* 1998;53:S44-7.
119. Schlifke A, Geiderman JM. Seafood allergy is a specific and unique contraindication to the administration of ionic contrast media. *CJEM* 2003;5:166-8.

120. Di Felice G, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, Tinghino R, Colombo P, et al. Use of probiotic bacteria for prevention and therapy of allergic diseases: studies in mouse model of allergic sensitization. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:S130-2.

## **X.ANEXOS**

---



## ANEXO I

Type		Name	Source	Last Update	Code
1		<b>Art fr 1</b>	Animals, <i>Artemia franciscana</i> , <i>Artemia sanfranciscana</i> , <i>Artemiidae</i> , Brine Shrimp, Crustaceans, San Francisco Brine Shrimp	2009-01-31	4157
2		<b>Art fr 5</b>	Animals, <i>Artemia franciscana</i> , <i>Artemia sanfranciscana</i> , <i>Artemiidae</i> , Brine Shrimp, Crustaceans, San Francisco Brine Shrimp	2009-01-31	6075
3		<b>Cap e 37Kd</b>	Animals, <i>Caprella equilibra</i> , <i>Caprella equilibria</i> , <i>Caprellidae</i> , Crustaceans, Skeleton Shrimp	2007-08-16	3887
4		<b>Cra c 1</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	1426
5		<b>Cra c 2</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	6078
6		<b>Cra c 4</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	6080
7		<b>Cra c 5</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	6082
8		<b>Cra c 6</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	6084
9		<b>Cra c 8</b>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , <i>Crangonidae</i> , Crustaceans	2009-01-31	6086
10		<b>Lit v 1</b>	Animals, Crustaceans, European White Shrimp, <i>Litopenaeus Vannamei</i> , Pacific White Shrimp, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus vanameii</i> , <i>Penaeus Vannamei</i> , <i>Penaeus Vannameii</i> , Penoeid Shrimp	2008-09-01	4029
11		<b>Lit v 2</b>	Animals, Crustaceans, European White Shrimp, <i>Litopenaeus Vannamei</i> , Pacific White Shrimp, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus vanameii</i> , <i>Penaeus Vannamei</i> , <i>Penaeus Vannameii</i> , Penoeid Shrimp	2009-01-26	3544
12		<b>Lit v 3</b>	Animals, Crustaceans, European White Shrimp, <i>Litopenaeus Vannamei</i> , Pacific White Shrimp, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus vanameii</i> , <i>Penaeus Vannamei</i> , <i>Penaeus Vannameii</i> , Penoeid Shrimp	2008-09-01	4052
13		<b>Lit v 4</b>	Animals, Crustaceans, European White Shrimp, <i>Litopenaeus Vannamei</i> , Pacific White Shrimp, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus vanameii</i> , <i>Penaeus Vannamei</i> , <i>Penaeus Vannameii</i> , Penoeid Shrimp	2009-01-31	6092
14		<b>Met e 1</b>	Animals, Crustaceans, Greasyback shrimp, <i>MetaPenaeus ensis</i> , <i>Penaeidae</i> , Sand shrimp, Shrimp	2008-12-29	477

15	<b>Met e 2</b>	Animals, Crustaceans, Greasyback shrimp, <i>MetaPenaeus ensis</i> , <i>Penaeidae</i> , Sand shrimp, Shrimp	2009-01-26	793
16	<b>Met j 2</b>	Animals, Crustaceans, <i>MetaPenaeus joyneri</i> , <i>Parapenaeus joyneri</i> , <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeopsis joyneri</i> , <i>Penaeus joyneri</i> , <i>Penaeus pallidus</i> , Shiba shrimp	2009-01-26	3636
17	<b>Pan b 1</b>	Animals, Crustaceans, Northern Red Shrimp, <i>Pandalidae</i> , <i>Pandalus borealis</i>	2007-09-02	1277
18	<b>Pan e 1</b>	Alaskan Pink Shrimp, Animals, Crustaceans, Northern Pink Shrimp, <i>Pandalidae</i> , <i>Pandalus borealis eous</i> , <i>Pandalus eous</i>	2008-06-28	3810
19	<b>Pan e 4</b>	Alaskan Pink Shrimp, Animals, Crustaceans, Northern Pink Shrimp, <i>Pandalidae</i> , <i>Pandalus borealis eous</i> , <i>Pandalus eous</i>	2009-01-31	4049
20	<b>Par f 1</b>	Animals, Crustaceans, <i>Parapenaeus fissurus</i> , <i>Penaeidae</i> , Shrimp, Taiwan Shrimp	2007-07-07	501
21	<b>Pen a 1</b>	Animals, Brown Shrimp, Crustaceans, <i>FarfantePenaeus aztecus</i> , <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus aztecus</i>	2009-01-11	515
22	<b>Pen i 1</b>	Animals, Crustaceans, <i>FenneroPenaeus Indicus</i> , Indian Shrimp, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus Indicus</i>	2008-01-10	527
23	<b>Pen m 1</b>	Animals, Black Tiger Prawn, Black Tiger Shrimp, Crustaceans, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus monodon</i>	2008-06-28	972
24	<b>Pen m 2</b>	Animals, Black Tiger Prawn, Black Tiger Shrimp, Crustaceans, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus monodon</i>	2009-01-26	792
25	<b>Pen m 4</b>	Animals, Black Tiger Prawn, Black Tiger Shrimp, Crustaceans, <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus monodon</i>	2009-01-31	4046
26	<b>Pena o 1</b>	Animals, Crustaceans, <i>FenneroPenaeus orientalis</i> , <i>Penaeidae</i> , <i>Penaeus orientalis</i> , Shrimp	2008-03-23	528
27	<b>Squ o 1</b>	Animals, Crustaceans, Japanese Mantis Shrimp, <i>Squilla oratoria</i> , <i>Squillidae</i>	2007-07-05	3800

