

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Alteraciones alérgicas asociadas a *Anisakis simplex*: marcadores  
diagnósticos, citoquinas y efecto de las coinfecciones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Virginia Fernández-Figares Zuleta**

Directoras

**M<sup>a</sup> del Carmen Cuéllar del Hoyo  
Marta Rodero Martínez**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex*:  
MARCADORES DIAGNÓSTICOS, CITOQUINAS Y EFECTO DE LAS  
COINFECCIONES**

Memoria para optar al grado de Doctor  
presentada por:

**Virginia Fernández-Fígares Zuleta**

Directoras:

**Dra. Dña. M<sup>a</sup> del Carmen Cuéllar del Hoyo**

**Dra.Dña. Marta Rodero Martínez**

**Madrid, 2017**



U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Parasitología**

María del Carmen Cuéllar del Hoyo, Doctora en Farmacia y Catedrática de Parasitología y Marta Rodero Martínez, Doctora en Farmacia y Profesora Contratada Doctora en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

**Certifican:**

Que Virginia Fernández-Fígares Zuleta, Licenciada en Farmacia y Máster en Investigación en Inmunología, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “Alteraciones alérgicas asociadas a *Anisakis simplex*: Marcadores diagnósticos, citoquinas y efecto de las coinfecciones” para optar al Grado de Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a ..... de Abril de 2017,

**Profa. Dra.**  
**María del Carmen Cuéllar del Hoyo**

**Profa. Dra.**  
**Marta Rodero Martínez**

## *FINANCIACIÓN*

- Fundación Ramón Areces
- Fundación Mutua Madrileña
- Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

*A Carlos,  
A Virginia,  
A mis padres.*

## *Agradecimientos*

*A lo largo de estos últimos años, he tenido la gran suerte de conocer y tratar a grandes profesionales, muchos de ellos ahora amigos, que me han ayudado en esta tarea de desarrollar mi Tesis Doctoral.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a la **Dra. María del Carmen Cuéllar del Hoyo**, toda las horas, tardes y días de entrega y dedicación, sus ánimos y su paciencia; por su orientación y dirección de mi labor en el laboratorio, por alimentar y encauzar mi curiosidad investigadora y mi vocación farmacéutica. A la **Dra. Marta Rodero Martínez**, por su enseñanza de las técnicas de laboratorio, por su minuciosidad en el estudio, su enorme interés y sus, más que bien recibidos, consejos. Agradezco infinitamente la oportunidad que me han dado.*

*A todo el Departamento de Parasitología, por su apoyo, su compañerismo y su inestimable ayuda. A Sandra, Vega, Cristina, Juan y a todos, de verdad, muchas gracias.*

*Al Dr. Álvaro Daschner, por su apoyo fundamental, especialmente con la parte estadística.*

*Al Instituto de Salud Carlos III, en especial a la Dra. Carolina Hurtado y a la Dra. María Jesús Perteguer, que tan bien me acogieron.*

*A mis padres y a mis hermanos, Isabela y Matías, por su apoyo, sus ánimos y sus grandes consejos. A mis suegros, por todo su cariño y su ayuda en esta última etapa.*

*A Virginia. A Carlos.*

# ÍNDICE

SUMMARY/RESUMEN .....	1
I.- INTRODUCCIÓN .....	12
1.- <i>Anisakis</i> .....	13
1.1.- INTRODUCCIÓN, CICLO BIOLÓGICO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....	13
1.2.- RIESGO POR LA PRESENCIA DE LARVAS EN LOS PRODUCTOS DE LA PESCA .....	16
2.- ALÉRGENOS DE <i>Anisakis</i> .....	19
3.- ANISAKIOSIS .....	21
3.1.- INTRODUCCIÓN Y ENFERMEDAD .....	21
3.2.- <i>Anisakis</i> Y ALERGIA .....	22
3.2.1.- IMPLICACIÓN DE LARVAS VIVAS O MUERTAS .....	22
3.2.2.- PAPEL DE LA IgE ANTI- <i>Anisakis</i> EN LA REACCIÓN ALÉRGICA.....	25
4.- DIAGNÓSTICO .....	27
4.1.- DIFERENCIACIÓN DE ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A <i>Anisakis simplex</i> MEDIANTE EL USO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES .....	32
4.2.- IgG <sub>4</sub> ESPECÍFICA COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A <i>Anisakis simplex</i> .....	33
5.- RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA ANISAKIOSIS .....	35
5.1.- URTICARIA CRÓNICA.....	41

5.2.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA .....	42
5.2.1.- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	43
5.2.2.- <i>Helicobacter pylori</i> .....	45
II-OBJETIVOS.....	49
III-MATERIAL Y MÉTODOS .....	52
1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES Ani s 1 Y Ani s 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A <i>Anisakis simplex</i> .....	53
1.1.- Población de estudio .....	53
1.2.- Prueba cutánea <i>Skin Prick Test (SPT)</i> .....	54
1.3.- Detección de IgE específica frente a <i>Anisakis simplex</i> e IgE total .....	54
1.4.- Detección de IgE específica frente a Ani s 1 y Ani s 7.....	55
1.5.- Estadística .....	56
2.- IgG <sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGENESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON <i>Anisakis</i> .....	57
2.1.- Población de estudio .....	57
2.2.- Protocolo de estudio .....	57
2.3.- Detección de IgE e IgG <sub>4</sub> específicas frente a antígeno larvario crudo de <i>Anisakis</i> .....	57
2.4.- Detección de IgE e IgG <sub>4</sub> específicas frente a Ani s 1 y Ani s 7.....	57

2.5.- Estadística .....	58
<b>3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA A SENSIBILIZACIÓN A <i>Anisakis</i>.....</b>	<b>60</b>
3.1.- Población de estudio .....	60
3.2.- Protocolo del estudio .....	60
3.3.- Obtención de extracto crudo de <i>Anisakis simplex</i> . .....	60
3.4.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y ensayo de estimulación.....	60
3.5.- Cuantificación de citoquinas.....	61
3.6.- Estadística .....	62
<b>4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO <i>Anisakis simplex</i>.....</b>	<b>63</b>
4.1.- Población de estudio .....	63
4.2.- Protocolo del estudio .....	63
4.3.- <i>Urticaria Activity Score (UAS)</i> .....	65
4.4.- Prueba cutánea <i>Skin Prick Test (SPT)</i> .....	65
4.5.- <i>Autologous Serum Skin Test (ASST)</i> .....	66
4.6.- Obtención de extracto crudo de <i>Anisakis simplex</i> .....	66
4.7.- Muestras séricas, células mononucleares de sangre periférica y ensayo de estimulación.....	66

4.8.- Detección de IgE específica .....	66
4.9.- IgE frente a t-Ani s 7 .....	67
4.10.- Cuantificación de citoquinas .....	67
4.11.- Efectos de la dieta .....	67
4.12.- Estadística .....	68
<b>5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR <i>Toxoplasma gondii</i> Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A <i>Anisakis simplex</i> EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA .....</b>	<b>70</b>
5.1.- Población de estudio .....	70
5.2.- Prueba cutánea <i>Skin Prick Test (SPT)</i> .....	70
5.3.- Determinación de IgE total e IgE específica frente a <i>Anisakis simplex</i> mediante la técnica <i>CAP-System</i> .....	70
5.4.- Determinación de los niveles de IgG específica frente a <i>Toxoplasma gondii</i> .....	71
5.5.- Estadística .....	71
<b>6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA .....</b>	<b>72</b>
6.1.- Población de estudio .....	72
6.2.- Determinación de IgE anti- <i>Anisakis simplex</i> e IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	72
6.3.- Determinación de IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> .....	72
6.4.- Estadística .....	73

IV-RESULTADOS.....	74
1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES ANI S 1 Y ANI S 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A <i>Anisakis simplex</i> .....	75
1.1.- Resumen .....	75
1.2.- Descripción de los resultados .....	76
2.- IgG <sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON <i>Anisakis</i> .....	80
2.1.- Resumen .....	80
2.2.- Descripción de los resultados .....	80
3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA A SENSIBILIZACIÓN A <i>Anisakis</i> .....	86
3.1.- Resumen .....	86
3.2.- Resultados obtenidos en sobrenadantes .....	88
3.3.- Resultados obtenidos en sueros.....	90
4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO <i>Anisakis simplex</i> .....	91
4.1.- Resumen .....	91
4.2.- ¿Qué diferencia la UC+ de la UC-?.....	92
4.3.- ¿Qué factores afectan al pronóstico de la urticaria crónica?.....	97

5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR <i>Toxoplasma gondii</i> Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A <i>Anisakis simplex</i> EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA .....	100
5.1.- Resumen .....	100
5.2.- Descripción de los resultados .....	100
6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA .....	105
6.1. Resumen .....	105
6.2.- Determinación de la prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> en función del sexo y de la edad.....	106
6.3. Determinación de anticuerpos específicos frente a <i>Anisakis simplex</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> y <i>Helicobacter pylori</i> .....	107
6.4. Determinación del porcentaje de positivos frente a <i>Anisakis simplex</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> y <i>Helicobacter pylori</i> .....	108
6.5. Estudio del efecto de la coinfección entre <i>Anisakis simplex</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre la urticaria crónica.....	112
V-DISCUSIÓN .....	114
1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES Anisakis 1 Y Anisakis 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A <i>Anisakis simplex</i> ....	115
2.- IgG <sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON <i>Anisakis</i> .....	118
3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA.....	122

4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO <i>Anisakis simplex</i> .....	131
5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR <i>Toxoplasma gondii</i> Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A <i>Anisakis simplex</i> EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA .....	136
6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA .....	141
VI- CONCLUSIONES.....	147
VII-BIBLIOGRAFÍA .....	150
VIII-ANEXOS.....	165
ABREVIATURAS .....	166
ÍNDICE DE FIGURAS.....	168
ÍNDICE DE TABLAS.....	171

*SUMMARY/RESUMEN*

## SUMMARY

### *Anisakis simplex* allergic diseases: diagnosis markers, cytokines and coinfection effect

Diagnosis in gastro-allergic anisakiosis (GAA) is straightforward, when clinical history is combined with further allergological evaluation of *Anisakis simplex* specific IgE (means of Skin Prick Test and serum specific IgE). In *A. simplex* sensitization associated chronic urticaria (CU+), clinical evaluation of possible previous parasitism is difficult, and positive serum specific IgE could be due to cross-reactivity or other unknown factors.

In this study, we evaluated the association between IgE seropositivity to the recombinants allergens Ani s 1 and Ani s 7 and several *A. simplex*-associated allergic disorders. Twenty-eight patients with GAA and 40 patients with CU+ were studied and their IgE responses were compared with a control group composed of 26 patients with chronic urticaria not sensitized to *A. simplex* (CU-) according to the Skin Prick Test, as well as a group of 15 healthy subjects not referring urticaria or *A. simplex* associated symptoms, on the moment when the study was carried out. 82.1% of GAA patients and 42.5% of CU+ patients were positive to Ani s 1 ( $P < 0.001$ ), while the Ani s 7 allergen was recognized by 92.9% and 92.5% of sera from patients with GAA and CU+, respectively. The combined positivity obtained for both allergens reached 100% in GAA and 95% on CU+.

IgE and IgG<sub>4</sub> are two immunoglobulins isotypes which are mediated by the same Th<sub>2</sub> mechanism. The postulated pathogenic and protective effect of these cytokines, respectively, in allergic disease is opposite in parasitic infection.

The possible role of IgG<sub>4</sub> against recombinant major allergens on the appearance of different forms of *A. simplex*-associated allergic reactions was studied. Gastro-allergic anisakiosis (GAA) and *A. simplex*-sensitization-associated chronic urticaria (CU+) were compared for specific IgE, IgG<sub>4</sub> and the respective recognition of Ani s 1 and Ani s 7. Gastro-allergic anisakiosis showed higher IgE and IgG<sub>4</sub> levels against crude extract and both recombinant allergens. Whereas IgE recognition of Ani s 7 did not differ and supports both clinical entities to be associated with previous acute parasitism, the IgE recognition rates of Ani s 1 and IgG<sub>4</sub> recognition of both Ani s 1 and Ani s 7 were higher in GAA. IgG<sub>4</sub> levels were associated with IgE, but also with age, time to last parasitic episode and frequency of fish intake. Logistic regression analysis showed that the

presence of specific IgG<sub>4</sub> against *Anisakis* 7 was an independent marker associated with GAA.

*A. simplex* is a ubiquitous fish parasite that has been associated with acute urticaria in gastro-allergic anisakiosis (GAA) and with chronic urticaria, when it is associated with sensitization (CU+). In previous works, using *A. simplex* recombinant major allergens, we observed that sensitization against this nematode is due to previous parasite infection in most patients with CU+.

Twenty-three patients with GAA and 22 patients with CU+ were studied and compared against a control group of 28 patients with chronic urticaria not sensitized to *A. simplex* (CU-). Cytokine production was measured in sera and in the supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), after stimuli with *A. simplex* antigen or Concanavalin A. Expectedly, PBMC from GAA and CU+ patients produced overall higher cytokine amounts than CU- patients after parasite larval antigen stimulation. When comparing GAA and CU+, significantly higher levels of IL-4 and IL-10 were detected in GAA. In GAA, we observed higher levels of IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  after mitogen stimulation, compared to levels after *A. simplex* stimulation. On the contrary, significantly higher concentrations of IL-2 were measured when PBMC of these patients were stimulated with parasite antigen. Similar results were observed in the case of PBMC stimulation of CU+ and CU- patients with again higher cytokine levels after mitogen stimulation with significant differences for IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . With respect to TGF- $\beta$ , we observed higher levels of this cytokine on patients with CU- than in CU+, after the PBMC were stimulated with larval antigen. When we analyzed the levels of these cytokines in sera, really low levels of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  were observed, but there were find significative differences between IL-17A levels, with higher expression in GAA than in CU- or CU+ ( $P = 0.0003$  and  $P = 0.0107$ ) and between TGF- $\beta$  levels, being higher in GAA than in CU- ( $P = 0.0313$ ).

*A. simplex* sensitization has been associated with acute, but also with chronic urticaria. The objective of this study is to characterize chronic urticaria with (CU+) and without (CU-) sensitization against the ubiquitous fish parasite *A. simplex* in a transversal and longitudinal evaluation. Sixteen CU+ and 22 CU- patients were included and assessed for Urticaria Activity Score (UAS), fish-eating habits by standardized questionnaire and cytokine production (assessed by flow cytometric bead-based array) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after stimulation with *A. simplex* extract and Concanavalin A. Patients were randomize in a fish-free diet for three months and UAS, as well as cytokine production, were again assessed. A difference of  $\geq 1$  in UAS was defined as improvement. There was no difference in UAS in both groups. *Anisakis* induced IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  production was higher in CU+. Con A induced IL-6 and IL-10 production

was higher in CU+. CU+ was associated with higher total fish intake, whereas CU- was associated with oily fish intake. The correlation of UAS was positive with oily fish, but negative with total fish intake. There was a better UAS-based prognosis in CU+ without diet. Improvement was associated with higher Con A induced IL-10/IFN- $\gamma$  as well as IL-10/IL-6 ratios. Further, previous higher oily fish intake was associated with improvement.

*Toxoplasma gondii* is a food borne and orofecal microorganism which produces chronic infection and its negative association with atopy has been tried to prove previously in the context of the hygiene hypothesis. As we have indicated before, *A. simplex* is a fish-parasite associated with chronic urticaria in endemic regions.

We analyzed the relationship between both infectious agents in chronic urticaria. We included 42 patients with chronic urticaria (18 patients with *A. simplex* sensitization associated chronic urticaria and 24 not sensitized chronic urticaria patients). Patients were assessed for atopy by Skin Prick Test (SPT) against common aeroallergens and for respiratory symptoms. *A. simplex* sensitization was assessed by SPT and specific IgE by CAP-FEIA. Anti-*T. gondii* IgG levels were measured by ELISA. Chronic urticaria patients were analyzed with respect to *T. gondii* seropositivity, *A. simplex* sensitization, atopy and immigrant status. The seroprevalence of *T. gondii* was 40.5% in chronic urticaria patients and 42.1% in the control group. Immigrants were more frequently infected by *T. gondii* (41.2% versus 12%;  $P = 0.036$ ). Anti-*T. gondii* IgG antibodies were associated with past *A. simplex* parasitism (Odds ratio 6.73;  $P = 0.03$ ) and independently with atopic sensitization (Odds ratio 5.85;  $P = 0.04$ ).

In recent decades, there has been an increase on the prevalence of allergic reactions in developed countries. Several studies showed, that some infectious agents, such as *T. gondii*, which are transmitted by the fecal-oral route or through food and barely produce alteration of the intestinal flora, reduce the prevalence of Th<sub>2</sub>-associated IgE-mediated allergic disorders. On the other side, *A. simplex* and *Helicobacter pylori* have been positively associated with chronic urticaria, a multifactorial inflammatory disorder not mediated by Th<sub>2</sub> mechanisms.

