

**Original****Estudio de alergenios mayores de calamar (*Loligo vulgaris*)**

R. Castillo, B. Bartolomé<sup>a</sup>, A. Valverdú<sup>a</sup>, C. Blanco, N. Ortega, M. J. Álvarez,  
T. Carrillo

*Sección de Alergología. Hospital Universitario Nuestra Señora del Pino. Las Palmas de Gran Canaria*  
*<sup>a</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo. Ifidesa-Arístegui. Bilbao*

**Fundamento:** La tropomiosina muscular (TPM) es el principal alergenio mayor de la gamba. Esta proteína parece ser también un alergenio relevante en los extractos de calamar. El propósito del presente estudio es identificar el o los alergenios relevantes en una serie de pacientes alérgicos a calamar. **Métodos:** En 9 pacientes alérgicos a calamar (5 varones y 4 mujeres), ocho de los cuales eran alérgicos a ácaros y uno a cucaracha, se realizaron test cutáneos (TC) con una batería comercial de mariscos y con extractos propios liofilizados de gamba y calamar. Se determinó la IgE total y específica frente a la batería de mariscos utilizada. Se realizó SDS-PAGE e *immunoblotting* (IB) frente a extracto de calamar y gamba. Asimismo, se llevaron a cabo inhibiciones de CAP de gamba, calamar, pulpo y mariscos bivalvos. Finalmente, se realizó un segundo IB del extracto de calamar con suero policlonal de conejo antitropomiosina de pollo (IgG-TPM). **Resultados:** Todos los pacientes mostraron TC positivos e IgE específica positiva frente a calamar, gamba, pulpo y mariscos bivalvos. La PAGE mostró diversas bandas, pero la más importante, común a los extractos de gamba y calamar, se situó en el rango de peso molecular entre 38 y 42 kDa. El IB mostró un patrón homogéneo de tinción para todos los pacientes con el extracto de calamar y mostró una banda común entre los 38 y los 42 kDa. No se observaron otros alergenios relevantes en el extracto de calamar. Las inhibiciones de gamba fueron superiores al 90 % sobre las restantes especies de marisco. El extracto de calamar inhibió el CAP a calamar, pulpo y mariscos bivalvos en más del 80%, pero fue incapaz de alcanzar el 50 % de inhibición sobre el CAP de gamba. El IB con suero policlonal antitropomiosina detectó una banda de 41 kDa de peso molecular, de forma aislada. **Conclusiones:** La tropomiosina, al igual que en la gamba, es el alergenio mayor del calamar. De existir otros alergenios de calamar, éstos no deben ser relevantes.

**PALABRAS CLAVE:** Calamar / Hipersensibilidad / Alergenios mayores / Tropomiosina.

**A study of major allergens of squid**

**Background:** Muscle tropomyosin is a major shrimp allergen. It seems that this protein may also be a relevant allergen in squid extracts. The aim of this study was to identify the relevant(s) allergen(s) in a series of patients with allergy to squid. **Methods:** In nine patients with squid allergy (5 women and 4 men), eight of whom were also allergic to mites and one to cockroach, prick tests with a commercial battery of shellfish and with our own lyophilized extracts of shrimp and squid were performed. Total serum IgE and specific IgE against the shellfish battery were measured, as well as shrimp and squid extracts were assayed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. In addition, CAP inhibitions of shrimp, squid, octopus, and bivalve shellfish were carried out. A second immunoblotting of the squid extract with chicken anti-tropomyosin polyclonal rabbit serum was finally performed. **Results:** All patients showed positive prick tests and specific IgE against squid, shrimp, octopus, and bivalve shellfish. PAGE showed different bands, but the most important which was common to squid and shrimp extracts, showed a molecular weight between 38 and 42 kDa. Immunoblotting showed a homogeneous staining pattern with squid extract for all patients, with a common band between 38 and 42 kDa. Other relevant allergens in the squid extract were not observed. Shrimp inhibitions were higher than 90% in relation to the other shellfish species. Squid extract inhibited CAP to squid, octopus, and bivalve shellfish in more than 80% but was unable to reach a 50% inhibition over the shrimp CAP. Immunoblotting with anti-tropomyosin polyclonal serum detected only a band of 41 kDa molecular weight. **Conclusions:** Tropomyosin, like in the shrimp, is the major squid allergen. If other squid allergens are present, these should no be relevant.

**KEY WORDS:** Squid / Hypersensitivity / Major allergens / Tropomyosin.

Los cefalópodos son un alimento ampliamente consumido en España<sup>1</sup>. Los estudios de hipersensibilidad a este grupo de mariscos son, no obstante, escasos. El primer estudio de los cefalópodos como alérgenos fue llevado a cabo por Carrillo *et al.*<sup>2</sup> en 1992. En dicho estudio, se observó alergenidad cruzada entre calamar (*Loligo vulgaris*) y gamba (*Parapenaeus longirostris*), aunque no pudo demostrarse tal reactividad cruzada entre calamar y pulpo (*Octopus vulgaris*). Esta reactividad fue puesta de manifiesto por Castillo *et al.*<sup>3</sup> en 1995, quienes, asimismo, confirmaron la reactividad cruzada entre mariscos artrópodos y cefalópodos.