## ANEXO II: Reactividad cruzada

Puede apreciarse en la siguiente Tabla la reactividad cruzada entre la tropomiosina y otros alérgenos obtenidos de la página web [www.allergome.org](http://www.allergome.org)

Type	Name	Source	Last Update	CODE
1	<a href="#">Ale o 10</a>	<i>Aleuroglyphus ovatus</i> , Animals, Brown Legged Grain Mite, Mites	2007-12-22	3983
2	 <a href="#">Ani s 3</a>	Animals, <i>Anisakis simplex</i> , Parasites, Worm	2008-01-02	37
3	<a href="#">Arg i 1</a>	<i>Aequipecten irradians</i> , Animals, <i>Argopecten irradians</i> , Atlantic Bay Scallop, Mollusks	2007-12-22	3984
4	<a href="#">Bal r 1</a>	Acorn Barnacle, Animals, <i>Balanus rostratus</i> , Mollusks	2007-07-01	3757
5	<a href="#">Bla g 7</a>	Animals, <i>Blattella germanica</i> , Cockroaches, German Cockroach, Insects	2007-09-09	1182
6	<a href="#">Bla o 7</a>	Animals, <i>Blatta orientalis</i> , <i>Blattella orientalis</i> , Insects, Oriental Cockroach	2007-07-01	1026
7	<a href="#">Blo t 10</a>	Animals, <i>Blomia Chilensis</i> ,s Mites	2008-01-04	147
8	<a href="#">Can p 1</a>	Animals, <i>Cancer pagurus</i> , Crab, Crustaceans, Rock Crab	2007-09-02	2130
9	<a href="#">Cape 37Kd</a>	Animals, <i>Caprella equilibra</i> , <i>Caprella equilibria</i> , Crustaceans, Skeleton Shrimp	2007-08-16	3887
10	 <a href="#">Cha f 1</a>	Animals, <i>Charybdis feriatus</i> , Crab, Crustaceans	2008-01-02	196
11	<a href="#">Chi k 10</a>	Animals, <i>Chironomus kiiensis</i> , Insects, Midge	2007-07-07	200
12	<a href="#">Chi o 1</a>	Animals, <i>Chionoecetes opilio</i> , Crab-beetle, Crustaceans, Snow Crab	2007-07-07	3807
13	<a href="#">Chl n 1</a>	Animals, <i>Chlamys nipponensis</i> , Japanese Scallop, Mollusks	2007-07-07	3786
14	<a href="#">Cra c 1</a>	Animals, Common Shrimp, <i>Crangon crangon</i> , Crustaceans	2007-07-07	1426
15	 <a href="#">Cra g 1</a>	Animals, <i>Crassostrea gigas</i> , Mollusks, Oyster, Pacific Oyster	2008-01-02	247
16	 <a href="#">Der f 10</a>	Animals, <i>Dermatophagoides farinae</i> , House Dust Mite, Mites	2008-01-04	296
17	<a href="#">Der g 10</a>	Animals, <i>Dermanyssus gallinae</i> , Mites, Poultry Red Mite	2007-07-01	2855
18	<a href="#">Der p 10</a>	Animals, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , House Dust Mite, Mites	2008-01-04	311
19	<a href="#">Dro m 7</a>	Animals, <i>Drosophila melanogaster</i> , Fruit Fly, Insects	2007-07-07	1517
20	<a href="#">Ent d 1</a>	Animals, <i>Enteroctopus dofleini</i> , Giant Octopus, Mollusks, <i>Octopus</i>	2007-07-01	3787