We have selected 90 subjects divided into two groups: 68 patients with chronic urticaria and 22 controls showing no episode of urticaria. We determined IgE anti-*A. simplex* and IgG against *T. gondii* and *H. pylori*. The results were analyzed using bivariate comparisons. The following results were observed on the urticaria group (Median, IQR): IgE anti-*A. simplex* (0.25 kU/l; 0 - 4.18); IgG anti-*T. gondii* (32.28 UI/l; 14 - 242.82); IgG anti-*H. pylori* (120.9 NTU/ml; 59.74 - 157.13). The following results were observed on

the control group: IgE CAP anti-*A. simplex* (0 kU/l; 0 - 11.25); IgG anti-*T. gondii* (15.80 UI/l; 2.12 - 199.69); IgG anti-*H. pylori* (64.32 NTU/ml; 30.27 - 121.23). When analyzing previous parasitism by *A. simplex*, positive IgE was observed in only 13.6% of the control subjects, while 50% of chronic urticaria patients showed a previous contact with the parasite. In the case of IgG anti-*T. gondii*, significant differences were not observed between the control group and the group of chronic urticaria, with percentages of positive of 36.4% and 46.3%, respectively. *H. pylori* infection was significantly associated with chronic urticaria. Despite the high prevalence of IgG anti-*H. pylori* in our region, that has been proved in our study too, only the 6.1% of patients with chronic urticaria were negative, while in the control group the percentage of subjects without a *H. pylori* infection, was 22.7% ( $P = 0.025$ ). Subsequently, we studied the possible synergistic effect of co-infections on chronic urticaria. This effect was observed in the case of *A. simplex* and *H. pylori* co-infection, as it was observed in 50% of chronic urticaria patients, versus 4.5% in the control group. By contrast, the inclusion of *T. gondii* in the analysis of the co-infections reduced differences between both groups, only being a 27.3% in the group of chronic urticaria and a 4.5% on the control group.

The main conclusions of this study were the following:

**1.-** IgE determinations to Ani s 1 and Ani s 7 allergens are useful to diagnose the *Anisakis* infections and to differentiate among several *A. simplex*-associated allergic disorders. The IgE responses to Ani s 1 are mainly associated with GAA, while this molecule cannot be considered a major allergen in CU+ patients.

**2.-** In the diagnosis of *Anisakis*-associated allergic diseases phenotypes (GAA versus CU+), measurement of specific IgG<sub>4</sub> against recombinant allergens could be useful. Further, evaluation of specific IgE and IgG<sub>4</sub> facilitates more insight into the protective versus the pathogenic potential of IgE and IgG<sub>4</sub>.

**3.-** The IL-2, IL-4 and IL-6 have been increased after stimulation with *A. simplex* antigens in GAA and CU+. The anti-inflammatory IL-10 production was higher in GAA than CU+, whereas the pro-inflammatory IFN- $\gamma$  production was higher in CU+ than GAA. The TGF- $\beta$  production was higher in GAA and CU+ after stimulation with mitogen than after the stimulation with antigen. In other words, the phenotype GAA produces a more anti-inflammatory response than CU+, which produces more pro-inflammatory cytokines

**4.-** Our data confirm the different clinical and immunological phenotype of CU+. Our results show a complex relationship between fish-eating habits, cytokine production and

prognosis, which could have important consequences in dietary advice in patients with chronic urticaria. When encountering *A. simplex* sensitization, patients should not be automatically put on a diet without fish in order to reduce contact with *A. simplex* products.

5.- In chronic urticaria patients, *T. gondii* has no protective effect on atopic sensitization or *A. simplex* sensitization.

6.- Parasitism by *A. simplex*, as well as *H. pylori* infection, is associated with chronic urticaria, and this effect is enhanced by co-infection with both infectious agents.

## RESUMEN

### *Alteraciones alérgicas asociadas a Anisakis simplex: Marcadores diagnósticos, citoquinas y efecto de las coinfecciones*

El diagnóstico de la anisakiosis gastroalérgica (AGA) se realiza de forma sencilla al combinar la historia clínica del paciente con una evaluación alergológica, en la que se determina la IgE específica de *Anisakis simplex*, tanto en suero como a través del *Skin Prick Test* (SPT). En la urticaria crónica asociada con la sensibilización a *A. simplex* (UC+), la evaluación clínica de un parasitismo previo es difícil, ya que la positividad de la IgE específica sérica anti-*A. simplex* puede ser debida a una reacción cruzada, o a otros factores desconocidos.

En este estudio evaluamos la asociación entre la seropositividad de la IgE a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 y varias alteraciones alérgicas asociadas con *A. simplex*. Se estudiaron 28 pacientes con AGA y 40 pacientes con UC+, comparando sus respuestas de IgE con un grupo control compuesto por 26 pacientes con urticaria crónica no asociada a la sensibilización por *A. simplex* (UC-), de acuerdo con el SPT, así como con un grupo de 15 sujetos sanos sin urticaria ni síntomas asociados con *A. simplex* en el momento del estudio. El 82,1% de los pacientes con AGA y el 42,5% de los pacientes con UC+ fueron positivos a Ani s 1 ( $P < 0,001$ ), mientras que el alérgeno Ani s 7 fue reconocido por el 92,9% y el 92,5% de los sueros de los pacientes con AGA y UC+, respectivamente. Se alcanzó un 100% en la positividad combinada de ambos alérgenos en los pacientes con AGA y un 95% en los UC+.

La IgE y la IgG<sub>4</sub> son dos isotipos de inmunoglobulinas mediadas por el mismo mecanismo Th<sub>2</sub>. Sus respectivas funciones patogénica y protectora, propias de las alteraciones alérgicas, se invierten en las infecciones parasitarias.

Se estudió el posible papel de la IgG<sub>4</sub> frente a los principales alérgenos recombinantes en la aparición de las diferentes alteraciones alérgicas asociadas con *A. simplex*. Se comparó el reconocimiento de Ani s 1 y Ani s 7 por la IgE y la IgG<sub>4</sub> específicas en la AGA y en la UC+. La AGA mostró niveles más elevados de IgE e IgG<sub>4</sub> frente al extracto crudo larvario y frente a ambos alérgenos recombinantes. Mientras que el reconocimiento de Ani s 7 por la IgE no difiere en estas dos entidades y respalda que ambas están asociadas con un parasitismo agudo previo, la tasa de reconocimiento de Ani s 1 por la IgE y la del reconocimiento de Ani s 1 y de Ani s 7 por la IgG<sub>4</sub>, fueron mayores en AGA. Los niveles de IgG<sub>4</sub> se asociaron con los de IgE, pero también con la edad, con el tiempo transcurrido

desde el último episodio de parasitismo y con la frecuencia en el consumo de pescado. El análisis de regresión logística mostró que la presencia de IgG<sub>4</sub> específica frente a Ani s 7 fue un marcador independiente asociado con AGA.

*A. simplex* está asociado con la urticaria aguda en la AGA y con la urticaria crónica en la UC+. En los estudios anteriores, utilizando los principales alérgenos recombinantes de *A. simplex*, observamos que la sensibilización frente a este nematodo, en la mayoría de los pacientes con UC+, se produce a través de un parasitismo previo.

En el presente estudio, utilizamos 23 pacientes AGA y 22 UC+, comparados frente a 28 pacientes UC-. Se midió la producción de citoquinas en los sueros de los pacientes y en los sobrenadantes obtenidos tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con antígeno de *A. simplex* o con Concanavalina A (Con A). Previsiblemente, las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con AGA y UC+, produjeron, en general, mayores cantidades de citoquinas que los pacientes con UC-, tras la estimulación con el antígeno larvario. Al comparar AGA y UC+, se detectaron niveles más elevados de IL-4 e IL-10 en AGA. En AGA, observamos niveles mayores de IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  tras la estimulación con el mitógeno, comparando con los niveles obtenidos tras la estimulación con *A. simplex*. Por el contrario, se encontraron concentraciones más elevadas de IL-2 al estimular las células mononucleares de sangre periférica con antígeno parasitario. Se encontraron resultados similares en el caso de la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con UC+ y UC-, observándose, nuevamente, mayores niveles de citoquinas tras la estimulación con el mitógeno, fundamentalmente, de IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Con respecto al TGF- $\beta$ , se observaron niveles significativamente más elevados en los pacientes UC- que en los UC+, tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con antígeno larvario de *A. simplex*. Al determinar los niveles de estas citoquinas en suero, se observaron niveles muy bajos, apenas perceptibles, de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-17, siendo significativamente mayor la producción de esta citoquina en los pacientes con AGA que en los UC-, o en los UC+, donde los niveles son prácticamente inexistentes ( $P = 0,0003$  y  $P = 0,0107$ ). En el caso de la determinación de TGF- $\beta$  en suero, se encontraron niveles significativamente más elevados en AGA que en UC- ( $P = 0,0313$ ).

La sensibilización frente a *A. simplex* se ha asociado con la urticaria aguda, pero también con la urticaria crónica. El objetivo de este estudio es caracterizar la UC+ y la UC- en una evaluación transversal y longitudinal. Se seleccionaron 16 pacientes UC+ y 22 UC-, determinándose el *Urticaria Activity Score (UAS)*, el consumo de pescado (a través de un cuestionario) y la producción de citoquinas (a través de la citometría de flujo) por las

células mononucleares de sangre periférica tras la estimulación con extracto de *A. simplex* o con Concanavalina A. Se puso a los pacientes una dieta libre de pescado durante tres meses y, transcurrido ese tiempo, se volvió a evaluar el UAS y la producción de citoquinas. Se definió como mejoría una diferencia del UAS  $\geq 1$ . No se observaron diferencias en el UAS de ambos grupos. La inducción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  por *Anisakis* fue mayor en UC+. La inducción de IL-6 e IL-10 fue mayor en UC+. La UC+ estuvo asociada con un mayor consumo de pescado, mientras que la UC- se asoció con la ingesta de pescado graso. La correlación del UAS con el pescado graso fue positiva, mientras que con el consumo total de pescado resultó negativa. Se observó un mejor pronóstico del UAS en los pacientes UC+ no sometidos a dieta. La mejoría se asoció con mayores cocientes IL-10/IFN- $\gamma$  e IL-10/IL-6 inducidos por Con A. Además, el consumo previo de pescado graso, se asoció con la mejoría en esos pacientes.

*Toxoplasma gondii* es un microorganismo que se transmite a través de los alimentos y de la vía oral-fecal, estableciendo una infección crónica, relacionada de forma negativa con la atopía, en el contexto de la hipótesis de la higiene. Como ya se ha indicado, *A. simplex* es un parásito del pescado asociado con la urticaria crónica en regiones endémicas.

Hemos analizado la relación entre ambos agentes infecciosos en la urticaria crónica. Hemos incluido 42 pacientes con urticaria crónica (18 pacientes con UC+ y 24 pacientes con UC-). Evaluamos el estado atópico de los pacientes, a través de SPT frente a los aeroalérgenos más comunes y la sintomatología respiratoria. Determinamos la sensibilización a *A. simplex* a través del SPT y a través de la detección de IgE específica por la técnica de CAP-System. Los niveles de IgG anti-*T. gondii* fueron determinados a través del método de ELISA. En los pacientes con urticaria crónica se determinó la seropositividad a *T. gondii*, la sensibilización a *A. simplex*, la atopía y si eran inmigrantes o no. La seroprevalencia de *T. gondii* fue del 40,5% en los pacientes con urticaria crónica y del 42,1% en el grupo control. La frecuencia de infección por *T. gondii* fue mayor en los pacientes inmigrantes (41,2% vs 12%;  $P = 0,036$ ). Los anticuerpos IgG anti-*T. gondii* se asociaron con un parasitismo previo por *A. simplex* (OR 6,73;  $P = 0,03$ ) y con una sensibilización atópica, de forma independiente (OR 5,85;  $P = 0,04$ ).

A lo largo de las últimas décadas, se ha observado un incremento en la prevalencia de las reacciones alérgicas en los países desarrollados. Se han elaborado diversos estudios que demuestran que la infección por microorganismos que se transmiten a través de la vía fecal-oral, o a través de los alimentos y que, raramente, producen alteraciones de la flora intestinal, como es el caso de *T. gondii*, reducen la prevalencia de las alteraciones alérgicas mediadas por la IgE, asociada con la respuesta inmunológica de tipo Th<sub>2</sub>. Por otro lado, *A. simplex* y *Helicobacter pylori*, han sido asociados positivamente con la

urticaria crónica, una enfermedad multifactorial no mediada por los mecanismos inmunológicos de tipo Th<sub>2</sub>.

Se seleccionaron 90 pacientes, divididos en dos grupos: 68 pacientes con urticaria crónica y 22 controles, que no mostraron ningún episodio de urticaria. Se determinaron los niveles de IgE anti-*A. simplex*, y la IgG frente a *T. gondii* y *H. pylori*. Se analizaron los resultados, utilizando un método de comparación bivariante. En los pacientes con urticaria se observaron los siguientes resultados (Mediana, IQR): IgE frente a *A. simplex* (0,25 kU/l; 0 - 4,18); IgG anti-*T. gondii* (32,28 UI/l; 14 - 242,82); IgG anti-*H. pylori* (120,9 NTU/ml; 59,74 - 157,13). En el grupo control los valores fueron: IgE CAP frente a *A. simplex* (0 kU/l; 0 - 11,25); IgG anti-*T. gondii* (15,80 UI/l; 2,12 - 199,69); IgG anti-*H. pylori* (64,32 NTU/ml; 30,27 - 121,23). Cuando analizamos el parasitismo previo por *A. simplex*, tan sólo se observó un valor de IgE positivo en el 13,6% de los controles, mientras que el 50% de los pacientes con urticaria crónica mostraron un contacto previo con este parásito. En el caso de la IgG anti-*T. gondii*, no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo de urticaria crónica, con porcentajes de positividad del 36,4% y del 46,3%, respectivamente. La infección por *H. pylori* estuvo significativamente asociada con la urticaria crónica. A pesar de la ya conocida elevada prevalencia de la IgG anti-*H. pylori* en nuestra región, que también queda demostrada en nuestra población de estudio, tan sólo el 6,1% de los pacientes con urticaria crónica fueron negativos, mientras que en el grupo control, el porcentaje de individuos que no tenían una infección demostrable por este microorganismo fue del 22,7% ( $P = 0,025$ ). A continuación, estudiamos el posible efecto sinérgico de la coinfección en la urticaria crónica. Este efecto se observó en el caso de la coinfección por *A. simplex* y *H. pylori*, viéndose en el 50% de los pacientes con urticaria crónica, frente a un 4,5% en el grupo control. En contraste, la inclusión de *T. gondii* en el análisis de la coinfección, redujo las diferencias entre ambos grupos, siendo del 4,5% en los controles, frente al 27,3% en el grupo de urticaria crónica.

Las principales conclusiones de esta tesis se describen a continuación:

1.- Las determinaciones de IgE frente a los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 son útiles para diagnosticar las infecciones por *Anisakis* y para diferenciar entre las diferentes alteraciones alérgicas asociadas a *A. simplex*. Las respuestas de la IgE frente a Ani s 1 están fundamentalmente asociadas con la AGA, mientras que esta molécula no puede ser considerada como un alérgeno principal en los pacientes de UC+.

2.- En el diagnóstico de los fenotipos de las alteraciones alérgicas asociadas con *Anisakis* (AGA vs UC+), la medida de la IgG<sub>4</sub> específica frente a los alérgenos recombinantes

puede ser útil. Además, la evaluación de la IgE e IgG<sub>4</sub> específicas facilita una mayor profundización en el potencial protector frente al patógeno de la IgE y de la IgG<sub>4</sub>.

**3.-** Las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-6 fueron incrementadas tras la estimulación con antígeno de *A. simplex* en los pacientes con AGA y UC+. La producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue mayor en los pacientes con AGA que en los UC+, mientras que la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$  fue mayor en UC+ que en AGA. La producción de TGF- $\beta$  en los pacientes AGA y UC+, fue mayor tras la estimulación con mitógeno que tras la estimulación con antígeno larvario de *A. simplex*. En otras palabras, el fenotipo AGA produce una mayor respuesta antiinflamatoria que el UC+, el cual produce una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias.

**4.-** Nuestros datos confirman la existencia de diferentes fenotipos clínicos e inmunológicos de UC+. Nuestros resultados muestran una relación compleja entre los hábitos de consumo de pescado, la producción de citoquinas y el pronóstico de la urticaria, que puede tener importantes consecuencias sobre las recomendaciones dietéticas en los pacientes con urticaria crónica. Al encontrar una sensibilización por *A. simplex*, no se debe recomendar a los pacientes automáticamente una dieta libre de pescado para reducir el contacto con los productos de *A. simplex*.

**5.-** En los pacientes con urticaria crónica, *T. gondii* no tuvo ningún efecto protector en la sensibilización atópica, ni en la sensibilización a *A. simplex*.

**6.-** El parasitismo por *A. simplex*, así como la infección por *H. pylori*, están asociados con la urticaria crónica y este efecto se encuentra potenciado por la coinfección por ambos agentes infecciosos.

## *I-INTRODUCCIÓN*

## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.- *Anisakis*

#### 1.1.- INTRODUCCIÓN, CICLO BIOLÓGICO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Anisakis simplex* es un parásito, capaz de producir diferentes formas de anisakiosis. Desde la década de los 90, el hallazgo de distintas manifestaciones alérgicas asociadas con la sensibilización frente a este nematodo, ha producido un aumento del interés sobre este cosmopolita parásito del pescado (Audicana *et al.*, 1995; Alonso *et al.*, 1997; Alonso-Gómez *et al.*, 2004; Daschner y Pascual, 2005; Daschner *et al.*, 2010a).

Los anisákidos son nematodos incluidos en la Clase Chromadorea, Orden Rhabditida, Suborden Rhabditina, Infraorden Ascaridomorpha, Superfamilia Ascaridoidea, Familia Anisakidae (De Ley, 2006; Blaxter, 2009). Dentro del género *Anisakis* se admiten, al menos, nueve especies, estando las más estudiadas incluidas dentro del Complejo *Anisakis simplex* (Tabla 1) (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009).

Tabla 1.- Subfamilia Anisakidae (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009).

Género <i>Anisakis</i>	Complejo <i>Anisakis simplex</i>	<i>A. simplex sensu stricto</i> <i>A. simplex C</i> <i>Anisakis pegreffii</i>
	Complejo <i>Anisakis physeteris</i>	<i>A. physeteris</i> <i>A. paggiae</i> <i>A. brevispiculata</i>
		<i>Anisakis typica</i> <i>Anisakis ziphidarum</i> <i>Anisakis schupakovi</i> <i>Anisakis nascetti</i>
Género <i>Pseudoterranova</i>		
Género <i>Contraecum</i>		
Género <i>Hysterothylacium</i>		

Los anisákidos adultos viven en el estómago de los mamíferos marinos, los cuales eliminan huevos sin embrionar a través de las heces. Tras el desarrollo embrionario en el medio acuático, las larvas de primer estadio mudan a larvas de segundo estadio que, tras la eclosión, serán ingeridas por los hospedadores intermediarios, pequeños crustáceos planctónicos, en los que 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 éstas a los hospedadores definitivos (Fig. 1).