La tropomiosina muscular (TPM) se ha identificado como el alérgeno mayor de los mariscos crustáceos<sup>4</sup>. Los estudios de Miyazawa *et al.*<sup>5</sup> parecen poner de manifiesto que la TPM, o una proteína de gran homología, constituye un alérgeno importante en la hipersensibilidad a calamar (*Todarodes pacificua*).

El objeto del presente estudio es analizar las características clínicas de la hipersensibilidad inmediata a calamar (HIC), determinar si en nuestra población de pacientes sensibilizados a calamar la TPM constituye un alérgeno de importancia, si existen otros alérgenos de importancia en los pacientes afectados de HIC y la relación de los

alérgenos de calamar con los de otras especies de marisco.

## PACIENTES Y MÉTODOS

**Pacientes.** Se reclutaron 9 pacientes con historia de hipersensibilidad inmediata (HI) a calamar. Mediante un cuestionario, se recogieron los datos considerados de interés, tales como sexo, edad, antecedentes relacionados con enfermedad atópica (naturaleza, evolución, gravedad, tratamientos aplicados, entre otros) y mariscos implicados en reacciones de hipersensibilidad inmediata, considerando como tales las producidas en las 2 horas después siguientes a la ingesta.

**Muestras de suero.** Se extrajeron 20 ml de sangre heparinizada a cada uno de los 9 pacientes. Las muestras de suero se emplearon para preparar un *pool* de suero y el resto se repartió en alícuotas y se almacenó a -70 °C para estudios posteriores.

**Test cutáneos (TC).** Se realizaron TC con una batería estándar de aeroalérgenos y alimentos, con extractos comerciales (tabla I).

Asimismo, se realizaron TC frente a una batería comercial de marisco compuesta por gamba (*Parapenaeus longirostris*), langosta (*Palinurus vulgaris*), centollo (*Maia squinado*), calamar (*Loligo vulgaris*), pulpo (*Octopus vulgaris*), mejillón (*Mytilus edulis*), almeja (*Tapes decussatus*), ostra (*Ostrea edulis*) y lapa (*Patella piperata*).

**Extractos alérgicos de mariscos no comerciales.** Se prepararon extractos de gamba y calamar. Dichos extractos se elaboraron mediante el siguiente proceso: se obtuvieron 1.000 mg de carne magra de cada especie y, una vez eliminadas las estructuras córneas y/o calcáreas de las mismas, cada muestra se procesó individualmente; la carne se sometió a cocción a 70 °C, durante 10 minutos y a continuación se procedió a su triturado, manteniéndose en agitación durante 18 horas a 4 °C; posteriormente, se procedió al colado de cada muestra y la parte líquida separada se congeló para su posterior liofilización; se determinó la riqueza proteica de ambos extractos por medio del sistema Bio-Rad® (Bio-Rad, Ca, EE.UU.). Los extractos para TC se prepararon en PBS (pH 7,4) a 20 mg/ml (peso/volumen), se pasaron por filtro de 0,22 µm (Millipore, Molsheim, Francia) y se estabilizaron con glicerol al 50 %.

**Tabla I.** Extractos comerciales empleados en la batería estándar de *prick* en la Sección de Alergología del Hospital Universitario N.º Sra. del Pino

Aeroalérgenos	Alimentos
— <i>D. pteronyssinus</i>	— Leche
— <i>D. farinae</i>	— Huevo
— <i>Lepidoglyphus destructor</i>	— Clara
— <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	— Yema
— <i>Acarus siro</i>	— Pescado blanco
— <i>Euroglyphus maynei</i>	— Pescado azul
— <i>Blomia tropicalis</i>	— Cacahuete
— <i>Alternaria alter</i>	— Almendra
— <i>Penicillium notatum</i>	— Avellana
— <i>Cladosporium herbarum</i>	— Nuez
— <i>Aspergillus fumigatus</i>	— Pipas de girasol
— <i>Lolium perenne</i>	— Harina de trigo
— <i>Cynodon dactylon</i>	— Harina de maíz
— <i>Olea europea</i>	— Melocotón
— <i>Artemisia vulgaris</i>	— Aguacate
— Perro	— Papaya
— Gato	— Lenteja
— Conejo	— Gamba
— <i>Blatella germanica</i>	— Calamar

Los TC se llevaron a cabo entre las 9,00 y las 11,00 de la mañana. Se aplicaron sobre la superficie volar del antebrazo, con lancetas tipo Morrow-Brown y la lectura se llevó a cabo a los 20 minutos. Se consideró un TC como positivo si el diámetro mayor de la pápula fue igual o superior a 3 mm.

*Determinación de IgE específica.* Se realizó por el método CAP/FEIA de Pharmacia® (Pharmacia, Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones de procesado del equipo comercial suministradas por el fabricante. Se determinó la IgE específica frente a aeroalergenos y alimentos de la batería estándar de TC sugeridos por la historia clínica. En el caso particular de los mariscos, se determinó, de forma sistemática, frente a camarón, centollo, calamar, langosta, mejillón, almeja y ostra (el CAP/FEIA a lapa no se encontraba disponible en el momento de la realización de este estudio). Se consideraron positivos los valores superiores a 0,7 RUI/l (clase II o superior).

