



Anisakis y alergia

María del Carmen Cuéllar del Hoyo
Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Excelentísimo Señor Presidente, Excelentísimos Señores y Señoras Académicos, Señores y Señoras, muchas gracias por la invitación a este foro académico y especialmente al Profesor Doctor Don Antonio Ramón Martínez Fernández quien me sugirió la preparación de esta conferencia sobre las aportaciones realizadas a lo largo de los últimos años en el campo de los anisákidos y su relación con la alergia. Con la venia, a continuación paso a exponer la presentación.

Los anisákidos son nematodos incluidos en la Clase Chromadorea, Orden Rhabditida, Suborden Rhabditina, Infraorden Ascaridomorpha, Superfamilia Ascaridoidea, Familia Anisakidae.

Dentro del género *Anisakis* se incluyen al menos nueve especies, estando las más estudiadas incluidas dentro del complejo *Anisakis simplex*.

Los anisákidos adultos viven en el estómago de los mamíferos marinos eliminando huevos que se embrionan en el medio externo. Las larvas de primer estadio mudan a larva de segundo estadio que, tras la eclosión, serán ingeridas por los hospedadores intermediarios que son pequeños crustáceos planctónicos, donde mudan a larvas de tercer estadio, las cuales ya son infectantes para los hospedadores definitivos. Los peces y cefalópodos que intervienen en estas cadenas alimentarias actúan como hospedadores paraténicos acumulando larvas infectantes y facilitando la llegada de estas a los hospedadores definitivos.

Los anisákidos tienen distribución cosmopolita derivada de los hábitats de sus hospedadores, dándose la paradoja de que un ecosistema marino sano es aquel que presenta un alto nivel de infecciones por estos nematodos.

Las larvas de tercer estadio se encuentran en la cavidad abdominal de los pescados, enrolladas en espiral y rodeadas de una cápsula y, al morir estos, comienzan una migración abdomino-muscular acumulándose en la musculatura.

La especie *Anisakis simplex*, principal implicada en los procesos patológicos humanos, es de color blanquecino y mide entre 1 y 3 cm. Se caracteriza por presentar una boca típica de ascárido con un diente asimétrico. El esófago carece de apéndices ventriculares y el intestino de ciegos. El extremo posterior presenta mucro.

Según el informe elaborado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2010 todos los pescados destinados al consumo humano están potencialmente parasitados alcanzando tasas cercanas al 100% en muchos casos.

El informe recoge, asimismo, los efectos que los diferentes tratamientos culinarios producen sobre la viabilidad de las larvas, observando que la congelación y el calentamiento son los únicos eficaces en conseguir su eliminación.

Respecto al posible riesgo de parasitación de pescados de acuicultura, el informe de la EFSA no es concluyente ya que solo existen datos en el caso del salmón. A pesar de ello, la agencia alerta de un posible riesgo cuando los ejemplares son alimentados con comida fresca no procesada o cuando se capturan larvas o ejemplares jóvenes para engordarlos posteriormente en cautividad. En España concretamente no existe ningún riesgo ya que en un estudio encargado por el ministerio de agricultura se evaluaron 1000 ejemplares de dorada, lubina, rodaballo y corvina procedentes de 45 granjas y no se observó presencia de larvas de tercer estadio de *Anisakis* en ninguno de los ejemplares.

La filogenia de los parásitos se mira al espejo de la de sus hospedadores. La especiación del género *Anisakis* se habría producido por aislamiento geográfico de sus hospedadores como consecuencia de las condiciones climáticas extremas y adaptación de las poblaciones de parásitos.

¿De dónde vienen los hospedadores? Los cetáceos evolucionaron a partir de un grupo de ungulados y están emparentados directamente con los hipopótamos. Surgieron a partir de un cetáceo anfibio extinto hace unos 45 millones de años llamado *Pakicetus*. Esto quiere decir que volvieron de la tierra al mar, llevándose los precursores de los anisákidos adquiridos previamente en las etapas terrestres.