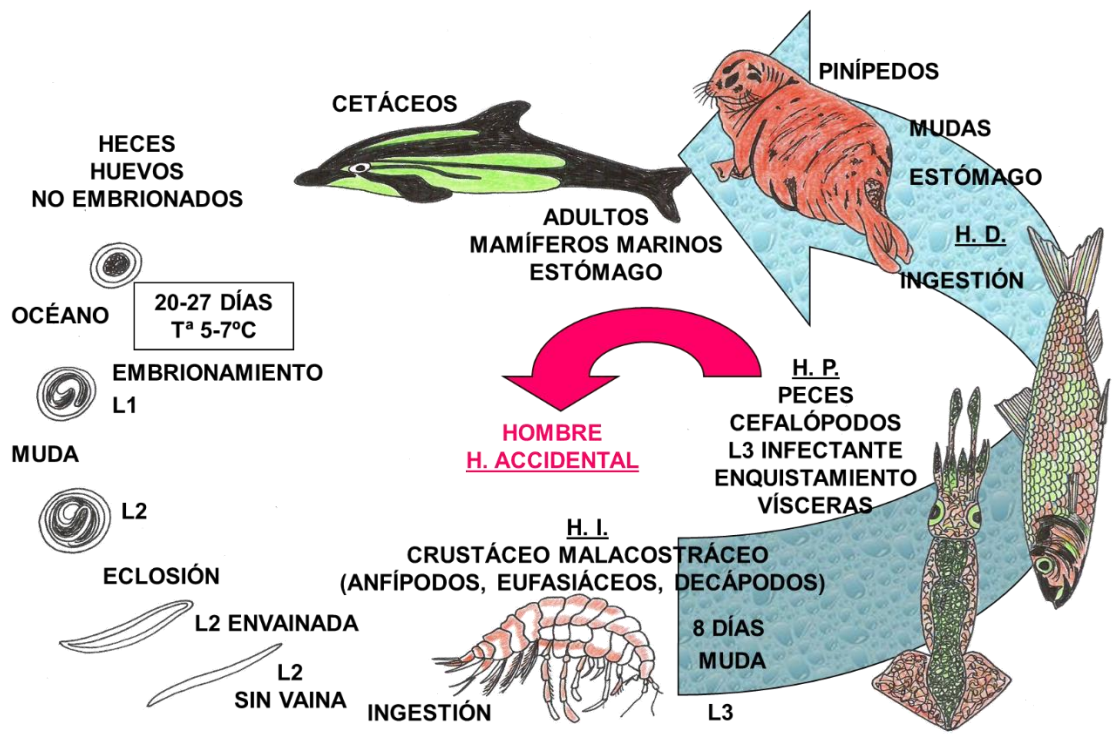


Figura 1.- Ciclo biológico de los anisákidos.

Los anisákidos tienen una 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. En el caso del género *Anisakis* los hospedadores definitivos son los cetáceos como rorcuales, orcas, delfines, belugas o marsopas, mientras que peces y cefalópodos actúan como hospedadores paraténicos (Mattiucci y Nascetti, 2008) (Fig. 2).

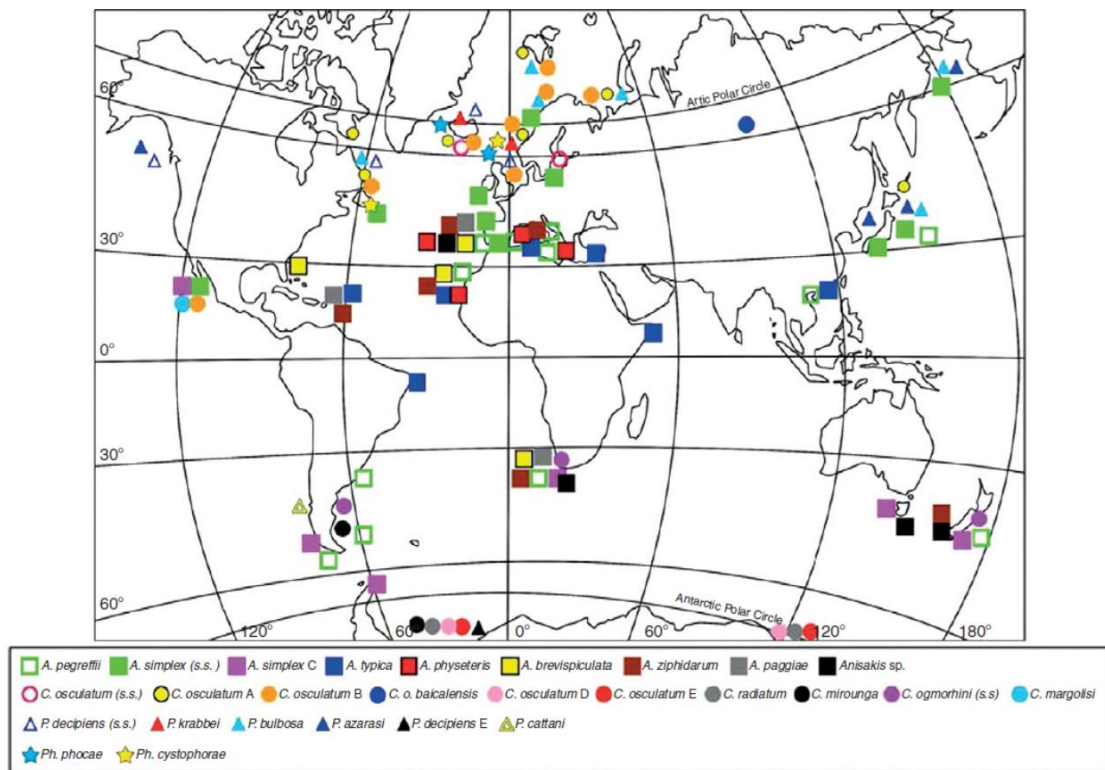


Figura 2.- Distribución geográfica de los anisákidos (Mattiucci y Nascetti, 2008).

## 1.2.- RIESGO POR LA PRESENCIA DE LARVAS EN LOS PRODUCTOS DE LA PESCA

Según el informe elaborado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), todos los pescados destinados al consumo humano están potencialmente parasitados, alcanzando tasas cercanas al 100% en muchos casos (Tabla 2). El informe recoge, así mismo, los efectos que los diferentes tratamientos culinarios producen sobre la viabilidad de las larvas, observando que la congelación y el calentamiento son los únicos métodos físicos eficaces para conseguir su eliminación (Tabla 3) (EFSA, 2010).

Tabla 2.- Prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en pescados de diferentes áreas (EFSA, 2010).

Área	Especie	Número de muestras	Prevalencia; intensidad (media $\pm$ DS, rango)
Mar de Barents	Bacalao	212 (océano) 207 (costa)	96%; 4,3 y 6,1 (océano y costa, respectivamente)
Norte de Noruega	Abadejo		100%; 2,6
Costa portuguesa	Jurel	58	76%; 6,2 $\pm$ 10,2 (1 - 46)
	Caballa	45	96%; 12,7 $\pm$ 14,8 (1 - 80)
	Merluza	3	100%; 51,3 $\pm$ 5,7 (45 - 59)
	Bacaladilla	65	94%; 14,3 $\pm$ 18,9 (1 - 89)
Madeira	Tonino	154	70%; 2,2 $\pm$ 0,12 (1 - 6)
Costa mediterránea (España)	Bacaladilla (17 - 24 cm)	224	12%; 1,19
	Bacaladilla (> 25 cm)	77	17%; 1,5
	Merluza		41%; 1,7
Costa mediterránea (Italia)	Chicharro	822	80 - 100%; 19,3 - 36,8
Galicia	Merluza, bacaladilla, maruca, rape, caballa, sargo y caballa		> 70%; > 14
Francia	Bacalao	304	1,97%; 1,5 $\pm$ 0,8 (1 - 3)
	Merlán	169	3,55%; 1,14 $\pm$ 0,5 (1 - 2)

Tabla 3.- Efecto de diferentes tratamientos sobre las larvas de *Anisakis* en los pescados (EFSA, 2010).

Pescado	Tratamiento	Parámetros
Arenque	Salado	5% NaCl, > 17 semanas
		6 - 7% NaCl, 10 - 12 semanas
		8 - 9% NaCl, 6 semanas
	Salado en seco	20 días
Anchoa	Marinado	10% ácido acético + 12% sal mínimo 5 días
		2,4% ácido acético + 6% NaCl 35 días
		10% ácido acético + 12% NaCl 5 días
Sardina	Marinado	6% ácido acético + 10% NaCl 24h + 4°C 13 días
Arenque	Marinado	28 días en escabeche (6,3% NaCl + 3,7% ácido acético)
Salmón rojo y rocote canario	Congelación	-35°C 15h + -18°C 24h
Fletán	Congelación	-15°C 96h; -20°C 60h; -30°C 20h; -40°C 9h
Larvas <i>in vitro</i>	Congelación	-15°C pocos minutos
	Calentamiento	60°C > 15 min
	Calentamiento	>60° (temperatura interior) 1 min
	Calentamiento	74°C 15 seg
	Calentamiento	60°C 10 min (filetes 3 cm)
	Extractos de plantas	[6]-shogaol 62,4 µg/ml; [6]-gingerol 250 µg/ml
Salmón real y fletán	Altas presiones	414 MPa 30 - 60 seg
		276 MPa 90 - 180 seg
		207 MPa 180 seg
Arenque	Irradiación	6 - 10 kGy
Congrio	Irradiación	> 1 kGy

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 su posterior engorde en cautividad (EFSA, 2010). En España, concretamente, no existe ningún riesgo ya que, en un estudio encargado por la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, 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 estudiados (APROMAR, 2012).

## **2.- ALÉRGENOS DE *Anisakis***

En el caso de *A. simplex*, se han caracterizado varios alérgenos (Tabla 4) 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 a nivel diagnóstico. Así, mediante la técnica de *ELISA* de inhibición, se ha determinado que tanto los hidratos de carbono como los residuos de fosforil-colina son capaces de generar reacciones cruzadas con otros anisákidos como *Hysterothylacium* en sueros de pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Fernández-Caldas *et al.*, 1998).

También se ha estudiado la aparición de reacciones cruzadas con otros ascáridos, como *Toxocara canis*, mediante la determinación de IgE anti-*Anisakis* y anti-*Toxocara* por el método *CAP-System* en sueros de pacientes diagnosticados tanto de urticaria aguda recidivante relacionada con *Anisakis*, como de larva migratoria visceral por *Toxocara* (Perteguer *et al.*, 2003). Aparte de las reacciones cruzadas con nematodos cercanos, también se ha investigado su presencia frente a artrópodos, entre ellos ácaros, como *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* o *Dermatophagoides pteronyssinus*, cucarachas o crustáceos, así como lombrices de tierra (Johansson *et al.*, 2001).

Tabla 4.- Alérgenos caracterizados de *Anisakis simplex*.

	kDa	Función	Positividad	Referencia
Ani s 1	24	Inhibidor de tripsina tipo Kunitz	85%	Moneo <i>et al.</i> , 2000
Ani s 2	97	Paramiosina	88%	Pérez-Pérez <i>et al.</i> , 2000
Ani s 3	41	Tropomiosina	¿4%?	Asturias <i>et al.</i> , 2000
Ani s 4	9	Cistatina	27%	Rodríguez-Mahillo <i>et al.</i> , 2007
Ani s 5	15	Proteína SXP/RAL-2	25 - 49%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007a
Ani s 6	7	Serpina	18%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007a
Ani s 7	139	Glicoproteína	83 - 100%	Anadón <i>et al.</i> , 2009
Ani s 8	15	Proteína SXP/RAL-2	25%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007b
Ani s 9	14	Proteína SXP/RAL-2	13%	Rodríguez-Perez <i>et al.</i> , 2008
Ani s 10	21	¿?	39%	Caballero <i>et al.</i> , 2011
Ani s 11	27	¿?	47%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
Ani s 12	31	¿?	57%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
Ani s 13	37	Hemoglobina	64-81%	González-Fernández <i>et al.</i> , 2015a
Ani s 14	24	¿?	53%	Kobayashi <i>et al.</i> , 2015

### 3.- ANISAKIOSIS

#### 3.1.- INTRODUCCIÓN Y ENFERMEDAD

Diferentes helmintos parásitos son capaces de desencadenar cuadros alérgicos, sobre todo cuando su exposición es limitada o, en el caso de helmintosis zoonóticas, cuando las larvas no son capaces de alcanzar el estadio adulto en el hospedador humano, lo que genera una migración larvaria por los tejidos durante periodos prolongados. En otros casos, la falta de adaptación al hospedador humano tiene como consecuencia reacciones violentas por parte de éste que, en algunos casos, desencadenan reacciones alérgicas de tipo agudo. Sin embargo, en otros casos la presencia de algunos helmintos parásitos, se ha relacionado con una menor prevalencia de asma bronquial como es el caso de *Necator americanus* y de *Schistosoma mansoni* (Cooper, 2009).

Hay cuatro factores que pueden determinar los efectos de los helmintos sobre la alergia que son: el tiempo y la duración de la infección, donde las infecciones tardías y cortas pueden incrementar la presencia de alergias; la intensidad de la infección, donde las infecciones leves tienen efectos negativos sobre la alergia; la genética del hospedador, donde los individuos genéticamente susceptibles a las enfermedades atópicas serán más proclives a desarrollar respuestas alérgicas frente a helmintos y otros alérgenos no parasitarios, siendo más resistentes a las infecciones y, finalmente, el propio parásito. Los individuos expuestos a infecciones por helmintos pueden desarrollar respuestas inflamatorias a los parásitos y a sus antígenos, siendo lo más probable que esta respuesta del hospedador consiga aislar y eliminar al parásito (Cooper, 2009).

Actualmente, *Anisakis* es el único helminto parásito que se acepta que es capaz de provocar la aparición de enfermedades alérgicas asociadas a la parasitación.

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. Si los síntomas alérgicos van acompañados de manifestaciones digestivas se denomina anisakiosis gastroalérgica (Sakanari, 1990; Daschner *et al.*, 2000) (Fig. 3).

- **GÁSTRICA:** 4-6 h p.i. Aguda: dolor, náuseas, urticaria.
- **INTESTINAL:** 7 d. Abdomen agudo o apendicitis.



- **ECTÓPICA (EXTRAGASTROINTESTINAL):** mesenterio, nódulos linfáticos, hígado, páncreas.
- **GASTROALÉRGICA:**
  - fiebre moderada, urticaria, asma, angioedema, anafilaxia, edemas y poliartritis.



**Penetración L3 pared digestivo:**  
lesión traumática, dolor hemorragia, inflamación.

Figura 3.- Anisakiosis humana (Sakanari, 1990; Daschner *et al.*, 2000).

### 3.2.- *Anisakis* Y ALERGIA

#### 3.2.1.- IMPLICACIÓN DE LARVAS VIVAS O MUERTAS

En 2002, se abrió el debate sobre si las larvas de tercer estadio de *Anisakis* debían de estar vivas para ser capaces de generar síntomas alérgicos (Audicana *et al.*, 2002).

A pesar de que ningún estudio hasta la fecha ha confirmado científicamente que los productos 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 alérgeno

alimentario, tratando de implicarlo, incluso, como causa de alergia ocupacional (Añíbarro y Seoane, 1998; Armentia *et al.*, 1998; Nieuwenhuizen *et al.*, 2006; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Barbuzza *et al.*, 2009; López y Pardo, 2010; Mossali *et al.*, 2010; Vidacek *et al.*, 2010).

Por ello, es necesario analizar la relación entre los parásitos y las alergias para mejorar nuestra comprensión acerca de la alergia a *Anisakis* y el papel de la IgE en esta parasitosis, lo que nos ayudará también a analizar de forma crítica cuestiones asociadas, como las definiciones de alérgeno y de alérgeno principal en el campo de la Parasitología (Daschner *et al.*, 2012).

Según el informe elaborado por la EFSA, *Anisakis* es el único parásito de los productos de la pesca implicado en reacciones alérgicas (EFSA, 2010), incluyéndose también como factor etiológico en las directrices para la evaluación de la anafilaxia (Simons *et al.*, 2011).

La alergia a *A. simplex* fue descrita por primera vez en Japón en 1990 (Kasuya *et al.*, 1990), pero el auge de las publicaciones en el campo de la alergia frente a dicho parásito, se inició en 1995, tras la descripción en España de nuevos casos de anafilaxia inducida por *A. simplex* (Audicana *et al.*, 1995). Así, 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 alérgeno y muchas investigaciones se han llevado a cabo siguiendo un protocolo clásico de alergia a alimentos, empezando por la detección y caracterización de alérgenos (Daschner *et al.*, 2012).

Como se ha indicado previamente, los panalérgenos de *A. simplex* han sido postulados como causantes de la aparición de reacciones cruzadas. Esta circunstancia ha llevado a varios autores a indicar que la reactividad cruzada es la 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 niveles de IgE específica en población sana es debida a parasitaciones previas por *A. simplex*, dadas las elevadas tasas de parasitación en los pescados destinados al consumo humano, además no se observó reacción cruzada con sueros de pacientes alérgicos a ácaros o pólenes. Asimismo, se demostró que la elevada seroprevalencia de 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 una relación entre la seropositividad y la utilización de métodos culinarios que no garantizan la muerte de las larvas, como el microondas o el rebozado (Puente *et al.*, 2008). Todos estos hechos sugieren que la infección con las larvas vivas es necesaria para el desarrollo de 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 gastrointestinal, causando anisakiosis gastroalérgica (Alonso *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 2000).