*Técnica de inhibición de CAP (CAPI).* Se realizó según procedimiento, ligeramente modificado, descrito previamente<sup>6</sup>. Se prepararon diluciones de 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> mg/ml (peso/volumen) de alérgeno inhibidor (fase líquida). Se incubó cada dilución con 50 µl del *pool* de suero, durante 3 horas en agitación, a temperatura ambiente y, a continuación, se procedió a determinar la IgE específica del alérgeno a inhibir (fase sólida), por medio de un CAP/FEIA convencional.

*Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).* Se realizó por el método de estándar tipo Laemuli<sup>7</sup>, con ligeras modificaciones. Se llevó a cabo con un equipo de electroforesis horizontal Mini-Protean II (Bio-Rad, Ca, EE.UU.). Se utilizó un gel apilador de poliacrilamida al 4 % en tampón 0,5 M Tris-HCl a pH = 6,8 y un gel separador de acrilamida al 12,5 % en tampón 1,5 M Tris-HCl a pH = 8,8. Se empleó un voltaje de 200 V, durante 45 minutos. Se utilizaron 5 µl de muestra por pocillo, a una concentración de 3 mg/ml (peso/volumen), en tampón 0,5 M Tris-HCl a pH = 6,8. Como patrón se empleó la mezcla proteica de bajos pesos moleculares, suministrada con el equipo comercial de referencia (Bio-Rad, Ca, EE.UU.) con un rango de pesos moleculares comprendido entre 14,4 y 97,4 kDa. La lectura del gel se llevó a cabo por medio del sistema de lectura automatizada BIOIMAGE (Millipore, Molsheim, Francia).

La lectura de bandas proteicas se llevó a cabo por medio de un sistema automatizado (BIOIMAGE, Millipore, NY, EE.UU.).

*SDS-Immunoblotting (IB).* Tras realizar una SDS-PAGE de los extractos de gamba y calamar, se procedió a transferir las bandas a una membrana inmovilizante. Se utilizó una unidad de electroforesis Multiphor II (LKB, Bromma, Suecia) con una fuente de alimentación (LKB, Bromma, Suecia), una placa de transferencia Novablot (LKB, Bromma, Suecia) y un equipo de transferencia electroforética. Se utilizó como membrana de transferencia el Immobilon-P® (Nitrocelulosa 0,45 µm y Nitrocelulosa 0,2 µm de poro) (Bio-Rad, Ca, EE.UU.), membrana hidrófoba de polivinil-di-fluoruro (PVDF), previamente tratada con metanol (1 minuto) y tampón de transferencia continuo (39 mM de Glicina, 48 mM de Tris, SDS al 0,037 %, metanol al 20 % y agua destilada), durante 2 minutos. Las condiciones eléctricas fueron de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel, durante 1 hora. Se utilizó como tinción el Amidoblack® (Bio-Rad, Ca, EE.UU.). Una vez se produjo la transferencia, se saturó la membrana en agua y tampón TBS-leche, en bolsas termoselladas, en agitación, a 40 °C, durante 1 hora. A continuación se procedió a 4 lavados sucesivos con tampón PBS, en agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las muestras de suero problema a dilución 1:2 en tampón TBS-leche, durante 18 horas. Tras la incubación, se realizaron 4 lavados sucesivos, en agitación constante y a temperatura ambiente con tampón TBS. Se procedió a añadir el conjugado marcado HRP-anti-IgE (Dako-Patts, Dinamarca), compuesto de peroxidasa de rábano picante unido a anti-IgE humana, a dilución 1:50 en TBS-leche, hasta cubrir toda la membrana y se dejó en agitación continua a temperatura ambiente durante 4 horas. Por fin, se procedió al revelado, con una solución de 4-cloro-1-naftol al 0,06 % en TBS, con H<sub>2</sub>O bidestilada al 0,01 %. La membrana se introdujo con el baño de revelador en oscuridad y reposo durante 45 minutos, a continuación se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada y se procedió a su secado.

*IB con IgG de conejo anti-TPM (IB-TPM) de pollo marcada enzimáticamente.* Se realizó un IB por el proceso descrito más arriba pero, en este caso, se empleó como marcador un preparado de IgG policlonal de conejo, frente a tropomiosina de

pollo (SIGMA Immunochemicals, St. Louis, EE.UU.). Dicho preparado se incubó con la membrana a dilución 1:2000, durante 18 horas. Como conjugado se utilizó una anti-IgG de conejo, marcada enzimáticamente con peroxidasa de rábano (Dako-Patts, Dinamarca).

*Análisis estadístico.* Se llevó a cabo con un paquete informático integrado. Se analizaron las comparaciones de valores de prick por el test de Wilcoxon, la homogeneidad de varianzas por el test F de Snedecor y el grado de paralelismo de las rectas de CAPI se valoró con la t de Student. Los test se consideraron significativos con una *p* inferior a 0,05.