¿De dónde vienen los parásitos? Los nematodos están incluidos en los Ecdysozoa un grupo de invertebrados que mudan junto a los artrópodos.

¿De dónde vienen los anisákidos? De los ascáridos. Dentro de éstos, el género *Ascaris* es el único que completa el ciclo biológico en el hombre por eso será el mejor adaptado y el que ha convivido más tiempo con él, por lo que la mayoría de las infecciones son ligeras y asintomáticas.

Como consecuencia de esta adaptación, los helmintos pueden modular la respuesta inmunológica de sus hospedadores actuando sobre las células de la inmunidad innata,

inhibiendo la producción de mediadores inflamatorios y favoreciendo la liberación de citoquinas inmuno-reguladoras, como IL-10 o TGF- β , lo que tiene como consecuencia la generación de linfocitos T reguladores, la expansión de linfocitos Th2 y la modulación negativa de los clones de linfocitos T de fenotipo pro-inflamatorio. Esto, indirectamente, puede tener como consecuencia la mejoría de las afecciones autoinmunes, así como, la prevención del desarrollo de alergias.

Pero debido a que el ser humano no es un hospedador natural de este parásito y que el parasitismo por *Anisakis* es sólo agudo o "intermitente", carecería de las características inmuno-reguladoras típicas de las helmintosis crónicas causando por ello siempre enfermedad.

La anisakiosis se produce tras la ingestión de las larvas vivas de tercer estadio y según la localización de las lesiones se puede considerar gástrica, intestinal o ectópica. Cuando se manifiestan síntomas alérgicos acompañado a las manifestaciones digestivas se considera anisakiosis gastro-alérgica.

En 2002 se abrió el debate sobre si las larvas de tercer estadio de *Anisakis* tenían que estar vivas para producir los síntomas alérgicos.

A pesar de que ningún estudio hasta la fecha ha confirmado científicamente que los materiales procedentes de las larvas no viables de *Anisakis* sean capaces de inducir reacciones alérgicas agudas en el ser humano, hay gran cantidad de publicaciones científicas que enfocan *a priori* la alergia a *Anisakis* como si se tratara de un alergeno alimentario. Por ello es necesario analizar la relación entre los parásitos y las alergias para mejorar nuestra comprensión de la alergia a *Anisakis* y el papel de la IgE en esta parasitosis.

Según el informe elaborado por la EFSA, *Anisakis* es el único parásito de los productos de la pesca implicado en reacciones alérgicas, incluyéndose también como factor etiológico en las directrices para la evaluación de la anafilaxia.

La alergia a *A. simplex* fue descrita por primera vez en Japón en 1990, pero el auge de las publicaciones en el campo de la alergia frente a dicho parásito se inició tras la descripción en España de nuevos casos de anafilaxia inducida por *A. simplex* en 1995. Se demostró que los pacientes con síntomas alérgicos agudos tras el consumo de pescado parasitado mostraban IgE específica frente a este nematodo parásito y, por ello, desde entonces se le ha considerado como un potencial alergeno y muchas investigaciones se han llevado a cabo siguiendo un protocolo clásico de alergia a alimentos.

En el caso de *A. simplex* se han caracterizado varios alérgenos y algunos de ellos han sido denominados alérgenos principales y/o panalérgenos, los cuales podrían ser causantes de la aparición de reacciones cruzadas provocando la aparición de falsos positivos en el diagnóstico.