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 (> 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. En el año 2006, en España se publicó un Real Decreto sobre la prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. Todos estos datos tienen como consecuencia evitar que estos pacientes tengan que seguir una dieta estricta exenta de pescado, ya que la congelación del pescado a -20°C, durante un periodo mínimo de 24 horas, mata las larvas de *Anisakis*. Este sencillo consejo dietético evita que los pacientes previamente diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica sufran posteriores reacciones alérgicas asociadas a *A. simplex* (Reglamento CE 853/2004; Real Decreto 1420/2006).

Aunque se ha descrito la aparición de reacciones alérgicas, incluyendo la anafilaxia, tras la ingesta de pescados supuestamente bien cocinados, siendo atribuidas al contacto con alérgenos procedentes de larvas de *Anisakis* no viables (Audicana y Kennedy, 2008), el concepto de anisakiosis gastroalérgica implica que la reacción de hipersensibilidad clínica es generada por la respuesta inmunitaria inducida tras el parasitismo agudo por *A. simplex*, siendo 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 (Alonso *et al.*, 1999; Daschner *et al.*, 2000; 2001; Sastre *et al.*, 2000; Baeza *et al.*, 2004), lo que confirma que las larvas deben ser ingeridas vivas para provocar los síntomas asociados con la parasitación y la reacción de hipersensibilidad de tipo I asociada a la misma.

### 3.2.2.- PAPEL DE LA IgE ANTI-*Anisakis* EN LA REACCIÓN ALÉRGICA

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 (Shakib *et al.*, 2008), se basa en que la IgE producida como consecuencia del 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 estas células en los tejidos, provocando los típicos síntomas de la hipersensibilidad de tipo I, similares a los generados en la alergia alimentaria y también, en la anisakiosis gastroalérgica. Esto se puede comprobar porque la IgE específica producida en ambos casos (alergia alimentaria o alergia a *Anisakis*) puede ser detectada tanto por prueba cutánea (*Skin Prick Test/SPT*) como en el suero de los pacientes (Daschner *et al.*, 2001). Los primeros estudios realizados en Japón sobre la anisakiosis gástrica o intestinal, demostraron que la IgE específica se produce siempre, incluso aparece en pacientes sin síntomas de alergia clínicamente evidentes (Asaishi *et al.*, 1980), mientras que el dolor epigástrico que sufren los pacientes con anisakiosis gástrica, se ha postulado que se correlaciona con una reacción alérgica (Asaishi *et al.*, 1980).

Se ha demostrado que los pacientes con anisakiosis gastroalérgica muestran una estimulación policlonal dinámica después del contacto con los parásitos. La IgE específica aumenta al transcurrir un mes desde el contacto con las larvas, para luego descender lentamente a los seis meses o al año y los estudios mediante *Western-Blot* demuestran que se producen nuevas especificidades de esta inmunoglobulina, aumentando el reconocimiento de proteínas tanto sobre los extractos crudos larvarios como sobre los productos de excreción-secreción (Daschner *et al.*, 2002). Pero la IgE no es el único isotipo de inmunoglobulina que se produce, sino que también pueden ser detectadas IgG, IgG<sub>4</sub>, IgA e IgM frente a *A. simplex* en el suero de pacientes con anisakiosis gastroalérgica (Daschner *et al.*, 2002), por lo que la anisakiosis se puede considerar una entidad intermedia entre la alergia y el parasitismo (Daschner *et al.*, 2012).

En conclusión, la anisakiosis gastroalérgica (AGA), se ha descrito como una reacción alérgica aguda, de corta duración, con presencia de urticaria, angioedema y/o anafilaxia, con o sin manifestaciones abdominales, que se produce en el contexto de un parasitismo agudo por *A. simplex* (Daschner *et al.*, 2000). En estos pacientes, una historia clínica meticulosa (*SPT* positivo, y detección de IgE específica en suero) ratifica el diagnóstico presuntivo, lo cual es importante para el posterior asesoramiento dietético, en el que se recomendará a los pacientes evitar el consumo de pescado crudo, o poco cocinado.

Posteriormente a la descripción de las patologías agudas producidas por el contacto con el parásito vivo, se incluyó el concepto de urticaria crónica asociada a sensibilización a *A. simplex* (UC+) (Daschner y Pascual, 2005). La urticaria crónica es un trastorno común, caracterizado por la presencia de erupciones en la piel con picazón e hinchazón transitoria, que pueden ser recurrentes durante semanas o años.

Los estudios que confirman esta hipótesis han mostrado que los pacientes UC+ presentan niveles detectables tanto de inmunoglobulina IgE, como de IgG<sub>4</sub> específicas frente a *A. simplex*, lo que podría indicar la presencia de una parasitación activa previa (Daschner y Pascual, 2005).

#### **4.- DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la anisakiosis es difícil en algunas ocasiones. Esto es debido a que puede producir una amplia gama de manifestaciones clínicas a nivel gastrointestinal, comunes a una gran variedad de patologías digestivas. Además, en muchas ocasiones, la presencia de síntomas es escasa, por lo que no se llegan a realizar las exploraciones adecuadas.

Incluso en los casos más agudos, esta enfermedad suele confundirse con diversas patologías, como úlceras, apendicitis aguda, obstrucciones intestinales, pólipos de estómago, peritonitis tuberculosa, tumores o, enfermedad de Crohn (Oshima, 1972).

##### **1 Diagnóstico clínico**

Como ya se ha descrito previamente, los signos y síntomas de esta enfermedad no son específicos y pueden dar lugar a errores diagnósticos.

La anamnesis exhaustiva del paciente debe incluir un interrogatorio sobre la alimentación llevada a cabo, haciendo hincapié en los hábitos referentes al consumo de pescado crudo o poco cocinado y, sobre todo, si la ingesta del mismo se ha producido en las horas o días previos a la aparición de la sintomatología.

##### **2 Diagnóstico parasitológico**

Se trata de la observación directa de las larvas, las cuales presentan un tamaño de unos 2 a 2,5 cm, por 1 a 2 mm.

##### **3 Eliminación espontánea**

Las larvas se pueden observar e identificar tras la expulsión espontánea de las mismas tras un vómito o tos, lo que es poco frecuente (Deardorff *et al.*, 1987).

### **Laparotomía**

También se puede realizar la búsqueda de las larvas mediante diferentes técnicas. La laparotomía fue la primera técnica diagnóstica en la anisakiosis, junto con la resección de la lesión (Namiki *et al.*, 1970). Hoy en día, ha quedado relegada a un segundo plano tras la introducción de la endoscopia como método diagnóstico de elección en la anisakiosis gástrica.

### **Endoscopia digestiva**

Es la técnica de elección para la anisakiosis gástrica y para los casos de anisakiosis intestinal, en los que la lesión se encuentre accesible al endoscopio.

Las larvas de *Anisakis* son claramente visibles al ojo del endoscopista. El examen endoscópico puede demostrar una lesión ulcerada, sangrante en el estómago o en el duodeno con presencia de larvas de *A. simplex* en el centro de la lesión (Deardorff *et al.*, 1986).

También se han descrito casos de anisakiosis colónica, diagnosticada mediante colonoscopia.

## **4 Estudios radiológicos**

Son los estudios de elección para el diagnóstico de la anisakiosis intestinal, en los casos en que la lesión no es accesible al endoscopio.

En los estudios baritados, se observa una imagen típica de defecto filiforme de unos 30 mm de longitud de depleción de contraste (Matsui *et al.*, 1985).

La tomografía computerizada muestra engrosamiento de la mucosa intestinal o gástrica (Lee *et al.*, 2014; Shibata *et al.*, 2014; Takabayashi *et al.*, 2014).

## 5 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico tiene gran utilidad para confirmar un diagnóstico de presunción, cuando no se han observado las larvas mediante endoscopia y/o radiología.

Los niveles de inmunoglobulinas específicas frente a *Anisakis* están a menudo elevados, tanto las inmunoglobulinas totales como la inmunoglobulina IgE, especialmente en aquellos pacientes que desarrollan reacciones alérgicas tras la infección (Desowitz *et al.*, 1985; García *et al.*, 1997; Moreno-Ancillo *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 1999).

Hasta hace relativamente poco, se utilizaron técnicas como reacciones de precipitación aplicadas por Kobayashi *et al.* (1985) y Mudry *et al.* (1986). Daniels, en 1962, describió la fijación del complemento como técnica diagnóstica, observando resultados negativos en casos de la anisakiosis confirmada quirúrgicamente y un 2,5% de positivos en sueros de individuos con escasas probabilidades de haber sufrido una exposición previa a las larvas (Pollak y Kamplemacher, 1966).

En general, estas técnicas presentaban una pobre especificidad y sensibilidad, debido a la elevada homología antígenica existente entre *Anisakis* y otros nematodos como *Toxocara* y *Ascaris*, lo que genera la presencia de reactividad cruzada (Kennedy *et al.*, 1988; Iglesias *et al.*, 1996).

Para evitar estos problemas, se desarrollaron técnicas inmunoenzimáticas como *ELISA*. Sakanari *et al.* (1989) estudiaron la respuesta de IgG e IgM por esta técnica en cuatro pacientes con anisakiosis intestinal confirmada mediante la identificación de la larva de tercer estadio de *A. simplex* en un corte histológico, tras la resección del íleon. Los autores enfrentaron el extracto somático crudo de larvas de tercer estadio de *A. simplex* preparado, según el protocolo dado por Desowitz *et al.* (1985), con sueros supuestamente inmunes de los cuatro pacientes.

Akao *et al.* (1990) utilizaron productos de excreción-secreción obtenidos según el método de Raybourne *et al.* (1986). Sugane *et al.* (1992) realizaron *immunoblot*, utilizando como antígeno, tanto extractos larvarios somáticos, como productos de excreción-secreción procedentes de las larvas.

Yagihashi *et al.* (1990), desarrollaron una técnica de *ELISA* para el diagnóstico de la anisakiosis humana, usando un anticuerpo monoclonal (An2), para estudiar 93 sueros de pacientes con anisakiosis en distintos estadios clínicos y de distinta evolución

(de un día a 12 semanas). Este método ha sido posteriormente validado y utilizado en España por Iglesias *et al.* (1997). El método *ELISA* ha sido utilizado para detectar anticuerpos específicos en individuos sanos (García-Palacios *et al.*, 1996) y en pacientes sensibilizados a *A. simplex* (Montoro *et al.*, 1997), enfermos de Crohn e individuos con hemorragia digestiva (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Como se muestra en la Tabla 4, existen varios alérgenos de *A. simplex* que han sido caracterizados. El alérgeno Ani s 7 es uno de los que ha cobrado mayor importancia, se trata de una glicoproteína con un peso molecular de 139 kDa y, se ha observado que el 100% de los pacientes con parasitación aguda presentan niveles de IgE frente al mismo, postulándose como marcador de parasitación (Anadón *et al.*, 2010).

Sin embargo, no ha podido ser claramente identificado ningún alérgeno que distinga aquellos pacientes parasitados, con o sin reacción alérgica concomitante. Este hecho pone en duda la responsabilidad de algunos alérgenos como los causantes de la aparición de la reacción alérgica, pese a la detección de IgE específica frente a ellos mediante *ELISA* o *immunoblot* y, pese al hecho de que muchos de los alérgenos sean resistentes al tratamiento térmico y a la acción de la pepsina (Daschner y Cuéllar, 2010).

Los resultados de Anadón *et al.* (2010) sugieren que el método *ELISA* para la detección de IgE específica frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 es la opción más sensible y específica para el correcto serodiagnóstico de la anisakiosis humana. Recientemente, la especificidad demostrada por la hemoglobina de *Anisakis* (Ani s 13) hacen de este alérgeno un potencial candidato para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos (González-Fernández *et al.*, 2015a).

Como técnica de rutina a nivel hospitalario, se ha implantado la utilización del Fluoenzimoimmunoensayo. *Pharmacia CAP-System RAST® FEIA* es un test que mide *in vitro* la presencia de IgE específica circulante en muestras de sangre humana. En el diagnóstico de la anisakiosis gastroalérgica es de gran utilidad, junto con la anamnesis, la determinación de IgE total y específica, pasado un mes de la aparición de la sintomatología originada por la ingestión de la larva (Daschner *et al.*, 1999). Audicana *et al.* (1995) relacionaron por primera vez los antígenos de *A. simplex* con procesos alérgicos mediante el uso de *CAP-System*. Posteriormente, este método ha sido utilizado por numerosos autores (Arduzzo *et al.*, 1996; del Pozo *et al.*, 1996; García-Palacios *et al.*, 1996; Montoro *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 2000).

## 6 Pruebas cutáneas

La posibilidad de utilizar pruebas cutáneas en el diagnóstico de esta parasitosis, se debe al desarrollo de una hipersensibilidad de tipo I. La técnica más utilizada para el diagnóstico es el método *Skin Prick Test (SPT)*, aunque también se han realizado pruebas intracutáneas ya utilizadas por Oshima (1972), sin llegar a aplicarse en clínica debido al gran número de reacciones cruzadas presentes con otros nematodos. El *SPT* se incluye en la rutina diagnóstica cuando existe sospecha de alergia a *Anisakis* (Daniels, 1962; Santaolalla *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 1999; Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000; Sastre *et al.*, 2000).

Los primeros investigadores que utilizaron el antígeno de *Anisakis* mediante esta técnica fueron Kasuya *et al.* (1990). En España se introdujo este método en 1995 (Audicana *et al.*), el cual consiste en la administración del antígeno (se suelen emplear antígenos totales del parásito) a estudiar, en la piel del antebrazo del paciente, junto con un control positivo de histamina y un control negativo de solución salina.

## 7 PCR

Perteguer *et al.* (2004) desarrollaron la técnica *PCR-RFLP* para la identificación especie-específica de anisákidos parásitos humanos, independientemente de su estadio evolutivo. Concluyen que la elevada sensibilidad del test y la ausencia de variaciones intraespecíficas confirman la utilidad del ensayo en la identificación de parásitos implicados en la anisakiosis humana incluyendo las larvas procedentes de biopsias.

Actualmente, podemos concluir que, mientras la historia clínica constituye el método diagnóstico más evidente e importante en los pacientes con AGA, la detección de IgE específica en suero, o la positividad de *SPT* en los UC+, no pueden ser asociadas con un claro episodio de parasitismo, puesto que podrían deberse a la presencia de una reacción cruzada con otras especies de invertebrados (Pascual *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2001; Bernardini *et al.*, 2005).

#### 4.1.- DIFERENCIACIÓN DE ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex* MEDIANTE EL USO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES

Un 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 la muestra 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 (Anadón *et al.*, 2010).

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* (Daschner *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se midieron anticuerpos de los isotipos IgE e IgG<sub>4</sub> frente a la hemoglobina de *A. simplex* en sueros de pacientes diagnosticados de AGA y UC+ (González-Fernández *et al.*, 2015a). 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* (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013). 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 los alérgenos (<http://www.allergen.org>) (González-Fernández *et al.*, 2015a).

Al realizar el análisis por patología, se vio que el 80,9% de los sueros del grupo de anisakiosis gastroalérgica fueron positivos, frente un 47,8% de los pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*. En el caso de la IgG<sub>4</sub>, el 31,8% de los individuos sensibilizados resultaron positivos (47,6% en anisakiosis gastroalérgica 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* (González-Fernández *et al.*, 2015b).

Con el fin de determinar qué porcentaje de los pacientes con UC+ ha sido parasitado previamente por este nematodo, resulta necesario evaluar la respuesta a nivel de IgE frente a los alérgenos principales de *A. simplex*, Ani s 1 y Ani s 7, de los cuales, al menos Ani s 7 es liberado únicamente por la larva viva (Anadón *et al.*, 2009; Ubeira *et al.*, 2011). Del mismo modo, sería interesante determinar la presencia de IgE específica frente a

ambos alérgenos, tanto en los pacientes diagnosticados de AGA, como en los pacientes con urticaria crónica sin sensibilización previa a *A. simplex* (UC-) (SPT y detección de IgE específica en suero negativas) y, finalmente, en un grupo control (individuos sanos, sin sensibilización frente a *A. simplex*, ni urticaria).

#### **4.2.- IgG<sub>4</sub> ESPECÍFICA COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex***

La IgE específica es un isotipo de inmunoglobulina, propia de la respuesta inmunológica tipo Th<sub>2</sub>, que está asociada con diferentes tipos de alteraciones alérgicas, como la alergia respiratoria, la alergia alimentaria o la alergia a himenópteros. Esta inmunoglobulina actúa, fundamentalmente, a través del entrecruzamiento de sus receptores de alta afinidad FcεRI, situados en los mastocitos tisulares y en los basófilos circulantes, lo que produce una degranulación de estas células, promoviendo una cascada de eventos, con efectos patogénicos en las alteraciones alérgicas o, protectores en las infecciones parasitarias, ya que ayuda a disminuir la carga parasitaria, hecho observado en distintos modelos animales y humanos (Urban *et al.*, 1992; Anthony *et al.*, 2007; Hopkin, 2009; Daschner *et al.*, 2012).

En la anisakiosis gastroalérgica, se ha demostrado que la respuesta inmunológica de tipo Th<sub>2</sub> es responsable de las reacciones de hipersensibilidad aguda desarrolladas, aunque también se ha postulado que este tipo de respuesta inmunológica previene la aparición de complicaciones graves, limitando la penetración de la larva de tercer estadio de *A. simplex*, inducida por la liberación de proteasas por parte de la larva viva (Daschner *et al.*, 1998; 2000).