## RESULTADOS

*Datos clínicos.* Se incluyeron en el estudio 9 pacientes (5 varones y 4 mujeres) con una edad media de 23,4 años (intervalo: 17-27). Los 9 pacientes consultaron por historia de hipersensibilidad inmediata a calamar (HIC). Una vez reinterrogados, 7 pacientes admitieron la aparición de síntomas de HI tras ingerir gamba. Dos de los pacientes negaron haber comido gamba previamente, por experimentar rechazo inexplicable a dicho alimento. Ocho de los pacientes presentaban rinitis y asma por ácaros y una paciente, rinitis crónica con sensibilización a cucaracha (*B. Germanica*) e intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos. Seis pacientes habían recibido inmu-

noterapia previa frente a ácaros, durante al menos 2 años.

*Test cutáneos (TC).* Ocho pacientes presentaron TC positivos frente a ácaros domésticos y todos ellos exhibieron TC positivos frente a gamba y calamar. Además, los 9 pacientes presentaron TC positivos frente a langosta y centollo y 8 de ellos, TC positivos frente a pulpo. Por lo que respecta a bivalvos, las positividades fueron de 5, 4 y 4 pacientes, para mejillón, almeja y ostra, respectivamente.

*IgE específica.* Siete pacientes presentaron CAP mayor de 0,7 a la batería completa de mariscos (calamar, pulpo, gamba, langosta, centollo, mejillón, almeja, ostra). Un paciente presentó CAP inferior a 0,7 frente a almeja y CAP superior a 0,7 para el resto de especies estudiadas. Los CAP a mariscos bivalvos fueron significativamente inferiores a los de mariscos artrópodos y cefalópodos ( $p < 0,05 - 0,01$ , según las especies consideradas).

En la tabla II se resumen las principales características clínicas de la muestra de pacientes.

*Estudios de CAP-inhibición (CAPI).* En la figura 1 se muestran las CAPI directa e inversa entre los extractos de gamba y de ambos cefalópodos (calamar y pulpo). Se exponen, asimismo, las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada curva, previa transformación semilogarítmica, así como los coeficientes de ajuste de las rectas ( $R^2$ ). En la figura 1a se observa que el extracto de gamba produce una inhibición signifi-

**Tabla II.** Características clínicas de los pacientes

Caso	Sexo	Edad (años)	Enfermedad atópica	Sensibilización a		Síntomas por HIC	Pápula prick (mmØ)		IgE específica		IT
				Ácaros	Cucaracha		Calamar	Gamba	Calamar	Gamba	
1	M	19	R, A	Sí	No	SAO, AEPO	3	7	0,55	34,8	No
2	V	19	R, A	Sí	No	R, A, UAEL, AEPO, SAO, GI	12	8	3,22	8,99	Sí
3	V	20	R, A	Sí	Sí	R, A, UAEG	4	5	1,33	7,56	No
4	V	19	R, A,	Sí	No	R, SAO	5	8	4,66	19,62	Sí
5	M	27	R	No	Sí	R, UAEL, AEPO, UAEG	5	6	0,43	19,9	Sí
6	M	20	R, A	Sí	Sí	R, A, SAO, GI	6	3	4,41	14,3	Sí
7	V	17	R, A	Sí	No	R, SAO	6	3	3,84	18,6	Sí
8	M	24	R, A	Sí	Sí	SAO	17	8	2,16	16,4	No
9	V	21	R, A	Sí	No	R, A, UAEG, SAO	6	7	4,42	>100	Sí

IT = inmunoterapia previa; R = rinoconjuntivitis; A = Asma; HIC = hipersensibilidad inmediata al calamar; UAEG = urticaria/angioedema generalizado; UAEL = urticaria/angioedema localizado; AEPO = angioedema periorbitario; SAO = síndrome de alergia oral; GI = náuseas y/o vómitos; IT = inmunoterapia previa; V = varón; M = mujer.