Esta circunstancia ha llevado a varios autores a indicar que la reactividad cruzada es responsable de la aparición de 'falsos positivos' cuando se detecta IgE específica en sujetos sin antecedentes clínicos de alergia a *Anisakis*. Sin embargo, utilizando métodos de elevada especificidad como la técnica de ELISA-UA3, se ha demostrado que la detección de IgE específica en población sana, es debida a anteriores episodios de parasitación por *A. simplex* dadas las elevadas tasas de parasitación en los pescados que se consumen en nuestro entorno, no observándose reacción cruzada con sueros de pacientes alérgicos a ácaros o pólenes. Se demostró que la elevada seroprevalencia de la anisakiosis en Madrid, más del 12% en población sana, está relacionada con los hábitos de consumo de pescado. La seropositividad fue más prevalente entre los consumidores de pescado fresco aumentando con la frecuencia de consumo. Todos los sujetos seropositivos eran consumidores habituales de pescado crudo en distintas preparaciones como boquerones en vinagre, ahumados o marinados. También se observó relación entre la seropositividad y la utilización de métodos culinarios que no garantizan la muerte de las larvas como el microondas o el rebozado. Todos estos hechos sugieren que la infección con las larvas vivas es necesaria para la seropositividad.

Además, varios estudios clínicos han demostrado que los síntomas agudos alérgicos tales como urticaria, angioedema o anafilaxia se producen sólo cuando las larvas vivas de *A. simplex* parasitan el tracto gastro-intestinal causando anisakiosis gastro-alérgica.

Basándose en estos hechos las normas para la prevención de la parasitación por *Anisakis* consisten simplemente en evitar la ingestión de pescados que puedan contener larvas vivas. En general se recomienda consumir los pescados bien cocinados (> de 60°C) y si van a ser consumidos crudos y/o ahumados seguir la normativa europea de congelar previamente el pescado a -20°C durante un período mínimo de uno a siete días.

A pesar de que se han descrito reacciones alérgicas, incluyendo anafilaxis, después de la ingesta de pescados supuestamente bien cocinados, siendo atribuidas al contacto con alérgenos procedentes de *Anisakis* no viables, el nuevo concepto de anisakiosis gastro-alérgica implicaba que la reacción de hipersensibilidad clínica se produce por la respuesta inmunitaria inducida tras el parasitismo agudo por *A. simplex* y es importante resaltar que no existen datos que hayan demostrado ningún resultado positivo con pruebas de provocación utilizando material procedente de larvas de *A. simplex* no viables.

Pero entonces ¿cuál es el papel de la IgE estimulada por los antígenos larvarios de *A. simplex*? Hemos dicho que la mayoría de las investigaciones en torno a *A. simplex* se han llevado a cabo siguiendo protocolos clásicos de estudio de alérgenos alimentarios. El modelo clásico de alergia a los alimentos se basa en que la IgE, producida como consecuencia al estímulo alérgico y que es retenida por los receptores de alta afinidad FcεRI de los mastocitos, reconoce el alérgeno en sucesivos contactos lo que provoca la degranulación de los mastocitos en los tejidos, provocando los típicos síntomas de la hipersensibilidad de tipo I, tales como los que se ven en la alergia a alimentos y también en la anisakiosis gastro-alérgica. Esto se puede comprobar

porque la IgE específica producida en ambos casos (alergia alimentaria o alergia a *Anisakis*) puede ser detectada por una prueba cutánea (*Skin Prick Test*) y también se puede medir en el suero de los pacientes.

Se ha demostrado que los pacientes con anisakiosis gastro-alérgica muestran una estimulación policlonal dinámica después del contacto con los parásitos. La IgE específica aumenta después de un mes para luego descender lentamente a los seis meses o un año del contacto con los parásitos y los estudios mediante *western-blot* demuestran que se producen nuevas especificidades de la IgE, aumentando el reconocimiento de proteínas sobre los extractos crudos larvarios, así como sobre los productos de excreción-secreción.

Pero la IgE no es el único isotipo de inmunoglobulina que se produce, sino que también pueden ser detectadas IgG específica, IgG4, IgA e IgM frente a *A. simplex* en el suero de pacientes con anisakiosis gastro-alérgica.

En conclusión, la anisakiosis se puede considerar una entidad intermedia entre la alergia y el parasitismo.