En este tipo de respuesta inmunitaria inducida por parásitos, también se ha observado la producción concomitante de varios isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo la IgG<sub>4</sub> (Daschner *et al.*, 2002). Esta inmunoglobulina tiene un papel protector en la alergia, ya que actúa como un anticuerpo bloqueante del alérgeno (Stapel *et al.*, 2008), mientras que, por el contrario, en las enfermedades parasitarias, se han asociado las altas cantidades de anticuerpos IgG<sub>4</sub>, o el bajo cociente IgE/IgG<sub>4</sub> con la severidad de la enfermedad, la carga parasitaria, o el riesgo de reinfección (Urban *et al.*, 1992; Loukas *et al.*, 1996; Reddy y Fried, 2008).

En otras enfermedades de tipo alérgico, la IgG<sub>4</sub> específica se ha asociado con la protección, incluso cuando hay presencia de IgE específica. Resulta interesante, por tanto, analizar si en los pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis*, los valores de IgG<sub>4</sub> varían entre el grupo AGA y UC+, al igual que lo hacen los niveles de IgE.

Por otro lado, también es necesario investigar el porcentaje de pacientes positivos presentes en ambos grupos, para determinar si efectivamente para el caso de la IgG<sub>4</sub> es mayor en los pacientes de AGA, y frente a ambos alérgenos principales Ani s 1 y Ani s 7.

El cociente IgG<sub>4</sub>/IgE ha sido utilizado como biomarcador para evaluar el curso clínico tanto de la alergia, como de la inmunoterapia (Caubet *et al.*, 2012; Wright *et al.*, 2016), por lo que resultaría interesante su estudio frente a los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7, para comprobar si aumenta en los casos de AGA, lo que sugeriría su papel como factor de protección y/o marcador de enfermedad.

La anisakiosis gastroalérgica no puede considerarse una enfermedad parasitaria típica, puesto que, al no estar *A. simplex* bien adaptado al hospedador humano, no es capaz de sobrevivir más que unos pocos días en su interior, sin embargo, es capaz de provocar una reacción aguda y autolimitada, cuyas complicaciones crónicas gastrointestinales, o extraintestinales, no serán debidas a un parasitismo crónico, sino que, se deberán a la respuesta inmunológica generada (Sugimachi *et al.*, 1985; Daschner y Cuéllar, 2010). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que las reacciones alérgicas son frecuentes en los parasitismos agudos producidos por este nematodo (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002; Reddy y Fried, 2008). Por tanto, la presencia de IgE e IgG<sub>4</sub> debe ser interpretada en este contexto especial, así en los pacientes UC+, la IgG<sub>4</sub> frecuentemente se encuentra ausente, además este isotipo de inmunoglobulina se ha asociado con las manifestaciones clínicas de las alteraciones alérgicas asociadas con *Anisakis* (Daschner y Pascual, 2005).

Como se ha indicado anteriormente, se han identificado más de 14 alérgenos asociados con la producción de IgE frente a este parásito, aunque no se ha investigado apenas acerca de la producción de otros isotipos distintos de inmunoglobulinas frente a los mismos.

Basándonos en estos hechos, los distintos patrones de reconocimiento de la IgG<sub>4</sub> específica podrían ayudar en el diagnóstico de las alteraciones alérgicas asociadas con *Anisakis*.

Por ello, sería interesante investigar la posible presencia de IgG<sub>4</sub> específica frente a los dos alérgenos principales de *Anisakis*, Ani s 1 y Ani s 7, tanto en pacientes AGA como UC+, teniendo en cuenta los posibles factores conocidos que afectan a la producción de IgG<sub>4</sub>, como son la edad, el intervalo de tiempo desde la aparición del último episodio parasitario y la ingesta de pescado.

## **5.- RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA ANISAKIOSIS**

En la anisakiosis, la sensibilización temprana se producirá cuando la larva viva de tercer estadio de *A. simplex* intente penetrar en la mucosa gastrointestinal del hospedador humano. Esto provocará una polarización de la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th<sub>2</sub>, con la consiguiente producción de IgE específica frente a los antígenos de superficie, o somáticos y frente a los productos de excreción-secreción liberados por la larva. Se producirá un aumento de los niveles de IgE circulante, así como de la cantidad de IgE unida al receptor de alta afinidad FcεRI, presente en la superficie de los mastocitos localizados tanto a nivel de la submucosa, como en otros órganos diana, como la piel.

La existencia de mastocitos sensibilizados, después de un episodio previo de parasitación, se puede demostrar mediante la observación de pruebas cutáneas positivas. Si, posteriormente, la larva viva de tercer estadio penetra de nuevo en el epitelio gástrico, en un nuevo episodio después de la sensibilización, las proteasas liberadas por la larva, junto con otros productos de excreción-secreción, ayudarán al parásito a migrar a través del epitelio y a evadir la respuesta inmunológica.

Un mecanismo de evasión consiste en el bloqueo de la acción protectora de la IgA secretora por las cantidades masivas de productos de excreción-secreción liberados en la submucosa, los cuales 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, capaces de unirse a las moléculas de IgE que se encuentran sensibilizando a los mastocitos. El entrecruzamiento de las moléculas de los receptores FcεRI activará estas células, las cuales liberarán tanto la histamina, como otros mediadores inflamatorios contenidos en sus granulaciones, así como citoquinas, provocando una respuesta inflamatoria local que en los casos de anisakiosis gástrica puede ir acompañados de síntomas alérgicos, como son la urticaria o la anafilaxia.

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 (Figura 4).

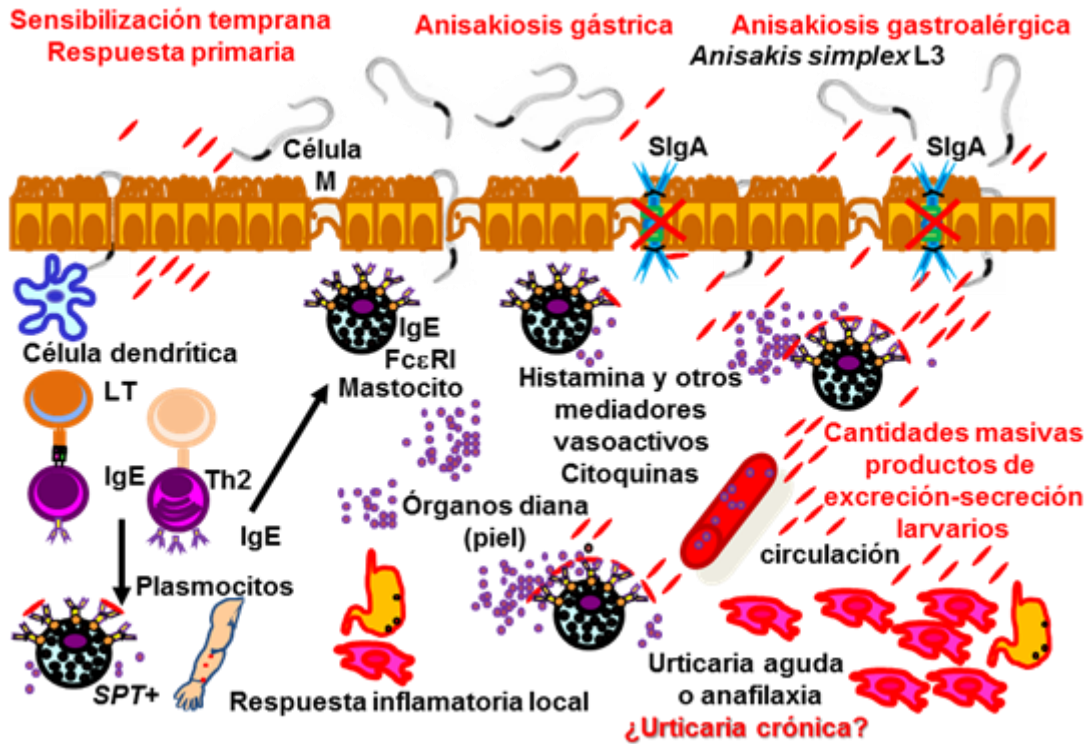


Figura 4.- Sensibilización en la anisakiosis gastroalérgica (Modificado de Daschner *et al.*, 2012).

En resumen, *A. simplex* es un parásito cosmopolita del pescado, el cual está asociado tanto con la urticaria aguda desarrollada en la AGA, como con la urticaria crónica asociada a la sensibilización frente a este nematodo (UC+) (Daschner *et al.*, 2000). Por este motivo, resulta necesario estudiar la asociación de los distintos fenotipos de urticaria con el distinto perfil de la producción de citoquinas liberadas en ambas entidades clínicas.

Los síntomas de la alergia aguda aparecen, únicamente, cuando se ha producido un parasitismo agudo por la larva viva, la cual secreta activamente los productos de excreción-secreción a la submucosa del 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 (Anadón *et al.*, 2009) y debería ser reconocida por la inmunoglobulina IgE en la totalidad de los pacientes de AGA. Por ese motivo, es necesario comprobar este hecho, así como investigar si esos pacientes toleran bien la ingesta de pescado cocinado, a diferencia de lo que ocurre en las alergias de tipo alimentario.

Si esto es así, habría que plantearse el por qué estos pacientes han sido capaces de desarrollar esta tolerancia. En sucesivos contactos con los antígenos larvarios, los factores de protección podrían impedir que los mastocitos sensibilizados de la submucosa y de otros órganos diana entren en contacto con los alérgenos. Estos factores bloqueantes podrían incluir la IgA secretora, IgA circulante o tisular o IgG<sub>4</sub>, que compiten por los alérgenos, o factores inmunomoduladores secretados por las larvas de *A. simplex* al igual que ocurre en otras helmintosis (Daschner *et al.*, 2012) (Fig. 5).

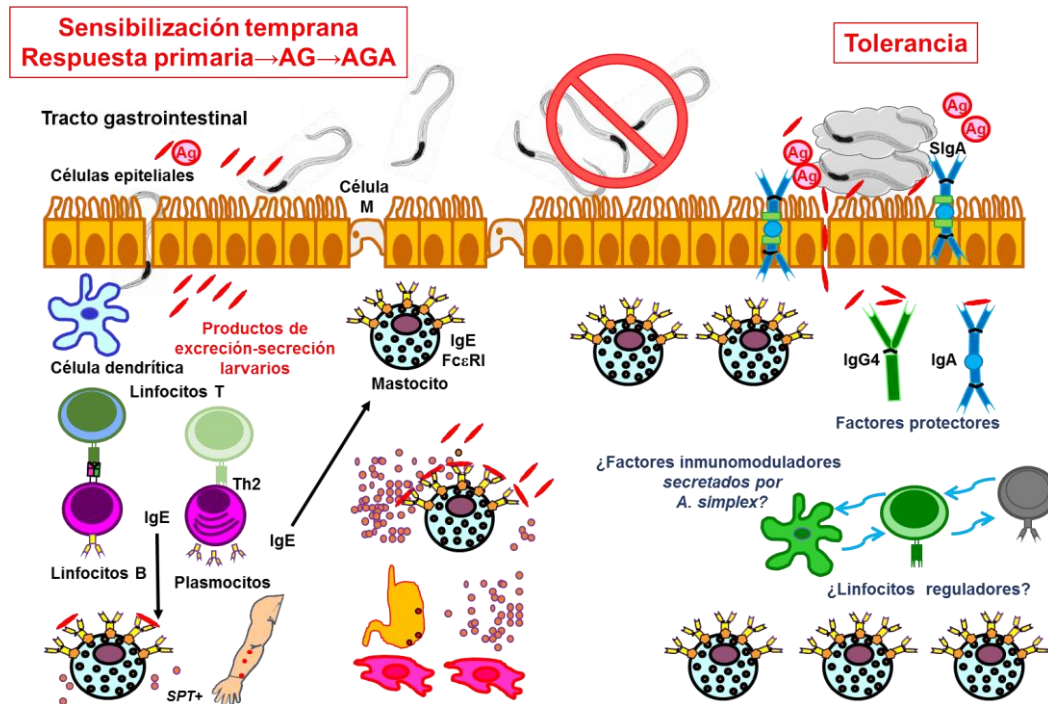


Figura 5.- Inducción de tolerancia en la anisakiosis gastroalérgica (Modificado de Daschner *et al.*, 2012).

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 Th<sub>1</sub>, al inhibir la producción de óxido nítrico por macrófagos activados (Cuéllar *et al.*, 1998); habiéndose también confirmado su potencial antiinflamatorio por la presencia de moléculas tipo IL-4 (Cuéllar *et al.*, 2001) y por su actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento (García-Hernández *et al.*, 2007; 2009; 2012). 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 (Perteguer *et al.*, 2001). Park *et al.* (2009) comprobaron también que *A. simplex* produce un homólogo del factor inhibidor de la migración de macrófagos capaz de

suprimir las respuestas Th<sub>2</sub> en un modelo de asma alérgico mediante el reclutamiento de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3.

Muchos investigadores se han planteado la “Hipótesis de los Helmintos” que se basa en los siguientes hechos:

- La coexistencia de los helmintos parásitos en el cuerpo humano a través de la evolución humana ha producido la selección de un sistema inmunológico adaptado a los helmintos que incluye la producción de IgE (Fumagalli *et al.*, 2009).
- Las medidas sanitarias para reducir las infecciones helmínticas han alterado nuestra inmuno-ecología y, consecuentemente, los niveles de IgE producidos por la estimulación por los helmintos se han visto disminuidos en los humanos.
- La ausencia de estimulación de la producción de IgE por los helmintos ha aumentado la vulnerabilidad frente a enfermedades infecciosas, alergias y enfermedades autoinmunes (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002; Rook, 2009; Allen y Maizels, 2011).

Pero otros investigadores se plantean si esas hipótesis son realmente ciertas, exponiendo las siguientes cuestiones:

- ¿La tasa de IgE es proporcional a la carga parasitaria?
- ¿Hay suficientes evidencias que demuestren la coevolución entre humanos y helmintos?
- ¿Fueron los helmintos responsables de esa presión selectiva para el funcionamiento del sistema inmunológico?
- ¿Los niveles elevados de IgE producidos por selección natural supusieron una ventaja dietética?
- ¿Los niveles elevados de IgE pudieron permitir a los cazadores-recolectores consumir una gran variedad de plantas que de otra manera resultarían tóxicas? (London y Hruschka, 2014).

Caraballo y Acevedo (2011), al estudiar el impacto de las infecciones por *Ascaris lumbricoides* sobre la alergia en regiones tropicales plantean nuevas dudas acerca de las posibles relaciones entre los helmintos y el sistema inmunológico:

- ¿Las infecciones crónicas con cargas parasitarias altas producen inmunosupresión?
- ¿Las infecciones intermitentes con cargas parasitarias bajas estimulan la producción de IgE?
- ¿La ausencia de infección significa ausencia de inmunorregulación?

Resulta evidente que, 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 inmunorreguladoras, como IL-10 o TGF- $\beta$ , lo que tiene como consecuencia la generación de linfocitos T reguladores (Treg), la expansión de linfocitos Th<sub>2</sub> y la modulación negativa de los clones de linfocitos T de fenotipo proinflamatorio. Esto, indirectamente, puede tener como consecuencia la mejoría de las afecciones autoinmunes, así como, la prevención del desarrollo de alergias. La mejor comprensión de los mecanismos inflamatorios ha dado lugar a un nuevo paradigma en la inmunidad frente a los helmintos. Se ha demostrado que los helmintos actúan sobre los epitelios, provocando la liberación de unas citoquinas, denominadas “alarminas”, como IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica, que inducen células de la inmunidad innata de tipo 2 que producen IL-4, IL-5 e IL-13 y estimulan respuestas Th<sub>2</sub>. También se generan linfocitos B reguladores que producen IL-10, además de los linfocitos T reguladores. Estos mecanismos deprimen las células Th<sub>1</sub> y Th<sub>17</sub> que están implicadas en la respuesta inflamatoria inicial. Todos estos efectos se producen en el contexto de una predisposición genética, donde los helmintos pueden alterar la respuesta inmunológica, a través de la regulación evolutiva del “immunoma”, así como la regulación epigenética en etapas clave del desarrollo, como en el periodo intrauterino y en la primera infancia (Khan y Fallon, 2013; Wammes *et al.*, 2014) (Fig. 6).

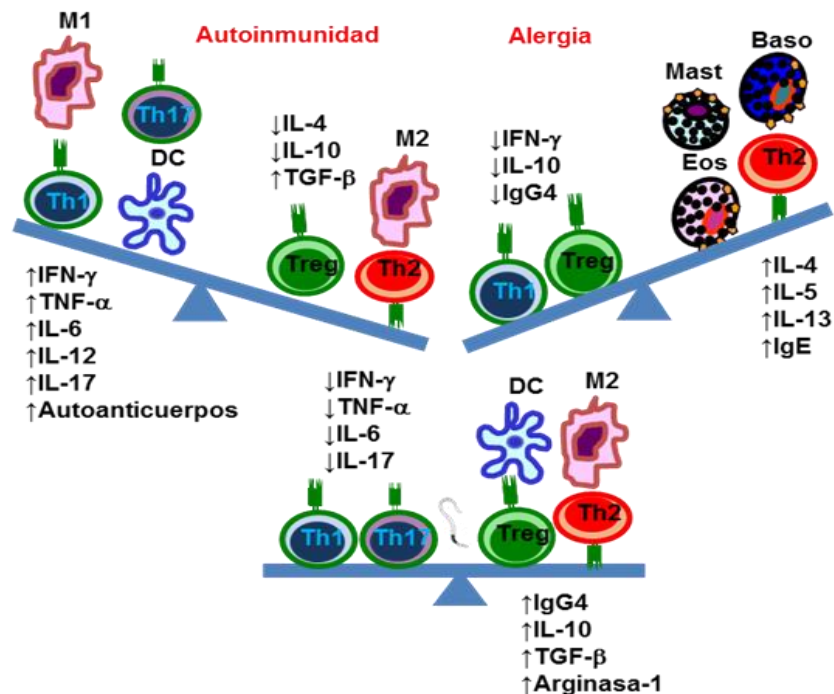


Figura 6.- Paradigma helmintos/inmunidad. Coadaptación parásito/hospedador (Modificado de Khan y Fallon, 2013).