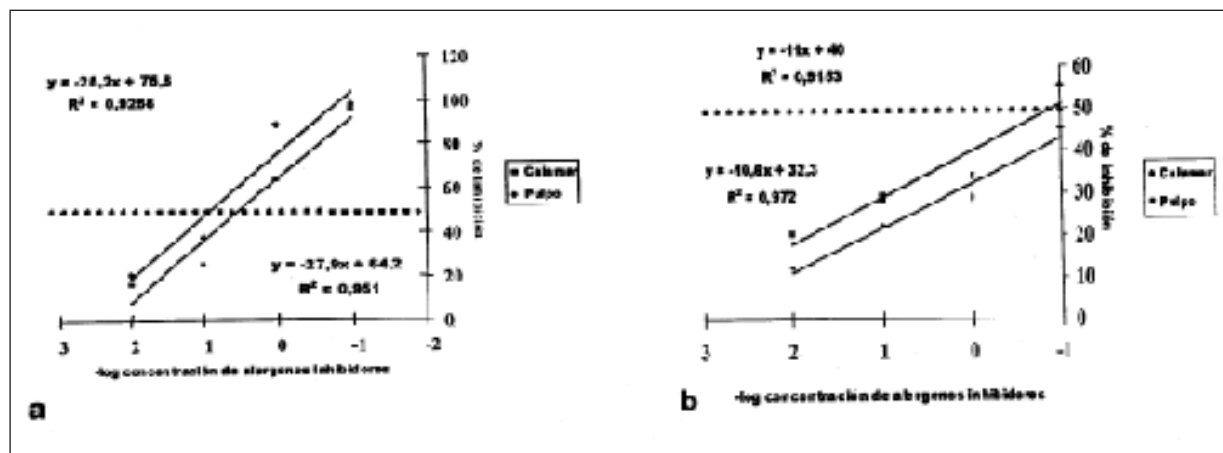


Fig. 1. Curvas de inhibición directa de CAP de pulpo y calamar por extracto de gamba (a) e inhibición inversa de CAP de gamba por extractos de calamar y pulpo (b). Se muestran las ecuaciones de regresión que permitirán calcular el  $_{50\%}$ -CAP-inhibición, así como los coeficientes de ajuste respectivos ( $R^2$ ).

cativa del CAP frente a ambos cefalópodos. Las respectivas concentraciones que produjeron el 50 % de CAPI ( $_{50\%}$ -CAPI) para el extracto de gamba fueron 0,30 mg/ml (p/v) para el CAP de calamar y 0,12 mg/ml (p/v), sobre el CAP de pulpo. En la figura 1b se observa que el extracto de pulpo inhibe parcialmente el CAP de gamba, precisando una  $_{50\%}$ -CAPI alta (9 mg/ml) en p/v. El extracto de calamar no inhibe significativamente el CAP de gamba [con una  $_{50\%}$ -CAPI teórica de 45,7 mg/ml (p/v)].

En la figura 2 se muestran las CAPI de los tres moluscos bivalvos por extracto de gamba (fig. 2a). En la figura 2b, se observan las CAPI de mejillón

por extracto de gamba, calamar y pulpo. Se muestran, asimismo, las respectivas ecuaciones de regresión y los coeficientes de ajuste ( $R^2$ ) de las rectas. Las  $_{50\%}$ -CAPI del extracto de gamba sobre los CAP de mejillón, almeja y ostra fueron, respectivamente, de 0,026, 0,04 y 0,066 mg/ml (p/v) (fig. 2a). En la figura 2b se puede observar la CAPI de mejillón con extractos de gamba, calamar y pulpo, con unas  $_{50\%}$ -CAPI respectivas, de  $12 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$  y  $33 \times 10^{-6}$  mg/ml (p/v).

*Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*. En la figura 3 se muestra la SDS-PAGE de los extractos de gamba y calamar, tratados térmicamente y crudos. Inicialmente, los extractos

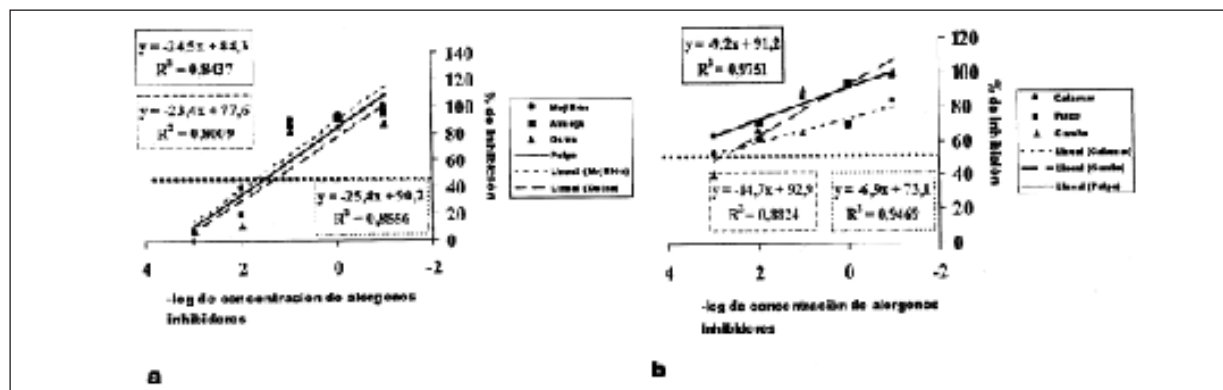
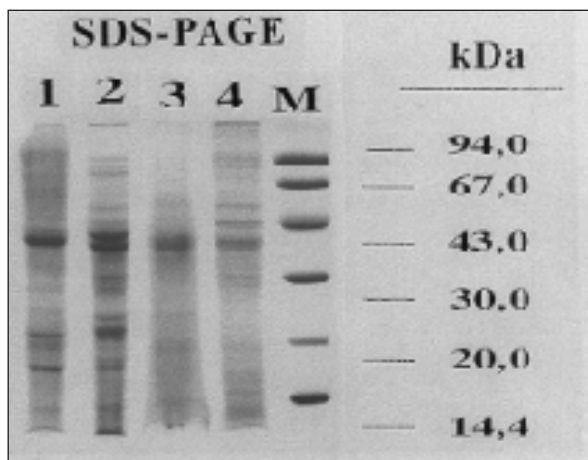


Fig. 2. Curvas de inhibición de CAP de mariscos bivalvos por extracto de gamba (a) e inhibición de CAP de mejillón por extractos de gamba, calamar y pulpo (b). Se muestran las ecuaciones de regresión que permitirán calcular el  $_{50\%}$ -CAP-inhibición, así como los coeficientes de ajuste respectivos ( $R^2$ ).