En la anisakiosis la sensibilización temprana se tiene que producir cuando la larva viva de tercer estadio de *A. simplex* intenta penetrar en la mucosa gastro-intestinal y, dentro de un ambiente de polarización Th2, finalmente se produce la IgE específica frente a los productos de excreción-secreción así como frente a los antígenos de superficie o somáticos. Esto se traduce en la presencia de IgE circulante, así como de IgE unida al receptor de alta afinidad FcεRI de los mastocitos localizados, no solamente a nivel de la submucosa, sino también en otros órganos diana, tales como la piel. La existencia de mastocitos sensibilizados después de un episodio de parasitación previa se puede demostrar mediante la observación de resultados positivos en las pruebas cutáneas.

Si posteriormente la larva viva de tercer estadio penetra el epitelio gástrico en un nuevo episodio después de la sensibilización, las proteasas producidas por el parásito junto con otros productos de excreción-secreción ayudarán a la larva a migrar a través del epitelio y a evadir distintos mecanismos de la respuesta inmune, por ejemplo, la acción protectora de la IgA secretora podría ser anulada por las cantidades masivas de productos de excreción-secreción que tienen acceso a la sub-mucosa los cuales, posteriormente, podrían llegar también a los órganos diana tales como la piel a través de la circulación. Algunos de estos productos de excreción-secreción son moléculas de naturaleza alérgica, que se pueden unir a las moléculas de IgE que se encuentran en las membranas de los mastocitos, produciendo el entrecruzamiento de las moléculas de los receptores FcεRI y, consecuentemente, producen la activación y degranulación de estas células y la liberación de histamina. También se liberarán otros mediadores y citoquinas y comenzará una serie de eventos que conducen a una respuesta inflamatoria local en los casos de anisakiosis gástrica que pueden ir acompañados de síntomas alérgicos, como son la urticaria o la anafilaxia, en pacientes susceptibles apareciendo los cuadros típicos de anisakiosis gastro-alérgica. Hay que señalar que, en determinados individuos, en los que no se han manifestado estos síntomas agudos,

pueden aparecer manifestaciones urticariales crónicas asociadas a la sensibilización al parásito.

Los síntomas de la alergia aguda aparecen sólo en el contexto del parasitismo agudo cuando alguno de los productos de excreción-secreción se secreta activamente a la sub-mucosa cuando la larva penetra en el tracto gastrointestinal. El alérgeno *Ani s 7* es una proteína de excreción-secreción producida activamente por las larvas de tercer estadio de *A. simplex* durante la fase aguda de la infección y, aunque casi el 100% de los pacientes de anisakiosis gastro-alérgica presentan anticuerpos IgE frente a este alérgeno, todos toleran la ingesta de pescado bien cocinado, a diferencia de lo que ocurre en las alergias de tipo alimentario.

¿Por qué estos pacientes podrían haber desarrollado esta tolerancia? En sucesivos contactos con los antígenos larvarios, los factores de protección podrían impedir que los mastocitos sensibilizados de la sub-mucosa y de otros órganos diana entren en contacto con los alérgenos. Estos factores podrían incluir IgA secretora, IgA circulante o tisular o IgG4, que compiten por los alérgenos, o factores inmunomoduladores secretados por las larvas de *A. simplex* al igual que ocurre en otras helmintosis.

Es posible que las larvas de *Anisakis* hayan desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica en su propio beneficio, como por ejemplo, la capacidad de suprimir respuestas Th1, que se demuestra por su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico por macrófagos activados, habiéndose también confirmado su potencial anti-inflamatorio por la presencia de moléculas tipo-IL4 y por su actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento.

En ratones experimentalmente infectados se ha observado que la inyección previa de antígeno inhibe los procesos inflamatorios inducidos por las larvas vivas. Esta inyección previa también provocó una reducción significativa de las células CD45+ y CD8+ y también del porcentaje de proliferación celular.

En estudios realizados en modelos murinos se ha observado que, tanto los productos de excreción-secreción como el antígeno total larvario de *A. simplex* producen células dendríticas tolerogénicas que inducen la expansión de linfocitos T reguladores funcionales *in vitro*.