		<i>dofleini</i> , <i>Octopus dofleini apollyon</i> , <i>Octopus dofleini dofleini</i> , <i>Octopus dofleini martini</i> , <i>Octopus gilbertianus</i> , <i>Octopus punctatus</i> , Pacific Giant Octopus, <i>Paroctopus asper</i> , <i>Paroctopus dofleini</i> , <i>Polypus apollyon</i> , <i>Polypus dofleini</i> , <i>Polypus gilbertianus</i>		
21	 <a href="#">Eri i 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Erimacrus isenbeckii</i> , Hair Crab, Horshair Crab	2007-07-07	3808
22	 <a href="#">Eri s 1</a>	Animals, Chinese Mitten Crab, Crustaceans, <i>Eriocheir hilenis</i> , <i>Eriocheir japonica sinensis</i> , <i>Eriocheir sinensis</i>	2007-06-02	3759
23	 <a href="#">Eup p 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Euphausia pacifica</i> , Pacific krill	2007-12-27	4001
24	 <a href="#">Eup s 1</a>	Animals, Antarctic Krill, Crustaceans, <i>Euphausia superba</i> , <i>Euphausia superba</i>	2007-12-27	3999
25	<a href="#">Gams 37Kd</a>	Animals, Crustaceans, <i>Gammarus spp</i>	2007-08-16	3886
26	<a href="#">Gly d 10</a>	Animals, <i>Glycyphagus domesticus</i> , Mites	2006-11-25	3031
27	<a href="#">Hal a 1</a>	Animals, Donkey's Ear Abalone, <i>Haliotis asinina</i> , Mollusks	2007-07-01	3798
28	 <a href="#">Hal d 1</a>	Abalone, Animals, <i>Haliotis diversicolor</i> , Mollusks	2008-01-02	822
29	<a href="#">Hal di 1</a>	Abalone, Animals, <i>Haliotis discus</i> , Japanese Abalone, Mollusks, <i>Nordotis discus</i>	2005-02-19	2494
30	<a href="#">Hal m 38Kd</a>	Abalone, Animals, <i>Haliotis midae</i> , Mollusks	2004-07-24	1408
31	<a href="#">Hal r 38Kd</a>	Abalone, Animals, <i>Haliotis rubra</i> , Mollusks	2004-07-24	1409
32	<a href="#">Hal ru 1</a>	Animals, <i>Haliotis rufescens</i> , Mollusks, Red Abalone	2007-07-07	3796
33	<a href="#">Hel ap 1</a>	Animals, Green Garden Snail, <i>Helix aperta</i> , Mollusks, Snails	2007-07-01	1425
34	 <a href="#">Hel as 1</a>	Animals, Brown Garden Snail, <i>Helix aspersa</i> , Mollusks, Snails	2008-01-02	378
35	<a href="#">Hem t 1</a>	Animals, <i>Hemifusus ternatana</i> , <i>Hemifusus ternatanus</i> , Mollusks, <i>Pugilina ternatana</i> , Whelk	2007-07-01	1518
36	 <a href="#">Hom a 1</a>	American Lobster, Animals, Crustaceans, <i>Homarus americanus</i>	2008-01-02	410
37	<a href="#">Hom g 1</a>	Animals, Crustaceans, European Lobster, <i>Homarus gammarus</i> , <i>Homarus vulgaris</i>	2007-07-01	2128
38	<a href="#">Lep d 10</a>	Animals, <i>Lepidoglyphus destructor</i> , Mites, Storage Mite	2008-01-04	437
39	<a href="#">Lep s 1</a>	Animals, Insects, <i>Lepisma saccharina</i> , Silverfish	2007-07-07	852
40	<a href="#">Lol b 1</a>	Animals, Bleeker's squid, <i>Loligo bleekeri</i> , Mollusks, Spear Squid	2007-07-01	3789
41	<a href="#">Lol e 1</a>	Animals, <i>Loligo edulis</i> , Mollusks, Squid, Swordtip Squid	2007-07-01	1519
42	<a href="#">Lut p 1</a>	Animals, Clam, <i>Lutraria philippinarum</i> , Mollusks	2007-07-01	1520
43	<a href="#">Mar j 1</a>	Animals, Crustaceans, Kuruma Prawn, <i>MarsuPenaeus japonicus</i> , <i>Penaeus canaliculatus japonicus</i> , <i>Penaeus japonicus</i> , Tiger Prawn	2007-07-07	3809
44	<a href="#">Mec e 7</a>	Animals, Grasshopper, Insects, <i>Mecopoda elongata</i>	2007-07-01	1521