Finalmente, aplicando las leyes de la biología evolutiva a *Anisakis*, la elevada prevalencia de enfermedades alérgicas, clínicamente subsecuentes al parasitismo por este nematodo, se podría atribuir al hecho de que el ser humano no es el hospedador natural de este parásito y que el parasitismo por *Anisakis* es sólo agudo o “intermitente” y, por lo tanto, carece de las características inmunorreguladoras 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 del pescado parasitado (Daschner y Cuéllar, 2010).

Hemos dicho que, debido a que el ser humano no es el hospedador natural de *Anisakis* y, a que el parasitismo en este caso es sólo agudo o “intermitente”, podría carecer de las características inmunorreguladoras típicas de las helmintosis crónicas, provocando por ello, siempre enfermedad (Daschner y Cuéllar, 2010). Para dilucidar la implicación de los posibles mecanismos inmunomoduladores en el hospedador humano es necesario estudiar 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 (Daschner *et al.*, 2011).

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- $\beta$ , con valores significativamente más altos en los casos de los pacientes de AGA. 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 predisuestos (Daschner *et al.*, 2011).

Sería necesario confirmar este hecho utilizando sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica obtenidos de los pacientes con el fin de comprobar si, tras la estimulación con el antígeno, los valores de la citoquina antiinflamatoria IL-10 siguen siendo superiores en AGA y, si la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$  es mayor en los pacientes de UC+, que en los pacientes de AGA, lo que en otras palabras podría indicar que el fenotipo de AGA produciría una respuesta antiinflamatoria mayor que el de UC+, el cual, consecuentemente, produciría mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias.

## 5.1.- URTICARIA CRÓNICA

La urticaria crónica es una enfermedad incapacitante que afecta a la calidad de vida del 0,1% de la población, a nivel global (Greaves y O'Donnell, 1995; O'Donnell *et al.*, 1997). Constituye un grupo muy heterogéneo, ya que en su génesis están implicados múltiples factores, independientemente del estado de autoinmunidad del sujeto, pese a que estudios previos la habían asociado con un posible origen autoinmune (Grattan *et al.*, 1991; Greaves, 2000). Diversos estudios intentan dividir esta patología en fenotipos, en función de los factores implicados en su aparición, como pueden ser: agentes infecciosos, estímulos físicos, la intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y un estatus atópico (Park *et al.*, 2008; Zuberbier *et al.*, 2009).

La urticaria crónica está considerada como un desorden inflamatorio. Como tal, mecanismos aún desconocidos son responsables de producir la activación de los mastocitos, consiguiendo la liberación de mediadores biógenos y el desarrollo de manifestaciones clínicas propias de una reacción inflamatoria (Bingham, 2008). Algunos estudios refuerzan esta hipótesis, ya que se han encontrado citoquinas proinflamatorias, implicadas en la severidad de esta patología y también en la característica ausencia de mecanismos reguladores, propia de esta enfermedad (Piconi *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2008; Cuéllar *et al.*, 2010; Kasperska-Zajac *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado previamente, *A. simplex* es un nematodo parásito, capaz de dar lugar a diversas patologías en el ser humano, en función del tipo de contacto establecido con el hospedador: agudo o crónico. Por un lado, si la infección es de tipo agudo, puede desarrollarse una entidad clínica, definida como AGA, que se caracteriza por la aparición, durante un corto periodo de tiempo, de una reacción urticarial aguda, mediada por IgE, angioedema y/o anafilaxia (Daschner *et al.*, 2000; Daschner y Pascual, 2005). Por otro lado, si el contacto es de tipo crónico, puede desarrollarse un fenotipo de urticaria crónica (UC+) (Daschner y Pascual, 2005; Daschner *et al.*, 2005). Este último fenotipo de UC+ constituye un porcentaje superior al 50% de los pacientes atendidos en los servicios de alergia de nuestra región. Dentro de este porcentaje, se ha observado la existencia de un subgrupo relevante, en el cual la sensibilización frente a *A. simplex* ha sido producida por episodios previos de parasitación (Daschner *et al.*, 2005). La detección de IgE específica frente a *A. simplex* explica sólo el parasitismo previo en un paciente dado, pero no está necesariamente ligada a una relación causal o temporal con el comienzo de la aparición de la urticaria crónica, por lo que, para el desarrollo de este tipo de urticaria crónica, sería necesaria la existencia de otros factores estimulantes de mayor relevancia, aún desconocidos.

La caracterización de los diferentes fenotipos de urticaria crónica estaría justificada para la búsqueda de posibles tratamientos diferenciados. Estos incluyen, principalmente, evitar factores desencadenantes tales como los estímulos físicos, el tratamiento farmacológico y el posible asesoramiento dietético. Este último punto, apenas es utilizado, debido al hecho de que los datos acerca de que la urticaria crónica mediada por la IgE inducida por la alimentación son tan sólo anecdóticos. Sin embargo, algunos estudios han subrayado el posible papel de la dieta libre de pseudoalérgenos en pacientes con urticaria crónica (Zuberbier *et al.*, 1995; Zuberbier *et al.*, 2009).

La sensibilización frente a *A. simplex* está influenciada *per se* por los hábitos dietéticos, ya que se ha demostrado que la ingesta repetida de pescado crudo es un factor de riesgo para la sensibilización y la aparición de urticaria (Fernández de Corres *et al.*, 2001; Puente *et al.*, 2008). Aún se debate el papel de *A. simplex* como un alérgeno oculto capaz de producir reacciones agudas mediadas por IgE (Daschner *et al.*, 2012), pero puede interpretarse como un antígeno de relevada importancia, asociado a los alimentos, ya que aún no se han estudiado en profundidad los posibles mecanismos inmunológicos en los que participa. Además, el pescado no es únicamente una posible fuente de aminas biógenas, que podrían estar asociadas con la aparición de habones (Lessof *et al.*, 1990), sino que también constituye una fuente de ácidos grasos poli-insaturados  $\omega$ 3 (PUFA), capaces de modular la respuesta inflamatoria, como se ha demostrado en diversas patologías, tales como enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, desórdenes alérgicos y depresión (Weaver *et al.*, 2009).

Los motivos expuestos avalan el interés que supone la determinación de las diferentes características dietéticas, inmunológicas y clínicas que existen en los pacientes UC+ y UC-, así como la observación de cómo una dieta temporal sin pescado podría modular de forma diferente la respuesta inmunológica y clínica en dichos pacientes.

### **5.2.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA**

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 Th<sub>1</sub>, mientras que los helmintos inducen un fenotipo Th<sub>2</sub> 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 a la resistencia, la susceptibilidad y a las manifestaciones clínicas (Supali *et al.*, 2010). Estos hechos pueden también influir en 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 (Fig. 7).

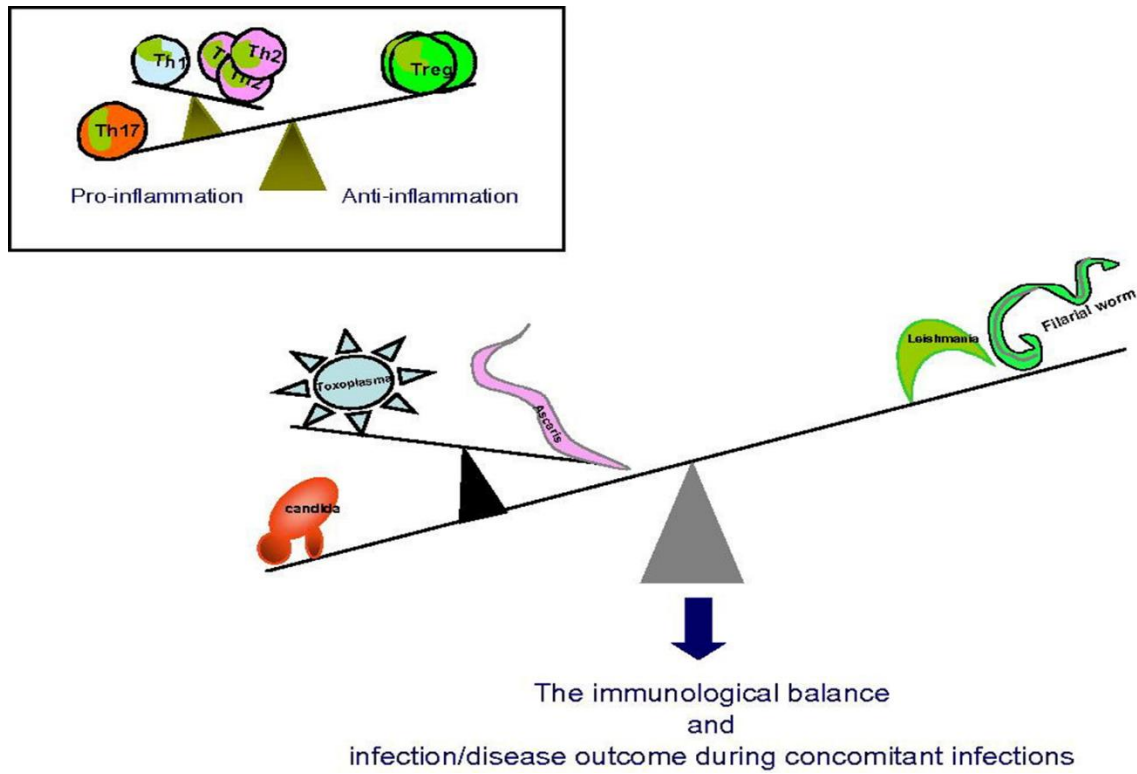


Figura 7.- Impacto del poliparasitismo sobre el sistema inmunológico (Supali *et al.*, 2010).

### 5.2.1.- *Toxoplasma gondii*

La prevalencia de las reacciones alérgicas se ha visto incrementada en los países desarrollados durante las últimas décadas (Bach, 2002; Okada *et al.*, 2010). La hipótesis de la higiene, descrita por primera vez por Strachan en 1989, ha adquirido una especial relevancia al destacar el importante papel de los factores ambientales como una posible explicación a este incremento, defendiendo que una disminución de la exposición a agentes infecciosos o comensales durante los primeros años de vida podría estar asociada con un aumento en el riesgo de padecer alteraciones atópicas o, incluso, enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas, como la Diabetes Mellitus tipo I, la enfermedad inflamatoria intestinal o la esclerosis múltiple (Maizels, 2005; Okada *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que una alteración en el balance de la respuesta inmunitaria Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> podría ser el responsable del aumento de las reacciones alérgicas, aunque las evidencias epidemiológicas han demostrado que también existe una asociación positiva entre las

alteraciones inflamatorias y la respuesta inmunitaria de tipo Th<sub>1</sub> (Sheikh *et al.*, 2003). Las revisiones realizadas en los últimos años sobre la hipótesis de la higiene han establecido la existencia de un defecto en la evolución de los mecanismos reguladores del sistema inmunológico, como consecuencia de la falta de exposición coevolutiva a microorganismos o parásitos (Yazdanbakhsh y Matricardi, 2004; Rook, 2007).

*Toxoplasma gondii* es un protozoo parásito intracelular de distribución cosmopolita, que afecta a más del 30% de la población humana (Matowicka-Karna *et al.*, 2009). Su prevalencia varía en función de la localización geográfica, la edad y los hábitos alimenticios e higiénicos (Linneberg *et al.*, 2003). En hospedadores inmunocompetentes, la toxoplasmosis se establece como una infección crónica, fundamentalmente asintomática. Aunque en el caso de *T. gondii*, aún no se ha podido demostrar, se ha observado una asociación positiva entre la presencia de numerosos agentes infecciosos, con una vía de transmisión oral-fecal, con la presencia de reacciones alérgicas (Ellertsen *et al.*, 2008).

Como se ha citado previamente, la urticaria crónica es una alteración común, con una tasa de prevalencia del 1,8%, caracterizada por la aparición de ronchas recurrentes, que afectan a la calidad de vida de las personas que la padecen (Zuberbier *et al.*, 2010). Numerosos estudios han intentado, sin éxito, establecer una asociación entre la urticaria crónica y la polarización de la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub>, aunque sí pudieron demostrar una predominancia tipo Th<sub>0</sub> o Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> mixta (Ferrer *et al.*, 2002).

En el 2011, un nuevo estudio publicado por Daschner *et al.* propuso la existencia de una asociación entre la presencia de urticaria crónica y alteraciones en el balance Th<sub>17</sub>/Treg de la respuesta inmunitaria. Además, en 1991, en un estudio publicado por Grattan *et al.*, se observó la presencia de un componente autoinmune en un alto porcentaje de estos pacientes. La etiología de la urticaria crónica continúa siendo prácticamente desconocida y no ha sido analizada con respecto a la hipótesis de la higiene, aunque existen evidencias epidemiológicas de una asociación entre los distintos fenotipos de urticaria crónica y determinados agentes infecciosos como *H. pylori* o *A. simplex* (Wedi *et al.*, 2004; Daschner *et al.*, 2010b).

En España, un elevado porcentaje de los casos de urticaria crónica están asociados a la sensibilización frente al parásito *A. simplex* (Daschner y Pascual, 2005; Cuéllar *et al.*, 2010). Mientras que dicha sensibilización se encuentra asociada a una respuesta Th<sub>2</sub>, frente a *T. gondii* está asociada a una respuesta Th<sub>1</sub>, por lo que se podría hipotetizar que ambas infecciones podrían estar relacionadas negativamente. Para demostrar esta

hipótesis, resulta necesario estudiar a los pacientes de urticaria crónica con respecto a estos agentes infecciosos inmunológicamente antagonistas.

Por ese motivo, teniendo en cuenta que *T. 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 hábitos dietéticos, 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, es necesario analizar la relación entre ambos agentes en la urticaria crónica, con el fin de comprobar si, en los pacientes con urticaria crónica, *T. gondii* podría tener algún efecto protector sobre la sensibilización a *Anisakis*.

### 5.2.2.- *Helicobacter pylori*

Como ya hemos citado anteriormente, a lo largo de las últimas décadas se ha observado un incremento de la prevalencia de las reacciones alérgicas en los países desarrollados (Bach, 2002; Okada *et al.*, 2010). Strachan describió por primera vez en 1989, la denominada hipótesis de la higiene, en la que defendía que el incremento de las reacciones alérgicas en los países industrializados, estaba relacionado con una menor exposición a agentes patógenos durante la infancia, como consecuencia de la mejora en las condiciones higiénicas y en la disminución del número de hijos. Estudios más recientes completaron esta hipótesis al observar también un aumento en la prevalencia de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas como, por ejemplo, la Diabetes Mellitus I, la enfermedad de Crohn y la esclerosis múltiple (Maizels, 2005; Okada *et al.*, 2010). Estos estudios defienden que el aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas y autoinmunes, se debe, fundamentalmente, a un desequilibrio en la respuesta inmunológica Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, y a una falta de regulación de su respuesta por parte de las células T reguladoras (Sheikh *et al.*, 2003).

Las revisiones realizadas en los últimos años sobre la hipótesis de la higiene han establecido la existencia de un defecto en la evolución de los mecanismos reguladores del sistema inmunológico, como consecuencia de la falta de exposición coevolutiva a microorganismos o parásitos (Yazdanbakhsh y Matricardi, 2004; Rook, 2007). Basándonos en estos estudios, resalta la necesidad del diseño de estudios en los que se analice la coinfección por distintos agentes patógenos, no solamente, como se ha indicado previamente, para observar el efecto de la coinfección por *A. simplex* y *T. gondii* sobre la urticaria crónica, sino añadiendo también la coinfección por *H. pylori*, ya que numerosos estudios han demostrado que la erradicación de esta bacteria disminuye o incluso elimina la urticaria crónica (Bruscky *et al.*, 2013; Akelma *et al.*, 2015).

La utilización de *A. simplex* estaría justificada por su papel como un fuerte inductor de la respuesta Th<sub>2</sub>, y *T. gondii* y *H. pylori*, como agentes infecciosos capaces de desencadenar una fuerte respuesta Th<sub>1</sub> durante la fase aguda de su infección y una respuesta inmunológica reguladora durante la fase crónica, momento en el que sería adecuado el análisis de su posible papel protector sobre la urticaria crónica y las alteraciones alérgicas (Arnold *et al.*, 2012).

*H. pylori* es una bacteria tipo Gram negativo, de morfología espiral, que posee cuatro o seis flagelos. Su prevalencia a nivel mundial es de un porcentaje superior al 50%, aunque esta proporción puede aumentar, siendo más elevada en aquellas poblaciones con un estatus socio-económico más bajo (Ek *et al.*, 2012).

Tras un largo periodo coevolutivo, que comienza hace unos 60.000 años, cuando los primeros hombres migraron desde el este de África (Linz *et al.*, 2007), este espirilo ha ido adaptándose a su hospedador, consiguiendo establecer una infección crónica que en la mayoría de los casos cursa de forma asintomática, aunque en una minoría progresa, dando lugar a alteraciones graves, siendo habitualmente asociada con la aparición de úlceras gástricas o duodenales, cáncer de estómago o linfoma gástrico (Ek *et al.*, 2012; Bruscky *et al.*, 2013; Hussain *et al.*, 2016).

Se ha observado que esta bacteria es adquirida por el hombre, generalmente, durante la infancia, momento en el que su sistema inmunológico no se encuentra completamente desarrollado y, a falta de un tratamiento efectivo, *H. pylori* es capaz de establecerse de forma crónica, regulando tanto la respuesta inmunológica innata, como la adaptativa (Hussain *et al.*, 2016). Diversos estudios han observado que, gracias a esta característica inmunorreguladora, la infección por esta bacteria tiene un efecto protector frente a alteraciones alérgicas, autoinmunes e inflamatorias (Chen y Blaser, 2008; Kalali *et al.*, 2014).