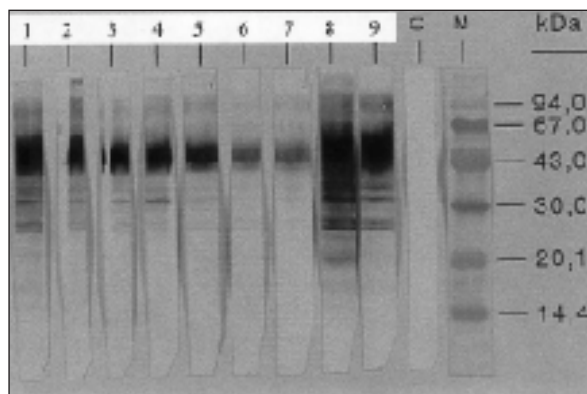


**Fig. 3.** SDS-PAGE de los extractos de calamar y gamba. Calle 1: extracto de gamba cocida. Calle 2: extracto de gamba cruda. Calle 3: extracto de calamar cocido. Calle 4: extracto de calamar crudo; calle M: estándar de Pesos Moleculares.

de gamba contienen mayor número de bandas proteicas que los de calamar, independientemente del tratamiento térmico. En el rango de peso molecular (PM) alto (53,8 kDa a 67,3 kDa), las bandas proteicas aparecen en ambos extractos (gamba y calamar), crudos, pero desaparecen en ambos extractos cocidos. En los rangos de PM bajos (19,6 kDa a 36,3 kDa), ambos extractos de gamba presentan una distribución similar de bandas, con ciertas variaciones (bandas más intensas y numerosas en el extracto crudo que en el tratado térmicamente). Los extractos de calamar carecen de bandas en este rango de PM bajos. Destaca una intensa banda, común a los 4 extractos, aparentemente inalterada por el tratamiento térmico, en torno a los 40,7 kDa. Dicha banda se desdobra en 2 fracciones de 39 kDa y 41 kDa, en el extracto de gamba cruda.

**Immunoblotting.** En la figura 4a se observa el *immunoblotting* con extracto de calamar incubado con el suero de los pacientes. Se observa una gran homogeneidad en el patrón de fijación. Una intensa banda, común a todos los sueros, se sitúa entre los 38,2 kDa y los 42,2 kDa. Otros fragmentos, menos intensos, se hallan localizados entre 26,2 kDa y 35 kDa. Los pacientes 8 y 9 presentan, además, bandas de fijación entre los 16,9 y los 26 kDa.

Debido a la alta concentración de IgE y al exceso de “fondo” en la membrana, se procedió a realizar un nuevo IB con ambos sueros, previamente



**Fig. 4.** *Immunoblotting* de extracto de calamar con los sueros de los pacientes, que presentaban hipersensibilidad inmediata a calamar.

diluidos a 1/10 con extracto de calamar y de gamba (fig. 5). En esta figura se observa que ambos extractos (pretratados o no) exhiben una banda común, en torno a los 40,3 kDa. En los extractos crudos de ambos mariscos, aparece una especie de flecos proteicos, en torno a la banda de 40 kDa, que no se observan en los extractos cocidos.

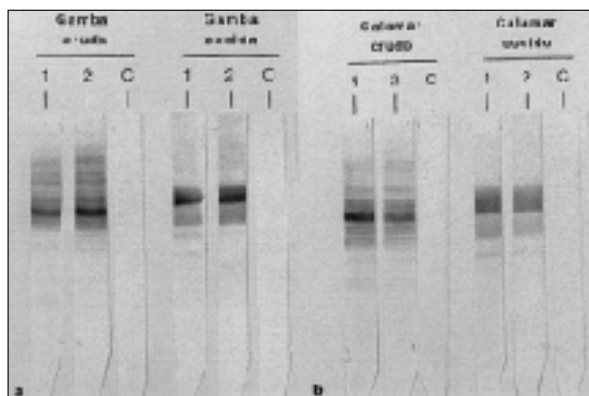
**Immunoblotting con IgG-TMP.** En la figura 6 se observa un IB de los extractos de gamba y calamar, marcados con suero policlonal de conejo frente a TPM de pollo. La IgG policlonal frente a TPM de pollo se fija en una banda situada en los 39 kDa, común a los 4 extractos, que no aparece en las calles control (C), ni existe marcado en el resto de las calles problema, con excepción del fondo que aparece en la calle 4, debido, con toda probabilidad, a un lavado insuficiente del suero policlonal (adsorción inespecífica).