45		<a href="#">Mel l 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Melicertus latisulcatus</i> , <i>Penaeus latisulcatus</i> , Western King Prawn	2006-03-18	2909
46		<a href="#">Met e 1</a>	Animals, Crustaceans, Greasyback shrimp, <i>MetaPenaeus ensis</i> , Sand shrimp, Shrimp	2008-01-02	477
47		<a href="#">Mim n 1</a>	Animals, <i>Mimachlamys nobilis</i> , Mollusks	2008-01-02	1296
48		<a href="#">Mvt e 1</a>	Animals, Blue Mussel, Mollusks, <i>Mytilus edulis</i>	2007-09-09	2131
49		<a href="#">Mvt g 1</a>	Animals, Black Mussel, Mediterranean Mussel, Mollusks, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2007-12-23	3790
50		<a href="#">Nep n 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Nephrops norvegicus</i> , Norway Lobster, Scampi	2007-09-02	3892
51		<a href="#">Oct f 1</a>	Animals, Gold-Spot Octopus, Mollusks, Ocellated Octopus, <i>Octopus fangsiao</i> , <i>Octopus ocellatus</i> , Short Leg Octopus	2007-07-01	3791
52		<a href="#">Oct l 1</a>	Animals, Mollusks, Octopus, <i>Octopus luteus</i>	2007-07-01	1522
53		<a href="#">Oct v 1</a>	Animals, Common Octopus, Mollusks, <i>Octopus vulgaris</i>	2008-01-13	2133
54		<a href="#">Omm b 1</a>	Animals, <i>Loligo bartramii</i> , <i>Loligo pironneauii</i> , <i>Loligo touchardii</i> , <i>Loligo vitreus</i> , Mollusks, Neon Flying Squid, <i>Ommastrephes bartrami</i> , <i>Ommastrephes caroli</i> , <i>Ommastrephes caroli stenobrachiui</i> , <i>Ommastrephes caroli stenodactyla</i> , <i>Ommastrephes cylindraceus</i> , <i>Ommastrephes caroli</i> , <i>Onychoteuthis brevimanus</i> , Red Flying Squid, <i>Stenoteuthis bartrami</i> , <i>Sthenoteuthis bartramii</i>	2007-07-01	3792
55		<a href="#">Pan b 1</a>	Animals, Crustaceans, Northern Red Shrimp, <i>Pandalus borealis</i>	2007-09-02	1277
56		<a href="#">Pan e 1</a>	Alaskan Pink Shrimp, Animals, Crustaceans, Northern Pink Shrimp, <i>Pandalus borealis eous</i> , <i>Pandalus eous</i>	2007-07-07	3810
57		<a href="#">Pan h 1</a>	Animals, Crustaceans, Indian Spiny Lobster, <i>Panulirus homarus</i>	2007-07-01	1523
58		<a href="#">Pan j 1</a>	Animals, Crustaceans, Japanese spiny lobster, <i>Panulirus japonicus</i>	2007-08-16	3793
59		<a href="#">Pan s 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Panulirus stimpsoni</i> , Spiny Lobster	2008-01-02	500
60		<a href="#">Par c 1</a>	Animals, Crustaceans, King Crab, <i>Paralithodes camtschatica</i> , <i>Paralithodes camtschaticus</i> , Red King Crab	2007-07-07	3811
61		<a href="#">Par f 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Parapenaeus fissurus</i> , Shrimp, Taiwan Shrimp	2007-07-07	501
62		<a href="#">Pat v 1</a>	Animals, Ezo Giant Scallop, <i>Mizuhopecten yessoensis</i> , Mollusks, <i>Patinopecten yessoensi</i> , <i>Patinopecten yessoensis</i> , <i>Patiopecten yessoensis</i> , Yesso Scallop	2007-07-07	2769
63		<a href="#">Pen a 1</a>	Animals, Brown Shrimp, Crustaceans, <i>FarfantePenaeus aztecus</i> , <i>Penaeus aztecus</i>	2008-01-10	515
64		<a href="#">Pen i 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>FenneroPenaeus Indicus</i> , Indian Shrimp, <i>Penaeus Indicus</i>	2008-01-10	527

65		<a href="#">Pen m 1</a>	Animals, Black Tiger Prawn, Black Tiger Shrimp, Crustaceans, <i>Penaeus monodon</i>	2008-01-13	972
66		<a href="#">Pena o 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Penaeus orientalis</i> , Shrimp	2005-12-10	528
67		<a href="#">Per a 7</a>	American Cockroach, Animals, Cockroaches, Insects, <i>Periplaneta americana</i>	2008-01-07	542
68		<a href="#">Per f 7</a>	Animals, Cockroaches, Dusky-brown Cockroach, Insects, <i>Periplaneta fuliginosa</i>	2007-12-23	1516
69		<a href="#">Per v 1</a>	Animals, Mollusks, <i>Perna viridis</i> , Tropical Green Mussel	2008-01-02	823
70		<a href="#">Pin a 1</a>	Animals, Mollusks, Pen Shell, <i>Pinna atropupurea</i>	2007-07-01	1524
71		<a href="#">Pol c 1</a>	Animals, Barnacle, Crustaceans, <i>Pollicipes cornucopia</i>	2007-07-01	3668
72		<a href="#">Por s 1</a>	Animals, Crustaceans, <i>Portunus sanguinolentus</i> , Three Spot Swimming Crab	2007-12-27	3558
73		<a href="#">Pso o 10</a>	Animals, Mites, <i>Psoroptes ovis</i> , Sheep Scab Mite	2006-08-08	2488
74		<a href="#">Scv o 1</a>	Animals, Crustaceans, Mud Crab, <i>Scylla olivacea</i>	2007-12-22	3987
75		<a href="#">Scv s 1</a>	Animals, Crustaceans, Mangrove Crab, Mud Crab, <i>Scylla serrata</i>	2007-07-07	1525
76		<a href="#">Sep e 1</a>	Animals, <i>Diphtherosepion dabryi</i> , Golden Cuttlefish, Mollusks, <i>Sepia esculenta</i> , <i>Sepia hoylei</i>	2007-07-01	3794
77		<a href="#">Sep l 10</a>	Animals, Bigfin Reef Squid, Mollusks, <i>Sepioteuthis arctipinnis</i> , <i>Sepioteuthis doreiensis</i> , <i>Sepioteuthis guinensis</i> , <i>Sepioteuthis hemprichii</i> , <i>Sepioteuthis indica</i> , <i>Sepioteuthis krempfi</i> , <i>Sepioteuthis lessoniana</i> , <i>Sepioteuthis lunulata</i> , <i>Sepioteuthis malayana</i> , <i>Sepioteuthis mauritiana</i> , <i>Sepioteuthis neoguinaica</i> , <i>Sepioteuthis sieboldi</i> , <i>Sepioteuthis sinensis</i>	2007-12-23	3795
78		<a href="#">Sep m 1</a>	Animals, Cuttlefish, Mollusks, <i>Sepia madokai</i>	2007-07-01	1526
79		<a href="#">Squ o 1</a>	Animals, Crustaceans, Japanese Mantis Shrimp, <i>Squilla oratoria</i>	2007-07-05	3800
80		<a href="#">Tod p 1</a>	Animals, Japanese Flying Squid, Mollusks, <i>Todarodes pacificus</i>	2008-01-02	649
81		<a href="#">Tur c 1</a>	Animals, <i>Batillus cornutus</i> , Horned Turban, Mollusks, <i>Turbo cornutus</i>	2008-01-02	656
82		<a href="#">Tyr p 10</a>	Animals, Mites, <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	2007-07-07	3781