A raíz de estos descubrimientos, recientes estudios epidemiológicos han evaluado el posible papel protector de *H. pylori* frente a distintas patologías, como la atopia (Cullinan *et al.*, 2003), las alteraciones alérgicas (Taube y Müller, 2012; Daugule *et al.*, 2015; Sitaraman, 2015; Lim *et al.*, 2016) y las enfermedades autoinmunes (Kira, 2015; Pedrini *et al.*, 2015), así como, la urticaria crónica (Bruscky *et al.*, 2013; Akelma *et al.*, 2015; Rasooly *et al.*, 2015; Dionigi *et al.*, 2016). Se ha hipotetizado que, en determinadas circunstancias, la estimulación de las células dendríticas por los antígenos de *H. pylori*, evitan su maduración, lo que provoca una presentación de antígeno carente de señales coestimuladoras a las células mononucleares, desarrollándose un fenotipo T regulador (Robinson *et al.*, 2008; Arnold *et al.*, 2012; Matsushima y Nagai, 2012; Kyburz y Müller,

2016) (Fig. 8). Así, Oertli y Müller (2012) observan en un modelo murino, que la exposición prenatal a *H. pylori* induce células dendríticas tolerogénicas con reducida expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86, IL-12 e IL-1 $\beta$  inhibiendo la polarización Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub> característica de la estimulación por esta bacteria en condiciones no tolerogénicas y responsable de la inflamación. Otros autores observaron que, la liberación de IL-10 por estas células T reguladoras, disminuye los niveles de IgE asociados a la respuesta inmunológica tipo Th<sub>2</sub>, característica de las alteraciones alérgicas (Hussain *et al.*, 2016). Lee *et al.* (2014) y Lionetti *et al.* (2014) observaron esta disminución de IgE en pacientes infectados por *H. pylori*.

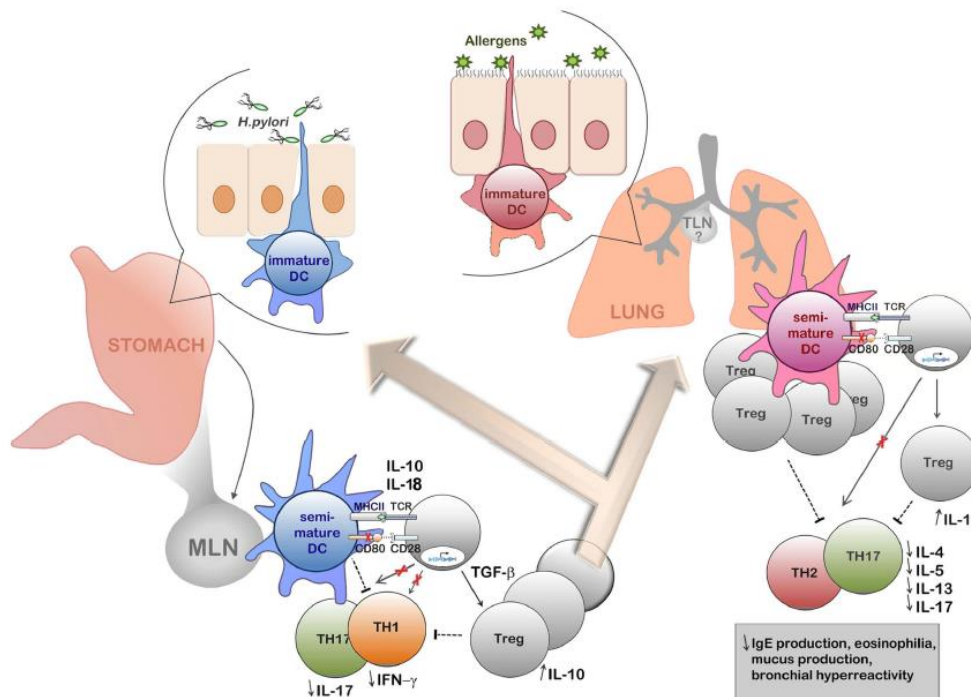


Figura 8.- Representación esquemática del modelo de inducción de tolerancia inmunológica por *Helicobacter pylori* (Arnold *et al.*, 2012).

Es sabido que la urticaria crónica es una alteración mucocutánea, de origen idiopático en la mayoría de los casos, caracterizada por la presencia de lesiones eritematosas, edematosas y pruriginosas en la dermis y/o en la hipodermis, como resultado de la degranulación de mastocitos y basófilos, con la consecuente liberación de mediadores de la inflamación, como la histamina (Bruscky *et al.*, 2013).

La urticaria crónica ha sido asociada con la infección por *H. pylori*, demostrándose en algunos estudios que los pacientes con urticaria crónica a los que se les administraban un tratamiento farmacológico para la erradicación de *H. pylori*, mejoraban e incluso

llegaba a desaparecer la urticaria crónica (Bruscky *et al.*, 2013; Akelma *et al.*, 2015; Dionigi *et al.*, 2016). Mientras que algunos especialistas defienden la detección de *H. pylori* en los pacientes con urticaria crónica como un método fundamental para el diagnóstico y tratamiento (Khan, 2014), otros autores, como Campanati *et al.* (2013), aunque obtienen el mismo resultado de mejoría de la urticaria crónica al erradicar *H. pylori*, sostienen que no es concluyente ya que se podrían eliminar simultáneamente con el tratamiento farmacológico, otros microorganismos intestinales.

## *II-OBJETIVOS*

## II-OBJETIVOS

1.- Evaluar la respuesta de la IgE frente a los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 en pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+) y en pacientes con urticaria crónica sin sensibilización previa a *A. simplex* (UC-), comparando con un grupo control (individuos sanos sin sensibilización frente a *A. simplex*, ni urticaria).

Ani s 1 y Ani s 7 son alérgenos principales de *A. simplex*, de los cuales, al menos Ani s 7, es liberado únicamente por la larva viva, lo que permitirá evaluar qué porcentaje de los pacientes, especialmente en el grupo UC+, ha sido parasitado previamente por este nematodo ya que, mientras que la historia clínica constituye el método diagnóstico más evidente e importante en los pacientes con AGA, la detección de IgE específica en suero, o la positividad del *Skin Prick Test* en los UC+, no pueden ser asociadas con un claro episodio de parasitismo, puesto que podrían deberse a la presencia de una reacción cruzada con otras especies de invertebrados.

2.- Investigar acerca de la IgG<sub>4</sub> específica frente a dos de los alérgenos principales de *Anisakis*, Ani s 1 y Ani s 7, en pacientes diagnosticados de AGA y de UC+, teniendo en cuenta los posibles factores conocidos que afectan a la producción de IgG<sub>4</sub>, como son la edad, el intervalo de tiempo desde el último episodio parasitario y la ingesta de pescado.

Nuestra hipótesis consiste en proponer que los distintos patrones de reconocimiento de la IgG<sub>4</sub> específica, podrían ayudar en el diagnóstico de las alteraciones alérgicas asociadas con *Anisakis*.

3.- Estudiar la producción de citoquinas en pacientes diagnosticados de AGA, de UC+ y de UC- para analizar la asociación de distintos fenotipos de urticaria con la variación de los niveles de citoquinas séricas y evaluar la relación entre la sensibilización a *A. simplex* con infecciones parasitarias previas.

4.- Analizar las diferencias en los hábitos de consumo de pescado y en la producción de citoquinas en pacientes con UC+ y UC-, determinando las diferentes características dietéticas, inmunológicas y clínicas que existen en estos pacientes y observando cómo una dieta temporal, sin pescado, podría modular de forma diferente la respuesta inmunológica y clínica en dichos pacientes.

Debido a que la sensibilización frente a *A. simplex* está influenciada *per se* por los hábitos dietéticos, este objetivo puede ayudar a aclarar el papel de *A. simplex* como un alérgeno oculto capaz de producir reacciones agudas mediadas por IgE siendo un antígeno de importancia asociado a los alimentos.

También se podrá determinar el efecto producido por el pescado, que también constituye una fuente de ácidos grasos poli-insaturados  $\omega$ 3, capaces de modular la respuesta inflamatoria.

**5.-** Estudiar la asociación entre la infección por *Toxoplasma gondii* y *Helicobacter pylori* con la seropositividad frente a *A. simplex* en pacientes con urticaria crónica.

Nuestra hipótesis es que, debido a que, en España, un elevado porcentaje de los casos de urticaria crónica están asociados a la sensibilización frente a *A. simplex* y que, mientras que dicha sensibilización se encuentra asociada a una respuesta inmunitaria de tipo Th<sub>2</sub>, frente a *T. gondii* se encuentra asociada a una respuesta de tipo Th<sub>1</sub>, se podría hipotetizar que ambas infecciones podrían estar relacionadas de manera negativa.

La inclusión de *H. pylori* se fundamenta en la asociación de esta bacteria con la urticaria crónica y el papel beneficioso asignado a numerosos agentes infecciosos, en relación con la “hipótesis de la higiene” con una vía de transmisión oral-fecal, sobre las reacciones alérgicas.

### *III-MATERIAL Y MÉTODOS*

### **III-MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES Anisakis s 1 Y Anisakis s 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex***

##### **1.1.- Población de estudio**

Para este estudio, se utilizó una población de 109 pacientes, que fueron divididos en cuatro grupos, en función de su patología: 28 pacientes con anisakiosis gastroalérgica (AGA), 40 con urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+), 26 con urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis simplex* (UC-) y 15 controles sanos.

Se clasificaron como pacientes AGA, aquellos que presentaban urticaria y/o angioedema agudo o anafilaxia, de menos de 48h de duración, con antecedente de ingesta de pescado crudo, o poco cocinado, en las 24 horas previas al comienzo de la sintomatología, asociada a una prueba *Skin Prick Test* (SPT) positiva y al hallazgo en suero de IgE específica frente a *A. simplex*  $\geq 0,7$  kU/l. Se debían descartar otras causas estimulantes mediante la historia y el seguimiento alergológico y previamente se había demostrado que estos criterios son suficientes para el diagnóstico de la AGA (Daschner *et al.*, 2002; Daschner y Pascual, 2005).

Los pacientes con urticaria crónica, fueron definidos como aquellos que presentaban habones cambiantes pruriginosos, recurrentes al menos dos veces por semana, durante un período de tiempo igual o superior a seis semanas, excluyendo de este estudio a aquellos pacientes en los que la estimulación física era el motivo principal de la aparición de la urticaria. No se consideraron como criterios de exclusión otros factores conocidos, asociados a la urticaria crónica, como la serología positiva a hepatitis o anticuerpos antitiroideos. Dentro de este grupo, los pacientes se dividieron en función de su positividad al SPT y a los niveles de IgE específica frente a *A. simplex*, considerando aquellos pacientes positivos a ambas pruebas como UC+, y aquellos negativos, como UC- (*CAP-Phadia*  $< 0,35$  kU/l).

El grupo control estaba formado por sujetos sin historial de urticaria, ni de sensibilización conocida frente a *A. simplex*.

Se informó, verbalmente y por escrito, a todos los participantes, que consintieron a través de la firma del consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Princesa, Madrid. El diagnóstico y manejo de los

pacientes, así como la obtención de las muestras biológicas fue llevado a cabo por el Dr. Álvaro Daschner, en el Servicio de Alergia del mencionado hospital.

Todos los procedimientos que comprenden este trabajo se han realizado con los estándares éticos de los comités relevantes nacionales e institucionales de la experimentación humana y según la Declaración de Helsinki de 1975, tal y como fue revisada en el 2008.

### **1.2.- Prueba cutánea *Skin Prick Test* (SPT)**

Se realizó en todos los pacientes la prueba de SPT frente al antígeno de *A. simplex* (Lab. ALK-Abelló, Madrid, España) a través de una técnica estándar, en la que se consideraron como positivos aquellos resultados en los que la media del diámetro del habón, medida a los 15 minutos de la aplicación del tratamiento, era igual o superior a 3 mm.

Se utilizaron controles positivo y negativo, que fueron, respectivamente, histamina al 1% y solución salina al 0,9% (NaCl).

### **1.3.- Detección de IgE específica frente a *Anisakis simplex* e IgE total**

Se determinaron los niveles en suero de IgE específica frente a *A. simplex* e IgE total, mediante el método *CAP-Phadia ImmunoCAP®*.

La determinación de los niveles de anticuerpos totales y de anticuerpos específicos anti-*Anisakis* mediante *CAP-FEIA* (Phadia AB, Uppsala, Suecia), se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El sistema *ImmunoCAP®* es una técnica de rutina, realizada en los laboratorios de análisis clínicos hospitalarios que consiste en la medición automatizada de la concentración de IgE total, IgE, IgA, IgG e IgG<sub>4</sub> específicas u otras proteínas séricas del paciente mediante la lectura espectrofluorimétrica de un fluoroenzimoinmunoensayo sándwich realizado sobre unas cápsulas de un polímero derivado de celulosa.

Para la detección de los niveles de IgE total, se incubaron los sueros de los pacientes en los *ImmunoCAPs* para que las IgE presentes fueran capturadas por los anticuerpos anti-IgE. Tras lavar, se añadieron los anticuerpos anti-IgE marcados con  $\beta$ -galactosidasa y se incubaron y lavaron para eliminar las anti-IgE no unidas. Se añadió el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido y se frenó la reacción con carbonato antes de medir la fluorescencia.

Para la detección de los anticuerpos específicos los sueros se incubaron con los *ImmunoCAPs* en los que están unidos los alérgenos de *A. simplex*, revelando la reacción mediante un anticuerpo monoclonal anti-IgE marcado con galactosidasa, el cual genera fluorescencia al actuar sobre el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-D-β-galactósido generando 4-metilumbeliferona. Los sueros se emplearon sin diluir, y el método cuantificó los niveles de anticuerpos IgE específicos en el rango de 0,35 a 100 kU/l. Estos valores se convirtieron en clases de *CAP*: clase 0 (negativo), clase 1 (0,35 - 0,7 kU/l), clase 2 (0,7 - 3,5 kU/l), clase 3 (3,5 - 17,5 kU/l), clase 4 (17,5 - 50 kU/l), clase 5 (50 - 100 kU/l) y clase 6 (> 100 kU/l). De acuerdo con la casa comercial, se consideran positivos los valores de IgE > 0,35 kU/l.

Con el fin de reducir la aparición de falsos positivos, dentro del grupo sensibilizado frente a *Anisakis* (grupos AGA y UC+) sólo se incluyeron aquellos pacientes que mostraron unos niveles de IgE específica > 1,5 kU/l.

### 1.4.- Detección de IgE específica frente a Ani s 1 y Ani s 7

Se utilizaron los alérgenos recombinantes, rAni s 1 y t-Ani s 7, suministrados por el Profesor Dr. D. Florencio M. Ubeira de la Universidad de Santiago de Compostela, siguiendo el método descrito previamente (Anadón *et al.*, 2010).

Se detectaron los niveles en suero de anticuerpos IgE específicos frente a *Anisakis*, a través del método de *ELISA*, utilizando los antígenos rAni s 1 y t-Ani s 7 como dianas. Para ello, se añadieron 100 µl de una solución con una concentración de rAni s 1 de 5 µg/ml (diluido en *PBS*) en las columnas 1, 4, 7 y 10 de la placa de *ELISA* de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), y, 100 µl de una solución con una concentración de t-Ani s 7 de 0,6 µg/ml (diluido en *Tris buffer* 0,1 M, pH=10,5), en las columnas 2, 5, 8 y 11. El resto de las columnas se utilizaron como controles, por lo que únicamente se añadió *PBS*. Tras la incubación de las placas a 4°C, durante una noche y el bloqueo de los sitios no reactivos de los pocillos, se añadieron 100 µl de suero sin diluir en cada pocillo, y se determinó la presencia de IgE específica, como ha sido descrito previamente (Lorenzo *et al.*, 2000).

En resumen, las placas se incubaron durante 90 min a 37°C. Para la determinación de la IgE, se lavaron las placas y se añadieron 100 µl de *TBS-Tween* al 3%, en leche descremada que contenía una dilución 1/2500 del correspondiente anticuerpo monoclonal de ratón específico para IgE humana (Ingenasa) marcado con isotiocianato de fluoresceína (*FITC*; Sigma–Aldrich–Química). Tras incubar las placas durante una hora a 37°C y lavarlas posteriormente, las inmunoglobulinas ligadas a *FITC* fueron detectadas con anticuerpos

de conejo anti-FITC conjugados con peroxidasa (Dakopatts, Dako Diagnósticos; dilución 1/1000 en TBS-Tween al 3% de leche descremada; una hora de incubación a 37 °C).

Como sustrato enzimático se utilizó O-fenilenodiamina. Los resultados fueron medidos a 492 nm y expresados en densidades ópticas (D.O.), que se calcularon restando el valor producido por la misma muestra de suero en presencia y ausencia de antígeno.

Siguiendo lo establecido previamente, se consideraron como valores positivos de densidades ópticas de rAni s 1 y t-Ani s 7, 0,09 y 0,05 respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2008; Anadón *et al.*, 2010).

### **1.5.- Estadística**

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc; Chicago, Illinois, USA). Se calculó la prevalencia para el sexo, la positividad a Ani s 1 y Ani s 7 y se compararon mediante la prueba de *Chi-cuadrado*. Se calcularon las medias de la edad y de los resultados de densidades ópticas obtenidos para Ani s 1 y Ani s 7. También evaluamos el cociente Ani s 1/Ani s 7 para buscar un posible reconocimiento preferente de alérgenos en los diferentes grupos de urticaria. Estos datos se compararon por ANOVA (distribución normal de datos). Se calcularon la mediana y los rangos intercuartiles para la IgE específica de *A. simplex* y total, medidas por *CAP-System*, y se compararon mediante el test de *Mann-Whitney*. El coeficiente de correlación de *Spearman* se usó para los estudios de correlación.