## DISCUSIÓN

Los mariscos constituyen, como grupo alimentario, la primera causa de hipersensibilidad inmediata (HI) por alimentos en nuestro medio. Dentro de los mariscos, la gamba es la que produce reacciones de HI con más frecuencia; el calamar constituye la segunda causa<sup>8</sup>.

Clínicamente, en la presente serie destacan cuatro factores: 1) 8 de 9 pacientes (88 %) presentaban sensibilización a ácaros; 2) 4 de 9 pacientes (44 %) presentaban hipersensibilidad a *B. germanica* (cucaracha) y 3) 8 de 9 pacientes (88 %) eran asmáticos.



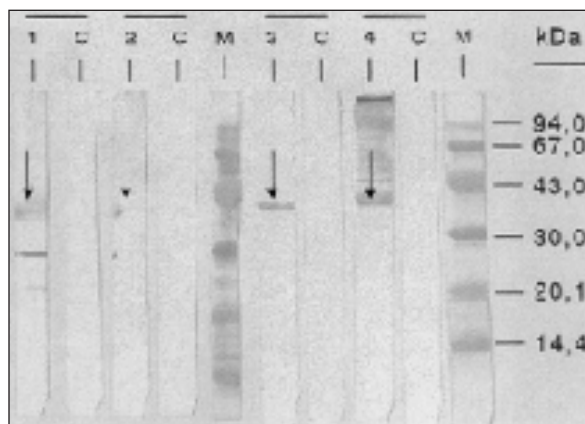


**Fig. 5.** Immunoblotting de los extractos de gamba crudo y cocido (fig. a) y calamar crudo y cocido (fig. b), con los sueros de los pacientes 8 (calles 1) y 9 (calles 2).

La existencia de tan alta prevalencia de sensibilización a ácaros se explica por ser Canarias la región de más altas tasas de exposición a ácaros de todo el país<sup>9</sup>. Sin embargo, así como la HI a ciertos alimentos se asocia con HI a ciertos inhalantes (pólenes, látex, etc.)<sup>7</sup>, aún permanece por explicar la alta tasa de sensibilización a marisco en pacientes de zonas endémicas a ácaros<sup>9</sup>. Parece lógico asumir que fracciones alergénicas con cierto grado de homología pudieran ser las responsables de dicha asociación. Se ha puesto de manifiesto la reactividad cruzada entre el molusco *Helix terrestre* (caracol de tierra) y el *D. pteronyssinus*<sup>11</sup>, pero resultados similares no han podido demostrarse para otros moluscos como el *L. vulgaris*<sup>3</sup>.

La asociación con una alta tasa de sensibilización a cucaracha (44 %) puede explicarse por el hecho de que, aunque nuestros pacientes consultaban por HIC, 7 de ellos (77 %) presentaban sensibilización clínica a gamba, mientras que el 23 % restante presentaban una sensibilización, al menos latente, a dicho marisco. La alergenicidad cruzada entre gamba y camarón (*Crangon crangon*), comunicada previamente<sup>12</sup>, constituye por lo tanto el factor explicativo esencial de la alta tasa de sensibilización a cucaracha en nuestra serie de pacientes.

La presencia de una alta tasa de asma atópica podría explicarse por la alta exposición a ácaros previamente mencionada. Es un hecho bien conocido que los ácaros constituyen un alérgeno de gran potencia asmogénica<sup>13</sup>. En segundo lugar,



**Fig. 6.** Immunoblotting de los extractos de calamar crudo (1), calamar cocido (2), gamba cruda (3) y gamba cocida (4), con suero policlonal de conejo frente a tropomiosina de pollo. C: control con extracto de *Lolium perenne*. M: estándar de Pesos Moleculares.

los pacientes con HI por alimentos suelen presentar una mayor tasa de asma que los sensibilizados a inhalantes exclusivamente<sup>14</sup>. Finalmente, la presencia de asma atópica no parece asociarse solamente con una mayor posibilidad de HI por alimentos, sino que es considerada, por algunos autores<sup>15</sup>, como un riesgo de anafilaxia fatal por alimentos.

La ausencia, en nuestra casuística, de pacientes sensibilizados a calamar en ausencia de sensibilización a gamba concomitante<sup>8</sup>, hacía presumir que ambos alérgenos pudieran compartir epítomos comunes. La existencia de pacientes afectados de HI a gamba, sin sensibilización a calamar acompañante, apoya fuertemente el hecho de que la sensibilización a gamba debe ser primaria y que la sensibilización a calamar aparece de forma secundaria. La asociación clínica de hipersensibilidad a calamar y gamba fue comunicada en 1992 por Carrillo *et al.*<sup>2</sup> y trabajos posteriores han confirmado la existencia de una reactividad cruzada entre ambos<sup>3</sup>. La responsabilidad de dicha reactividad cruzada se suponía que recaía en la TPM muscular, suposición confirmada recientemente<sup>5</sup>.