En otras enfermedades de tipo alérgico, la IgG4 específica se ha asociado con la protección, incluso cuando la IgE específica está presente.

En los pacientes analizados por nosotros, los valores de IgG4 fueron superiores en el grupo de anisakiosis gastro-alérgica al compararlos con los de pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*, del mismo modo que los valores de IgE, pero, cuando se calculó el porcentaje de positivos, en el caso de la IgG4 se obtuvieron más sueros positivos en el caso de pacientes de anisakiosis gastro-alérgica, frente a ambos alérgenos principales *Ani s 1* y *Ani s 7*.

Se calculó el cociente entre IgG4/IgE y en el caso de *Ani s 7* resultó ser superior en anisakiosis gastro-alérgica, no observándose diferencias significativas ni en el caso de

Ani s 1 ni con el antígeno total larvario, confirmándose que la IgG4 anti-*Ani s 7*, además de ser un factor de protección, es un marcador independiente de anisakiosis gastroalérgica.

Al analizar los índices de avidéz de las inmunoglobulinas específicas en estos pacientes se observó que la avidéz de la IgG era significativamente mayor en anisakiosis gastroalérgica mientras que hubo una tendencia a una menor avidéz de la IgE en este mencionado grupo al compararlo con los pacientes de urticaria crónica asociada a sensibilización, observándose correlación negativa entre los niveles de IgE y los valores de avidéz de esta inmunoglobulina. En los pacientes de anisakiosis gastro-alérgica se observó correlación negativa de la avidéz de la IgE con el tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas y correlación positiva con la frecuencia de consumo de pescado.

Ya hemos visto que puede no ser correcto seguir aplicando los dogmas de la alergia en el campo de la parasitología. En primer lugar, no existe uniformidad en la definición de alérgeno. Todas las definiciones son uniformes con respecto a la afirmación de que un alérgeno es un antígeno capaz de producir anticuerpos IgE, la mayoría, pero no todas, incorporan un requisito adicional: es necesario un estado atópico a fin de responder con una reacción de hipersensibilidad. Lo más importante, sin embargo, es que la definición rara vez incluye la necesidad de que el alérgeno sea un antígeno no parasitario. Esto último sería lógico, ya que la respuesta de IgE frente a helmintos es universal en los mamíferos y se admite que el sistema inmunológico evolucionó en presencia de los helmintos.

Otro punto discordante es que, dos proteínas derivadas de *A. simplex* denominadas *Ani s 2* y *Ani s 3* han sido designados como panalergenos, pero, a diferencia de lo que ocurre en la alergia alimentaria, donde la presencia de panalergenos explica las manifestaciones clínicas producidas por las fuentes de antígenos diferentes que contienen estos panalergenos, hasta ahora no se ha demostrado que existan panalergenos derivados de *A. simplex* que sean clínicamente relevantes.

Por ejemplo, *Ani s 3*, la tropomiosina de *A. simplex*, se ha caracterizado como un alérgeno, pero se ha encontrado que sólo una pequeña proporción de los sueros de individuos alérgicos a *Anisakis* reconocen este alérgeno.

Teniendo en cuenta que la tropomiosina está considerada como el alérgeno principal de gambas y langostinos y un panalérgeno entre los invertebrados parece necesario cuestionarse si la tropomiosina de *A. simplex* puede considerarse como un verdadero panalérgeno y, si dependiendo del número de individuos que la reconocen, pudiera ser considerada como un alérgeno principal de *Anisakis*.

Ya que existe una elevada identidad de las tropomiosinas pertenecientes a un mismo grupo zoológico se probó su utilidad como marcador evolutivo. Tras el análisis filogenético se constató la utilización de la tropomiosina como una molécula útil para estudiar cambios evolutivos y relaciones filogenéticas, observándose una clara separación entre tropomiosinas alérgicas de invertebrados y las no alérgicas de

vertebrados. Así mismo, en las tropomiosinas de invertebrados se han encontrado cambios aminoacídicos clave para la formación de plegamientos, que no existen en las de vertebrados y que pueden ser responsables de la antigenicidad. En las tropomiosinas de vertebrados estudiadas existe un predominio de alfa hélice del 95%, que disminuye hasta un 85% en las de algunos invertebrados, pero, curiosamente, las tropomiosinas de los parásitos presentan unos porcentajes de hélice alfa más altos y que se asemejan al de la tropomiosina de pollo.