### **ANEXO III: Consentimiento informado**

#### **ESTUDIO DE ALERGIA A CRUSTACEOS MEDIANTE LA REALIZACION DE PRYCK BY PRYCK Y TECNICAS DE LABORATORIO CON 13 VARIEDADES DIFERENTES DE LANGOSTINO.**

A usted se le ha diagnosticado alergia al marisco. Debe saber que en España, la alergia al pescado constituye el 18% de todos los casos de alergia alimentaria. De estos el 3,8% se atribuyen a los crustáceos (gambas, langostinos, carabineros, quisquillones, camarones, langostas, bogavantes, cigalas, santiaguíños, cangrejos de río... etc).

Actualmente se conoce que la alergia a mariscos, que incluye crustáceos, moluscos y cefalópodos, es debida a una proteína muscular llamada tropomiosina. Ésta es imprescindible para la movilidad de estos invertebrados, por lo que está presente en todos los crustáceos y por tanto, en teoría, cada consumo de los mismos debería dar lugar a una reacción alérgica.

En la práctica clínica, sin embargo, apreciamos que muchos pacientes alérgicos al marisco, consumen langostinos tolerándolos perfectamente y, en determinadas ocasiones, presentan urticaria, angioedema, síntomas gastrointestinales e incluso anafilaxia. Por todo ello, nos parece interesante profundizar en este tipo de patología mediante la realización de pruebas cutáneas con 13 variedades diferentes de langostino y proceder el mismo día a una extracción de sangre para realizar pruebas de laboratorio. Las pruebas cutáneas consisten en pequeños pinchazos con una lanceta de 1 mm de longitud sobre el antebrazo de los pacientes previa punción en cada una de las 13 especies de langostino tanto en la cabeza como en el cuerpo. En caso de tener alergia a alguno de los crustáceos presentará un picor leve-moderado y un enrojecimiento de la zona, dicha reacción durará aproximadamente unos 15 minutos. Siempre habrá una que reacciona, la que corresponde al control positivo. Si fuera muy intensa, aplicaríamos una crema anti alérgica para mitigar dicho picor. Se trata de una prueba segura, sin efectos adversos. Aunque se han descrito reacciones alérgicas generalizadas con estas pruebas, éstas son excepcionales. No obstante, disponemos de medicación y personal cualificado para controlar esta situación. Los resultados de este estudio pueden ser de utilidad tanto a nivel médico como para los pacientes, ya que sería posible identificar la/s variedad/es de langostino responsable/s de la reacción alérgica.

En todos los casos, es imprescindible que usted firme el consentimiento informado para la realización de las pruebas mencionadas. En caso de cualquier pregunta o duda, estamos a su entera disposición para aclararla.

Es necesario advertir que para que la prueba sea válida es imprescindible que no se esté consumiendo medicamentos antialérgicos (antihistamínicos), por lo que le rogamos que si está tomando cualquier fármaco nos lo haga saber.

Su participación en este estudio es voluntaria, y aunque decida no participar, su decisión no conllevará ningún perjuicio en su atención en este Servicio.

Yo,.....  
(nombre y apellidos) en calidad ..... (relación con el participante)  
.....(nombre del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: .....(nombre del investigador), declaro bajo mi responsabilidad que:

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- 1.º Cuando quiera.
- 2.º Sin tener que dar explicaciones.
- 3.º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a ..... (nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que ..... (nombre del participante) participe en este estudio.