En la CAPI directa e inversa entre los extractos de gamba cocida, por un lado, y pulpo y calamar cocidos, por el otro (fig. 1), el extracto de gamba muestra más potencia que los de cefalópodos (pulpo y calamar). Dentro de estos dos últimos, el extracto de pulpo parece ser más potente que el de

calamar y sus alérgenos comunes presentan mayor homología con los del extracto de gamba, tal y como demuestran las  $_{50\%}$ -CAPI respectivas.

La figura 2 muestra que el extracto de gamba inhibe significativamente a los 3 extractos de bivalvos estudiados, pero que los cefalópodos también inhiben significativamente, con un  $_{50\%}$ -CAPI inferior a la del extracto de gamba, a los extractos de mejillón. Este hecho denota que los alérgenos de cefalópodos deben presentar una homología intermedia a la/s fracción/es alérgicas comunes, entre la gamba y los bivalvos. La homología entre cefalópodos y bivalvos es más explicable por el hecho de que ambos grupos pertenecen al *Phylum Mollusca*. La homología de los moluscos y los cefalópodos es más difícil de explicar desde un punto de vista exclusivamente filogenético.

En este estudio se pone de manifiesto que los extractos de gamba poseen más bandas de proteína en la SDS-PAGE que los de calamar (fig. 3). Asimismo, los extractos crudos de ambos mariscos poseen un mayor número de bandas que los tratados térmicamente. Esta desaparición de bandas podría deberse a que dichas bandas fuesen componentes fraccionados de la propia TPM, que formaran macroagregados con el calor o a que se trate de proteínas termolábiles que desaparecen tras el tratamiento con calor.

En la figura 4 se puede observar un patrón alérgico extremadamente homogéneo para los 9 pacientes. Los pacientes 8 y 9 producen una gran cantidad de IgE específica que provoca un exceso de fondo en la membrana, pero su patrón es similar al de los 7 pacientes restantes. En cualquier caso, si se prescinde del fondo residual en las membranas y se utilizan los sueros de los pacientes 8 y 9, convenientemente diluidos (fig. 5), se observa que en los extractos crudos, tanto la banda de 40 kDa, como en los flecos proteicos, situados en torno a ella, fijan IgE específica. En los extractos tratados térmicamente, la fijación de IgE ocurre, solamente, a nivel de los 40 kDa.

La figura 6 nos da una idea más exacta de la naturaleza de dicha banda de 40 kDa. El grado de tinción es más intenso en los extractos de gamba, térmicamente tratados o no, probablemente por dos razones: la cantidad de TPM, a juzgar por las figuras 1, 2 y 5, debe ser mayor en la gamba y es bastante probable que el grado de homología de la TPM de pollo con la de gamba (60 %), sea mayor que el de la TPM de calamar.

Puede afirmarse, pues, que la TPM o una proteína de gran homología con ella, constituye el alérgeno mayor del calamar (*Loligo vulgaris*). No se ha detectado ninguna otra fracción proteica ni alérgica de trascendencia clínica para la serie de pacientes estudiada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Productos de la Pesca en la Alimentación en España 1992. Madrid: Secret. Gal. Téc. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 1992; 97-110.
2. Carrillo T, Castillo R, Caminero J, Cuevas M, Rodríguez JC, Rodríguez de Castro F. Squid hypersensitivity: a clinical and immunological study. *Ann Allergy* 1992; 68: 483-7.
3. Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Hipersensibilidad a cefalópodos: características clínicas y reactividad cruzada con inhalantes. *Rev Esp Alerg Inmunol Clin* 1995; 10: 183-8.
4. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, et al. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *J Immunol* 1993; 151: 5354-63.
5. Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, et al. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 948-53.
6. Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, Berger U, et al. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 196-206.
7. Kraft D, Valenta R, Hames BD. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En: Hames BD, Rickwood D, ed. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. Oxford: IRL Press Lt 1981; 1-92.
8. Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Shellfish hypersensitivity: clinical and immunological characteristics. *Allergol Immunopathol* 1994; 22: 83-7.
9. García Robaina JC, Torre Morin F, Bonnet Moreno CG, Antolin Arias J, Pérez Santos C, Sánchez Covisa A. House dust mites and Der p I in Tenerife (Canary Islands, Spain): the relative importance other non Dermatophagoides spp mites. *Madrid. Allergol Immunopathol* 1996; 24: 135-8.
10. Blanco C, Carrillo T, Castillo R, Rodríguez de Castro F, Barrera Ramírez E, Cuevas M. Alergia al aguacate. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1993; 8: 211-8.



11. Guilloux L, Vuitton DA, Delbourg M, Lagier A, Adessi B, Marchand CR, et al. Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*). II. In vitro study. *Allergy* 1998; 53: 151-8.
12. Pascual CY, Crespo JF, San Martín 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.
13. Duff AL, Platts-Mills TA. Allergens and asthma. *Pediatr Clin North Am* 1992; 39: 1277-91.
14. Bjornsson E, Janson C, Plaschke P, Norman E, Sjoberg O. Prevalence of sensitization to food allergens in adult Swedes. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 327-32.
15. 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.

R. Castillo  
Sección de Alergología  
Hospital Univ. Ntra. Sra. del Pino  
Angel Guimerá 93  
35004 Las Palmas de Gran Canaria