Mediante el uso del programa Discotope 2.0 que predice epitopos B conformacionales a partir de estructuras proteicas tridimensionales se confirmó que el grupo de los parásitos presenta valores de *discotope score* intermedios entre vertebrados e invertebrados. El epitopo central previamente caracterizado en la tropomiosina de langostino *Lit v 1* mostró similitud entre *Anisakis* y *Ascaris* y entre estos con las tropomiosinas de crustáceos productores de alergias.

Este hecho podría estar implicado en los fenómenos de urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*. Como ha sido mencionado, la urticaria crónica se ha asociado con episodios de parasitismo previo por larvas de *Anisakis*, aunque los mecanismos etiopatogénicos no han sido dilucidados. Es interesante señalar que, como se ha indicado anteriormente, los niveles más bajos de IgG4 específicas frente a los antígenos de *A. simplex* se detectan en individuos que presentan reacciones urticariales crónicas. Por lo tanto, no se puede descartar que, en algunos casos en los que pueda coexistir alguna alteración de la permeabilidad intestinal, como suele ocurrir en la alergia alimentaria, con baja o nula producción de IgG4 o IgA específicas, podría ocurrir que los alérgenos procedentes de las larvas muertas o de otros organismos incluidos en la alimentación que comparten epitopos comunes, aunque fuera en cantidades bajas, se pusieran en contacto con las células cebadas de la submucosa produciendo una reacción urticarial prolongada o crónica.

Como consecuencia de estos estudios y teniendo en cuenta que ninguna tropomiosina de vertebrados ha sido caracterizada como alérgeno, con la excepción de *Ore m 4* la tropomiosina de la de tilapia, y gracias a las observaciones realizadas en cuanto a la predicción de plegamientos en hélice alfa que sitúan a las tropomiosinas de pescados más próximas a las de invertebrados, se planteó la cuestión de la posible alergenidad de las tropomiosinas de pescados en general.

Por ello, se realizó el seguimiento de una paciente con historia de alergia a ácaros del polvo, cucaracha y marisco que comenzó a presentar síntomas tras la ingesta de algunos pescados. Hay que resaltar que el paciente presentaba prueba cutánea positiva a *Anisakis* así como IgE específica de *Ani s 3* que es la tropomiosina de *Anisakis*, pero era negativo a *Ani s 7*, alérgeno de *Anisakis* que es indicador de parasitación aguda previa. Se realizó la técnica de *western-blot* utilizando extractos de diferentes organismos vertebrados e invertebrados.

El suero del paciente reconoció todas las tropomiosinas de todas las especies de invertebrados analizadas. El paciente no reconoció la tropomiosina de ninguna de las especies de pescado que toleraba. Por el contrario, todos los pescados que le

producían los síntomas alérgicos revelaron bandas de IgE frente a tropomiosina, excepto la raya y el gallo. Estos resultados confirman la importancia y relevancia clínica de algunas tropomiosinas de vertebrados.

Otro factor que afecta a la consideración de los diferentes antígenos de *Anisakis* como alérgenos principales es el tiempo transcurrido entre el episodio gastroalérgico y el análisis de suero. En estudios realizados con los alérgenos recombinantes *Ani s 1* y *Ani s 7* se han observado descensos de hasta casi un 90% en los niveles de IgE específica detectada por ELISA tras uno o dos años de seguimiento.