Fecha:

Firma del Representante Legal:

Fecha:

Firma del Investigador:



## ANEXO IV: Aditivos alimentarios

### Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

#### Colorantes

E	100	Curcumina
		Riboflavinas
E	101	(i) Riboflavina
		(ii) Riboflavina -5'-fosfato
E	102	Tartracina
E	104	Amarillo de quinoleína
E	110	Amarillo ocazo FCF, Amarillo anaranjado S
E	120	Cochinilla, ácido carmínico, carmines
E	122	Azorrubina, Carmoisina
E	123	Amaranto
E	124	Ponceau 4R, rojo de cochinilla A
E	127	Eritrosina
E	128	Rojo 2G
E	129	Rojo allura AC
E	131	Azul patente V
E	132	Indigotina, carmín de indigo
E	133	Azul brillante FCF
		Clorofilas y clorofilinas
E	140	(i) Clorofilas
		(ii) Clorofilinas
		Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas
E	141	(i) complejos cúpricos de clorofilas
		(ii) complejos cúpricos de clorofilinas
E	142	Verde S
E	150 a	Caramelo natural
E	150 b	Caramelo de sulfito cáustico
E	150 c	Caramelo amónico
E	150 d	Caramelo de sulfito amónico
E	151	Negro Brillante BN, Negro BN
E	153	Carbón vegetal
E	154	Marrón FK
E	155	Marrón HT
		Carotenos
E	160 a	(i) Mezcla de carotenos
		(ii) Beta-caroteno
E	160 b	Bija, bixina, norbixina, annato
E	160 c	Extracto de pimentón, capsantina, capsorrubina
E	160 d	Licopeno
E	160 e	Beta-apo-8'-carotenal (C 30)
E	160 f	Éster etílico de ácido Beta-apo-8'-carotenoico (C30)
E	161 b	Luteína
E	161 g	Cantaxantina
E	162	Rojo de remolacha, betanina
E	163	Antocianinas
		Carbonatos de cálcico
E	170	(i) Carbonato cálcico
		(ii) Carbonato ácido de calcio
E	171	Dióxido de titanio
E	172	Óxidos e hidróxidos de hierro
E	173	Aluminio
E	174	Plata
E	175	Oro
E	180	Litolrubina BK

#### Conservantes

E	200	Ácido sórbico
E	202	Sorbato potásico
E	203	Sorbato cálcico
E	210	Ácido benzoico
E	211	Benzoato sódico
E	212	Benzoato potásico
E	213	Benzoato cálcico
E	214	Etil p-hidroxibenzoato
E	215	Etil p-hidroxibenzoato sódico
E	216	Propil p-hidroxibenzoato
E	217	Propil P-Hidroxibenzoato sódico



## Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

E	218	Metil p-hydroxibenzoato
E	219	Metil p-hydroxibenzoato sódico
E	220	Dióxido de azufre
E	221	Sulfito sódico
E	222	Sulfito ácido de sodio
E	223	Metabisulfito sódico
E	224	Metabisulfito potásico
E	226	Sulfito cálcico
E	227	Sulfito ácido de calcio
E	228	Sulfito ácido de potasio
E	230	Bifenilo, difenilo
E	231	Ortofenil fenol
E	232	Ortofenil fenol sódico
E	233	Tiabendazol
E	234	Nisina
E	235	Natamicina
E	239	Hexametilentetramina
E	242	Dimetil dicarbonato
E	249	Nitrito potásico
E	250	Nitrito sódico
E	251	Nitrato sódico
E	252	Nitrato potásico
E	281	Propionato sódico
E	282	Propionato cálcico
E	283	Propionato potásico
E	284	Ácido bórico
E	285	Tetraborato sódico (borax)
E	1105	Lisozima

### Antioxidantes

E	300	Ácido ascórbico
E	301	Ascorbato sódico
E	302	Ascorbato cálcico
E	304	Ésteres de ácidos grasos del ácido ascórbico (i) Palmitato de ascorbilo (ii) Estearato de ascorbilo
E	306	Extracto rico en tocoferoles
E	307	Alfa-tocoferol
E	308	Gamma-tocoferol
E	309	Delta-tocoferol
E	310	Galato de propilo
E	311	Galato de octilo
E	312	Galato de dodecilo
E	315	Ácido eritórbico
E	316	Eritorbato sódico
E	320	Butilhidroxianisol (BHA)
E	321	Butilhidroxitoluol (BHT)

### Edulcorantes

E	420	Sorbitol (i) Sorbitol (ii) Jarabe de sorbitol
E	421	Manitol
E	950	Acesulfamo-K
E	951	Aspartamo
E	952	Ácido ciclámico y sus sales de sodio y calcio
E	953	Isomaltosa
E	954	Sacarina y sus sales de sodio, potasio y calcio
E	957	Taumatina
E	959	Neohesperidina DC Maltitol
E	965	(i) Maltitol (ii) Jarabe de maltitol
E	966	Lactitol
E	967	Xilitol



## Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

### Emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes

E	322	Lecitinas
E	400	Ácido alginico
E	401	Alginato sódico
E	402	Alginato potásico
E	403	Alginato amónico
E	404	Alginato cálcico
E	405	Alginato de propano-1,2-diol
E	406	Agar
E	407	Carragenano
E	407 a	Algas marinas transformadas del género Eucheuma
E	410	Goma de semillas de algarrobo
E	412	Goma guar
E	413	Goma tragacanto
E	414	Goma arábica
E	415	Goma xantana
E	416	Goma karaya
E	417	Goma tara
E	418	Goma gellan
		Konjac
E	425	(i) Goma konjac (ii) Glucomananos de konjac
E	432	Monolaurato de sorbitano polioxietilado (polisorbato 20)
E	433	Monoleato de sorbitano polioxietilado (polisorbato 80)
E	434	Monopalmitato de sorbitano polioxietilado (polisorbato 40)
E	435	Monoestearato de sorbitano polioxietilado (polisorbato 60)
E	436	Triestearato de sorbitano polioxietilado (polisorbato 65)
		Pectinas
E	440	(i) pectina (ii) Pectina amidada
E	442	Fosfátidos de amonio
E	444	Acetato isobutirato de sacarosa
E	445	Ésteres glicéridos de colofonia de madera
		Celulosa
E	460	(i) Celulosa microcristalina (ii) Celulosa en polvo
E	461	Metilcelulosa
E	463	Hidroxipropilcelulosa
E	464	Hidroxipropilmetilcelulosa
E	465	Etilmetilcelulosa
E	466	Carboximetilcelulosa, (carboximetilcelulosa sódica)
E	468	Carboximetilcelulosa sódica entrelazada
E	469	Carboximetilcelulosa sódica hidrolizada enzimáticamente
E	470 a	Sales de sodio, de potasio y de calcio de los ácidos grasos
E	470 b	Sales magnésicas de los ácidos grasos
E	471	Mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 a	Ésteres acéticos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 b	Ésteres lácticos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 c	Ésteres cítricos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 d	Ésteres tartáricos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 e	Ésteres mono- y diacetiltartáricos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	472 f	Ésteres mixtos acéticos y tartáricos de los mono- y diglicéridos de ácidos grasos
E	473	Sucroésteres de ácidos grasos
E	474	Sucroglicéridos
E	475	Ésteres poliglicéridos de ácidos grasos
E	476	Polirricinoleato de poliglicerol
E	477	Ésteres de propano-1,2 -diol de ácidos grasos
E	481	Estearoil-2-lactilato de sodio
E	482	Estearoil-2-lactilato de calcio
E	483	Tartrato de estearilo
E	491	Monoestearato de sorbitano
E	492	Triestearato de sorbitano
E	493	Monolaurato de sorbitano
E	494	Monoleato de sorbitano
E	495	Monopalmitato de sorbitano
E	1103	Invertasa



## Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

### Otros:

Acidulzantes, correctores de la acidez, antiaglomerantes, antiespumantes, agentes de carga, soportes y disolventes soportes, sales fundentes, endurecedores, potenciadores de sabor, agentes de tratamiento de la harina, espumantes, agentes de recubrimiento, humectantes, almidones modificados, gases de envasado, gases propulsores, gasificantes y secuestrantes.

E	170	Carbonatos de calcio (i) Carbonato cálcico (ii) Carbonato ácido de calcio
E	260	Acido acético
E	261	Acetato de potasio
E	262	Acetato de sodio
E	263	Acetato de calcio
E	270	Acido láctico
E	290	Dióxido de carbono
E	296	Acido málico
E	297	Acido fumárico
E	325	Lactato sódico
E	326	Lactato potásico
E	327	Lactato cálcico
E	330	Acido cítrico
E	331	Citratos de sodio (i) Citrato monosódico (ii) Citrato disódico (iii) Citrato trisódico Citratos de potasio
E	332	(i) Citrato monopotásico (ii) Citrato tripotásico Citratos de calcio
E	333	(i) Citrato monocálcico (ii) Citrato dicálcico (iii) Citrato tricálcico
E	334	Acido L(+)- tartárico Tartratos de sodio
E	335	(i) Tartrato monosódico (ii) Tartrato disódico Tartratos de potasio
E	336	(i) Tartrato monopotásico (ii) Tartrato dipotásico
E	337	Tartrato doble de sodio y potasio
E	338	Acido fosfórico Fosfatos de sodio
E	339	(i) Fosfato monosódico (ii) Fosfato disódico (iii) Fosfato trisódico Fosfatos de potasio
E	340	(i) Fosfato monopotásico (ii) Fosfato dipotásico (ii) Fosfato dipotásico Fosfatos de calcio
E	341	(i) Fosfato monocálcico (ii) Fosfato dicálcico (iii) Fosfato tricálcico Fosfatos de magnesio
E	343	(i) Fosfato monomagnésico (ii) Fosfato dimagnésico Malatos de sodio
E	350	(i) Malato sódico (ii) Malato ácido de sodio
E	351	Malato potásico Malatos de calcio
E	352	(i) Malato cálcico (ii) Malato ácido de calcio
E	353	Acido metatartárico
E	354	Tartrato cálcico
E	355	Acido adípico
E	356	Adipato sódico



## Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

E	357	Adipato potásico
E	363	Ácido succínico
E	380	Citrato triamónico
E	385	Etilen-diamino-tetracetato de calcio y sodio (EDTA cálcico disódico)
E	422	Glicerol
E	431	Estearato de polioxietileno (40)
		Difosfatos
		(i) Difosfato disódico
		(ii) Difosfato trisódico
E	450	(iii) Difosfato tetrasódico
		(v) Difosfato tetrapotásico
		(vi) Difosfato dicálcico
		(vii) Difosfato ácido de calcio
E	451	Trifosfatos
		(i) Trifosfato de pentasodio
		(ii) Trifosfato de pentapotasio
		Polifosfatos
		(i) Polifosfato de sodio
E	452	(ii) Polifosfato de potasio
		(iii) Polifosfato de sodio y calcio
		(iv) Polifosfato de calcio
E	459	Beta-ciclodextrina
E	479b	Aceite de soja oxidado térmicamente en interacción con mono- y diglicéridos de ácidos grasos
		Carbonatos de sodio
E	500	(i) Carbonato sódico
		(ii) Carbonato ácido de sodio
		(iii) Sesquicarbonato sódico
		Carbonatos de potasio
E	501	(i) Carbonato potásico
		(ii) Carbonato ácido de potasio
		Carbonatos de amonio
E	503	(i) Carbonato amónico
		(ii) Carbonato ácido de amonio
		Carbonatos de magnesio
E	504	(i) Carbonato magnésico
		(ii) Carbonato ácido de magnesio
E	507	Ácido clorhídrico
E	508	Cloruro de potasio
E	509	Cloruro cálcico
E	511	Cloruro magnésico
E	512	Cloruro de estaño
E	513	Ácido sulfúrico
		Sulfatos de sodio
E	514	(i) Sulfato sódico
		(ii) Sulfato ácido de sodio
		Sulfatos de potasio
E	515	(i) Sulfato potásico
		(ii) Sulfato ácido de potasio
E	516	Sulfato cálcico
E	517	Sulfato amónico
E	520	Sulfato de aluminio
E	521	Sulfato doble de aluminio y sodio
E	522	Sulfato doble de aluminio y potasio
E	523	Sulfato doble de aluminio y amonio
E	524	Hidróxido sódico
E	525	Hidróxido potásico
E	526	Hidróxido cálcico
E	527	Hidróxido amónico
E	528	Hidróxido magnésico
E	529	Óxido de calcio
E	530	Óxido de magnesio
E	535	Ferrocianuro sódico
E	536	Ferrocianuro potásico
E	538	Ferrocianuro cálcico
E	541	Fosfato ácido de sodio y aluminio
E	551	Dióxido de silicio
E	552	Silicato cálcico
		Silicatos de magnesio
E	553a	(i) Silicato magnésico
		(ii) Trisilicato magnésico
E	553b	Talco



## Aditivos Alimentarios autorizados por la UE (Lista de Números E por categoría)

E	554	Silicato de sodio y aluminio
E	555	Silicato de potasio y aluminio
E	556	Silicato de calcio y aluminio
E	558	Bentonita
E	559	Silicato de aluminio (Caolín)
E	570	Ácidos grasos
E	574	Ácido glucónico
E	575	Glucono-delta-lactona
E	576	Gluconato sódico
E	577	Gluconato potásico
E	578	Gluconato cálcico
E	579	Gluconato ferroso
E	585	Lactato ferroso
E	620	Ácido glutámico
E	621	Glutamato monosódico
E	622	Glutamato monopotásico
E	623	Diglutamato cálcico
E	624	Glutamato monoamónico
E	625	Diglutamato magnésico
E	626	Ácido guanílico
E	627	Guanilato disódico
E	628	Guanilato dipotásico
E	629	Guanilato cálcico
E	630	Ácido inosínico
E	631	Inosinato disódico
E	632	Inosinato dipotásico
E	633	Inosinato cálcico
E	634	5'-ribonucleótidos cálcicos
E	635	5'-ribonucleótidos disódicos
E	640	Glicina y su sal sódica
E	650	Acetato de cinc
E	900	Dimetilpolisiloxano
E	901	Cera de abejas blanca y amarilla
E	902	Cera candelilla
E	903	Cera carnauba
E	904	Goma laca
E	905	Cera microcristalina
E	912	Ésteres del ácido montánico
E	914	Cera de polietileno oxidada
E	920	L-Cisteína ( <i>sólo puede utilizarse como agente de tratamiento de la harina</i> )
E	927 b	Carbamida
E	938	Argón
E	939	Helio
E	941	Nitrógeno
E	942	Óxido nítrico
E	943 a	Butano
E	943 b	Isobutano
E	944	Propano
E	948	Oxígeno
E	949	Hidrógeno
E	999	Extracto de quilaya
E	1200	Polidextrosa
E	1201	Polivinilpirrolidona
E	1202	Polivinilpolipirrolidona
E	1404	Almidón oxidado
E	1410	Fosfato de monoalmidón
E	1412	Fosfato de dialmidón
E	1413	Fosfato de dialmidón fosfatado
E	1414	Fosfato de dialmidón acetilado
E	1420	Almidón acetilado
E	1422	Adipato de dialmidón acetilado
E	1440	Hidroxipropil almidón
E	1442	Fosfato de hidroxipropil dialmidón
E	1450	Octenil succinato sódico de almidón
E	1451	Almidón oxidado acetilado
E	1505	Citrato de trietilo
E	1518	Triacetato de glicerilo (triacetina)
E	1520	Propilenglicol