Otra posible malinterpretación producida por la aplicación de los dogmas de la alergia a la parasitología se aprecia al aplicar la definición de alérgenos principales, los cuales deberían ser reconocidos por más del 50% de los pacientes sensibilizados frente a *Anisakis*. El primer alérgeno principal que se describió, el *Ani s 1*, se comporta como alérgeno principal sólo después de un episodio de anisakiosis gastro-alérgica ya que es reconocido por más del 80% de los pacientes, pero sólo es detectado por el 42% de los casos en los que la IgE específica frente a *Anisakis* se asocia con urticaria crónica. Por el contrario, *Ani s 7* es altamente reconocido tanto después de un episodio de anisakiosis gastro-alérgica, como en urticaria crónica asociada a *Anisakis*, con más del 90% de los individuos positivos en ambos casos. Este hecho pone de relieve la existencia de un contacto parasitario anterior en casi la totalidad de los pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*.

En conclusión, la anisakiosis gastro-alérgica y la urticaria crónica asociada a sensibilización a *A. simplex* difieren en su respuesta de IgE e IgG4, tanto frente al antígeno total como a alérgenos determinados.

Por ese motivo en un estudio posterior se midieron anticuerpos de los isotipos IgE e IgG4 frente a la hemoglobina de *A. simplex* en sueros de estos pacientes. Para ello se utilizó un ELISA captura empleando el anticuerpo monoclonal 4/E8g capaz de reconocer tanto la hemoglobina de *Anisakis* como la de *Ascaris*.

En el 63,4% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* se detectó IgE específica de la hemoglobina de *Anisakis*. Al ser reconocida por más del 50% de los individuos sensibilizados se consideró un nuevo alérgeno principal y fue nombrado como *Ani s 13* siguiendo las normas de nomenclatura internacional de alérgenos.

Al realizar el análisis por separado, se vio que el 80,9% de los sueros del grupo de anisakiosis gastro-alérgica fueron positivos, frente un 47,8% de los pacientes de urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*. En el caso de la IgG4, el 31,8% de los individuos sensibilizados resultaron positivos (47,6% en anisakiosis gastro-alérgica y 17,3% en urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*). Estos resultados ponen otra vez de manifiesto la diferente respuesta de las dos entidades clínicas alérgicas asociadas a la parasitación por *Anisakis*.

Sorprendentemente, ninguno de los sueros mostró niveles de anticuerpos IgE detectables frente a la hemoglobina de *Ascaris*.

Por ello, se realizó un estudio *in silico* de los epitopios B de ambas moléculas tomando como modelo la estructura de *Chi t 1*, que es la conocida hemoglobina alérgica de *Chironomus tumi tumi*, observando la existencia de cinco epitopos en la hemoglobina de *Anisakis* y solo cuatro en la de *Ascaris*, con diferentes valores de propensión para ser epitopo obtenidos por *discotope score*. Esto podría explicar la ausencia de reacción cruzada y hacen de este alérgeno un potencial candidato para el desarrollo de herramientas diagnósticas más específicas.

Hemos dicho que, aplicando las leyes de la biología evolutiva a este nematodo, la elevada prevalencia de enfermedades alérgicas clínicamente subsecuentes al parasitismo por *A. simplex* se podría atribuir al hecho de que el ser humano no es un hospedador natural de este parásito, y que el parasitismo por *Anisakis* es sólo agudo o "intermitente" y, por lo tanto, carece de las características inmuno-reguladoras típicas de las helmintosis crónicas, incluso se ha propuesto que la urticaria podría ser el resultado clínico exagerado de un mecanismo inmunológico beneficioso conservado evolutivamente y que permite la eliminación de las larvas a las pocas horas de la ingestión de pescado parasitado.

Para dilucidar la implicación de los posibles mecanismos inmunomoduladores en el hospedador humano, se ha estudiado el balance de citoquinas pro/antiinflamatorias en pacientes diagnosticados previamente de parasitación por larvas de *A. simplex*, tanto en muestras de suero como en sobrenadantes de cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica.

Al investigar los niveles de citoquinas en sueros de pacientes diagnosticados de anisakiosis se demuestra que, el contacto previo con los antígenos liberados por las larvas vivas de *A. simplex* se asocia con un incremento de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β , con valores significativamente más altos en los casos de anisakiosis gastro-alérgica. Esto sugiere que el contacto continuado con antígenos del parásito a través de la ingestión de pescado parasitado con larvas vivas, mimetiza los efectos moduladores de los parasitismos crónicos en individuos genéticamente predispuestos.

Este hecho se confirmó al utilizar sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica obtenidos de los pacientes donde, tras la estimulación con el antígeno, los valores de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 fueron superiores en anisakiosis gastro-alérgica, mientras que la producción de la citoquina pro-inflamatoria IFN- γ fue mayor en urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* que en anisakiosis gastro-alérgica, lo que en otras palabras quiere decir que el fenotipo de anisakiosis gastro-alérgica produce una respuesta anti-inflamatoria mayor que el de urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*, el cual produce más citoquinas pro-inflamatorias.

El aumento de IL-10 estuvo asociado con la mejoría de los síntomas en los pacientes de urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*. Por el contrario, no se observó mejoría en los pacientes que hicieron dieta exenta de pescado que reduciría el contacto con antígenos derivados de las larvas.

Otro aspecto a tener en cuenta son las infecciones concomitantes o poliparasitismos, donde los diferentes parásitos pueden inducir diferentes respuestas, por ejemplo, un protozoo puede polarizar la respuesta hacia un fenotipo Th1 mientras que los helmintos inducen un fenotipo Th2 o regulador. La cuestión es que la coexistencia de tales parásitos en el mismo hospedador puede influenciar las respuestas inmunológicas frente a las distintas especies afectando la resistencia, la susceptibilidad y las manifestaciones clínicas. Estos hechos pueden estar también afectando las manifestaciones clínicas de los pacientes tras el contacto con los antígenos larvarios de *A. simplex* dependiendo de la coexistencia de otros agentes infecciosos propios de nuestro entorno.

Por ese motivo, teniendo en cuenta que *Toxoplasma gondii* presenta una elevadísima prevalencia en población asintomática en nuestra región, produciendo infecciones crónicas y que a su vez es un organismo asociado con determinadas costumbres dietéticas al igual que ocurre con *Anisakis* y que, junto con otros agentes infecciosos, se ha postulado su posible papel protector sobre la atopía en el contexto de la hipótesis de la higiene, se analizó la relación entre ambos agentes en la urticaria crónica, observándose que, en los pacientes con urticaria crónica, *T. gondii* no tiene ningún efecto protector ni sobre la atopía en general ni sobre la sensibilización a *Anisakis*. Es más, se encontró un sinergismo entre ambos parásitos con potenciación de la urticaria crónica cuando se presenta una asociación positiva de la infección crónica por *Toxoplasma* con un parasitismo previo por *Anisakis*.

Al estudiar los niveles de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* e IgE anti-*Anisakis*, se observó, sorprendentemente, una mayor prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* en los pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*, demostrando que los niveles de anticuerpos IgE anti-*A. simplex* se ven potenciados por la presencia de *T. gondii*. Este hecho demuestra que la respuesta Th1 inducida por *T. gondii* es incapaz de inhibir la respuesta Th2 asociada a la parasitación por *A. simplex*. También se observó una asociación muy significativa entre la presencia de IgG anti-*T. gondii* y atopía, considerándose la presencia de IgG anti-*T. gondii* como factor de riesgo para presentar atopía en pacientes con urticaria crónica.

Finalmente, gracias a todos los que han intervenido en estos trabajos, en especial a la Doctora María Jesús Perteguer Prieto, con quien iniciamos esta andadura, a Juan González-Fernández, quien ha permitido que continuara, al Doctor Alvaro Daschner, quien nos ha enseñado todo lo que hemos aprendido sobre la alergia y al Profesor Florencio M. Ubeira, por su apoyo y comprensión a lo largo de estos años. Muchas gracias.