## **2.- IgG<sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON *Anisakis***

### **2.1.- Población de estudio**

Se reclutaron de forma prospectiva 20 pacientes con AGA y 25 pacientes con UC+ que cumplían los criterios de inclusión mencionados en el apartado 1.1. de esta sección de Material y Métodos.

### **2.2.- Protocolo de estudio**

En todos los pacientes se estudiaron los niveles de IgG<sub>4</sub> y de IgE específicas (extracto crudo de *Anisakis*), así como los niveles de IgG<sub>4</sub> específica frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 (Ani s 1-IgG<sub>4</sub> y Ani s 7-IgG<sub>4</sub>, respectivamente). Aunque la detección de IgE específica frente a Ani s 1 y Ani s 7 no se consideraba el objetivo de este estudio, las mediciones frente a estos alérgenos también estuvieron disponibles en 11 pacientes con AGA y 18 UC+ y pudieron usarse para realizar comparaciones.

Se preguntó a los pacientes acerca del número de porciones semanales de pescado y acerca de las porciones mensuales de boquerones en vinagre que ingerían, considerándolo como un factor de riesgo para el parasitismo por *Anisakis*. El intervalo de tiempo transcurrido desde la aparición de la reacción alérgica aguda en el grupo AGA, o desde el establecimiento de la urticaria en el grupo UC+, hasta la toma de la muestra de suero, se definió como Intervalo de Tiempo (IT).

### **2.3.- Detección de IgE e IgG<sub>4</sub> específicas frente a antígeno larvario crudo de *Anisakis***

Se detectaron la IgE e IgG<sub>4</sub> específicas anti-*Anisakis* mediante CAP-FEIA, frente a extracto crudo larvario (Phadia, Uppsala, Suiza). El punto de corte para la IgG<sub>4</sub> específica fue de 0,15 kU/L.

### **2.4.- Detección de IgE e IgG<sub>4</sub> específicas frente a Ani s 1 y Ani s 7**

La seropositividad a IgE frente a los alérgenos recombinantes t-Ani s 7 y rAni s 1, se determinó por *ELISA* como había sido explicado anteriormente en el apartado 1.4. de esta sección de Material y Métodos (Rodríguez *et al.*, 2008; Anadón *et al.*, 2010). Los anticuerpos específicos IgG<sub>4</sub> se detectaron por el método de *ELISA* indirecto, utilizando

rAni s 1 y t-Ani s 7 como dianas. Los pocillos de las columnas 1, 4, 7 y 10 de las microplacas de 96 pocillos (Greiner Boi-One, Frickenhausen, Alemania), se llenaron con 100 µl de una solución de rAni s 1 en tampón fosfato salino (*PBS*) en una concentración de 5 µg/ml, y los pocillos de las columnas 2, 5, 8 y 11, con 100 µl de una solución de t-Ani s 7 en tampón *Tris* 0,1M, pH 10,5 a una concentración de 0,6 µg/ml. Los pocillos de las columnas restantes (controles), se rellenaron únicamente con *PBS*. Tras incubar las placas a 4°C durante una noche y bloquear los sitios no reactivos, se añadieron diluciones 1/100 de los sueros de los pacientes en *PBS-Tween* con un 0,1% de *BSA*, por duplicado, y se incubaron. Se utilizó una inmunoglobulina anti-humana IgG<sub>4</sub>-HRP de ratón (Clon HP6025) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Tras incubar y lavar las placas, se añadió el sustrato (o-fenilendiamina; Sigma) diluido al 0,04% en tampón fosfato citrato (pH 5,0) con un 0,04% de peróxido de hidrógeno. La reacción se frenó con ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm. Las densidades ópticas se calcularon restando el valor de D.O. producido por el mismo suero en ausencia de antígeno. Las densidades ópticas obtenidas superiores a la suma de la media de los controles, más cuatro veces su respectiva desviación estándar, se consideraron como positivos. Los valores de corte calculados para Ani s 1 y Ani s 7 fueron 0,160 y 0,080, respectivamente.

### 2.5.- Estadística

El análisis estadístico se realizó a través de la versión 15.0 del SPSS para Windows.

Para las comparaciones entre los pacientes de AGA y UC+, se calcularon la media y la desviación estándar para las variables continuas como la edad y el consumo de pescado.

Las medianas y los rangos intercuartiles se calcularon para la IgE y la IgG<sub>4</sub> específicas anti-*Anisakis*, así como para los valores de IgE e IgG<sub>4</sub> específicos de los antígenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 y se compararon mediante el test de la *U* de *Mann-Whitney*. Se calcularon los cocientes de los isotipos IgG<sub>4</sub>/IgE, así como de Ani s 1-IgG<sub>4</sub>/Ani s 1-IgE y de Ani s 7-IgG<sub>4</sub>/Ani s 7-IgE y también se compararon mediante el test de la *U* de *Mann-Whitney*.

El número de sueros positivos IgG<sub>4</sub> e IgE (alérgenos recombinantes y antígeno total) fueron comparados mediante la prueba de *Chi-cuadrado*.

Independientemente del diagnóstico de AGA y UC+, se realizó un análisis de correlación no paramétrico (test de *Spearman*) entre Ani s 1-IgG<sub>4</sub>, Ani s 7-IgG<sub>4</sub> y las otras inmunoglobulinas estudiadas, el IT y la ingesta de pescado.

Además, se realizaron tres modelos de regresión lineal para la IgG<sub>4</sub> específica frente a ambos alérgenos recombinantes como variable dependiente. Analizamos la IgE específica, el IT, la edad, la ingesta de pescado y la pertenencia al grupo UC+ o al AGA como posibles variables explicatorias, excluyendo escalonadamente aquellas no significativas. También realizamos un modelo de regresión logística con AGA vs UC+, como variable dependiente, incluyendo IgE e IgG<sub>4</sub> específicas frente al antígeno larvario de *Anisakis* y los respectivos alérgenos recombinantes, Ani s 1 y Ani s 7.

### **3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA A SENSIBILIZACIÓN A *Anisakis***

#### **3.1.- Población de estudio**

El reclutamiento de pacientes fue realizado según se ha descrito en el apartado 1.1. de esta sección de Material y Métodos.

Estudiamos 23 pacientes diagnosticados de AGA y 22 de UC+, que fueron comparados con 28 pacientes diagnosticados de UC-.

#### **3.2.- Protocolo del estudio**

Durante los cinco días previos a la extracción de la muestra sanguínea, los pacientes seleccionados suspendieron la toma de antihistamínicos. El suero extraído se almacenó a una temperatura de -70°C hasta su procesamiento, mientras que la sangre completa fue procesada inmediatamente, mediante ensayos de estimulación.

La producción de citoquinas se determinó tanto en el suero como en los sobrenadantes de los cultivos de las células mononucleares de sangre periférica tras la estimulación con antígeno de *A. simplex* o con Concanavalina A.

#### **3.3.- Obtención de extracto crudo de *Anisakis simplex*.**

Las larvas de *A. simplex* fueron fragmentadas y sonicadas. Posteriormente, se extrajeron las proteínas en tampón fosfato. Tras la delipidación con n-hexano y la centrifugación a 10.000 rpm a 4°C durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante como extracto crudo y se cuantificaron las proteínas mediante el ensayo proteínico de *Bradford* (Perteguer *et al.*, 1996).

#### **3.4.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y ensayo de estimulación.**

Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas mediante centrifugación con gradiente de densidad de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se determinó su viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripán. Las células se lavaron y resuspendieron en una concentración de  $1.25 \times 10^6$  células/ml RPMI 1640

suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado mediante calor, 10 mM de tampón HEPES, 2 mM de L-glutamina y 0,06 g/l de gentamicina. Las células fueron cultivadas mediante estimulación con Concanavalina A procedente de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) (Con A; Sigma) (50 µg/ml), o simplemente en medio, sin estimular. Las células también fueron coestimuladas mediante la adición simultánea de Con A y antígeno de *A. simplex*. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes fueron almacenados a una temperatura de -70°C hasta su procesamiento.

### **3.5.- Cuantificación de citoquinas.**

Tanto los sueros de los pacientes como los sobrenadantes obtenidos tras los ensayos de estimulación de las células mononucleares de sangre periférica, fueron utilizados para la medición de la producción de citoquinas: se cuantificaron los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17A, utilizando un ensayo múltiple de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>/Th<sub>17</sub> Cytokine Kit*; BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU). Los niveles de TGF- $\beta$  fueron determinados mediante un ensayo independiente (*BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human TGF- $\beta$ <sub>1</sub> Single Plex Set*; BD Biosciences), según las indicaciones del fabricante.

Estos métodos de cuantificación de citoquinas mediante microesferas para citometría de flujo (CBA), se basan en la presencia de un anticuerpo, específico para cada citoquina, conjugado a unas microesferas. Cada grupo de microesferas marcado con un anticuerpo específico, presenta diferentes intensidades de fluorescencia (isotiocianato de fluoresceína-FITC). Una vez incubadas con el suero o con los sobrenadantes, para la cuantificación de las citoquinas, se añaden a la mezcla un conjunto de anticuerpos específicos para cada citoquina que, en este caso, van conjugados con ficoeritrina (PE) uniéndose del mismo modo que en un *ELISA* sándwich. Además, el kit ofrece unos estándares con citoquinas recombinantes valoradas, para la realización de rectas patrón y así poder cuantificar los niveles de cada citoquina presentes en la muestra problema.

Todas las muestras fueron analizadas mediante un Citómetro de Flujo *BD FACSCalibur<sup>TM</sup>* y los resultados se expresaron en pg/ml utilizando el software *FCAP Array<sup>TM</sup>*.

### **3.6.- Estadística**

El análisis estadístico de nuestros datos se realizó a través de los programas SPSS 15.0 y GraphPad Prism 6.0 para Windows. Se determinaron las medianas y los rangos intercuartiles de las diferentes citoquinas y se compararon mediante el test de *Mann-Whitney*. Se consideraron significativos aquellos resultados con una  $P \leq 0,05$ .

#### **4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO *Anisakis simplex***

##### **4.1.- Población de estudio**

Se seleccionaron, aquellos pacientes que cumplían con los criterios de selección mencionados en el apartado 1.1. de esta sección de Material y Métodos.

Se incluyeron 22 pacientes UC- y 16 UC+. Debido a que la detección de IgE específica frente a *A. simplex* podría ser debida, teóricamente, por una reactividad cruzada con otros parásitos o artrópodos, se consideró como criterio de inclusión la presencia de IgE específica frente a Ani s 7, un marcador altamente específico del parasitismo previo por este nematodo (Anadón *et al.*, 2009), que es además el único alérgeno reconocido por el 100% de los pacientes (Resultados incluidos en esta memoria).

##### **4.2.- Protocolo del estudio**

Se determinó la severidad de la urticaria crónica mediante el *Urticaria Activity Score (UAS)*.

Mediante la realización de un cuestionario estandarizado, se obtuvo información detallada acerca de los hábitos de ingesta de pescado (Tabla 5).

**Tabla 5.- Cuestionario estandarizado: Hábitos de ingesta de pescado**

1. ¿Qué pescados son los que más consume habitualmente?

Esta pregunta es importante ya que es capaz de diferenciar entre pescado magro y pescado graso†

2. ¿Con qué frecuencia consume pescado magro a la semana?

3. ¿Con qué frecuencia consume pescado graso a la semana?

Con estos datos calculamos la ingesta total de pescado: 2 + 3

4. ¿Con qué frecuencia consume pescado enlatado a la semana?‡

5. ¿Con qué frecuencia consume boquerones en vinagre al mes o al año?

†Los pescados más consumidos por los pacientes fueron:

Pescado graso: sardina, anchoa, pez espada, atún, salmón, trucha, salmonete, brema, lubina, bacalao. Pescado magro: merluza, bacaladilla, lenguado, halibut

‡El pescado en lata más consumido por los pacientes fue el graso: atún, sardina, caballa

Debido a que algunos estudios han asociado el estado atópico con la urticaria crónica, también determinamos la atopia mediante la prueba *SPT* frente a los aeroalérgenos más frecuentes y la autorreactividad mediante el *Autologous Serum Skin Test (ASST)*.

Se realizaron análisis de laboratorio rutinarios en todos los pacientes, incluyendo determinaciones de la función tiroidea, anticuerpos anti-tiroideos y serología para las infecciones por virus de las Hepatitis B y C.

Tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica, con antígeno de *A. simplex* o Con A, se midió la producción de citoquinas en los sobrenadantes.

Al comienzo del estudio, los pacientes fueron divididos en dos grupos: uno en el que se eliminó el consumo de los productos derivados del pescado durante tres meses, y otro en el que se mantuvo la ingesta habitual de pescado semanal. Aquellos pacientes UC+

que fueron incluidos en el grupo sin dieta restrictiva, fueron advertidos de que debían congelar el pescado previamente al consumo.

Tras un periodo de tres meses, se volvieron a determinar el *UAS* y la producción de citoquinas en todos los pacientes.

Se retiraron los antihistamínicos cinco días antes de la evaluación clínica e inmunológica y se solicitó a los pacientes que tomaran la mínima cantidad de antihistamínicos posible para el control de las manifestaciones alérgicas.

#### **4.3.- Urticaria Activity Score (UAS)**

Se utilizó el *UAS*, tal y como se había descrito anteriormente (Młynek *et al.*, 2008), para determinar la severidad de la urticaria. Para su realización, se pidió a los pacientes que retiraran el tratamiento antihistamínico durante los cinco días previos a la prueba y se determinó la puntuación media de los últimos cuatro días en función del número de habones (entre 0 y 3: 0; 0 - 9; 10 - 50; > 50) y la intensidad del picor (entre 0 y 3: no; media; moderada; severa).

#### **4.4.- Prueba cutánea Skin Prick Test (SPT)**

Se realizaron pruebas cutáneas frente al antígeno larvario de *A. simplex* y frente a los aeroalérgenos más frecuentes en nuestra área: epitelio de animales (perro, gato), ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), polen de *Cupressus arizonica*, *Olea europea*, *Lolium perenne*, mezcla de malezas y moho (*Alternaria alternata*) (ALK-Abello, Madrid, España). Además, en todos los pacientes se determinaron otras alergias alimenticias mediadas por IgE mediante una prueba *SPT* frente a alérgenos alimentarios, incluyendo el huevo, la leche, el pescado, los crustáceos, y las verduras (Laboratorios Leti, Barcelona, España).

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante una técnica estándar, como se ha indicado previamente en el apartado 1.2. de esta sección de Material y Métodos.

#### **4.5.- Autologous Serum Skin Test (ASST)**

El ASST se realizó en 23 de los pacientes estudiados, tal y como había sido descrito anteriormente (Konstantinou *et al.*, 2009). Se recolectó la sangre de los pacientes en tubos estériles de cristal, y se dejó coagular durante un periodo de 30 minutos. Tras centrifugar a 450 *g*, durante 10 minutos, se inyectaron 0,05 ml de suero no diluido en la dermis de la parte inferior del antebrazo del paciente, en paralelo a los dos controles: 0,05 ml de solución salina como control negativo, y una SPT con histamina al 1% como control positivo. Esta prueba se consideró positiva en aquellos casos en los transcurrido 30 minutos desde la punción, aparecieron habones con un diámetro medio  $\geq 1,5$  mm, apareciendo el control positivo a los 15 minutos.

#### **4.6.- Obtención de extracto crudo de *Anisakis simplex***

Tras fragmentar y sonicar las larvas de *A. simplex*, se extrajeron las proteínas tal y como se ha indicado en el apartado 3.3. de esta sección de Material y Métodos.

#### **4.7.- Muestras séricas, células mononucleares de sangre periférica y ensayo de estimulación**

Se recogieron muestras de sangre de los pacientes tras haber retirado el tratamiento antihistamínico en los cinco días previos a la extracción. El suero recogido se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica y se cultivaron como ya se ha descrito en el apartado 3.4. de esta sección de Material y Métodos. Los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

#### **4.8.- Detección de IgE específica**

En todos los pacientes se determinó la presencia de IgE específica (*CAP-System, PHADIA*, Uppsala, Sweden) frente a *Anisakis* (Punto de corte: 0,35 kU/l), así como también la IgE específica frente al antígeno recombinante Ani s 7 con el fin de confirmar la existencia de un parasitismo previo (Anadón *et al.*, 2010). Ambos métodos ya han sido incluidos previamente en esta memoria.

#### **4.9.- IgE frente a t-Ani s 7**

El antígeno recombinante t-Ani s 7 es un polipéptido con una secuencia repetitiva la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal mAbUA3. Cuando se compararon las muestras de sueros humanos positivos a IgE anti-*Anisakis* obtenidos a través de un método de *ELISA* indirecto con t-Ani s 7, con los obtenidos a través de un *ELISA* de captura usando mAbUA3 (que reconoce el alérgeno nAni s 7), se observó que todos los sueros resultaron positivos por ambos métodos (Lorenzo *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2008). Esto prueba que t-Ani s 7 mantiene la misma reactividad frente a la IgE, que el alérgeno nAni s 7 en su forma nativa.

Por este motivo, para la determinación de los niveles de IgE específicos anti-*Anisakis* se utilizó un método de *ELISA* indirecto, previamente descrito, utilizando como diana el alérgeno recombinante t-Ani s 7. Se añadió una concentración de 0,06 µg/pocillo de proteína en los 96 pocillos de las placas (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). Tras incubar las placas a 4°C durante toda la noche, y bloquear los puntos de no reactividad, se añadieron 100 µl de suero no diluido en cada pocillo, y se determinó la IgE específica, como se describió previamente (Lorenzo *et al.*, 2000). Las densidades ópticas (D.O.), a 492 nm, se calcularon restando el valor de la D.O. de esa misma muestra sérica en ausencia de antígeno. El punto de corte calculado para *ELISA* de t-Ani s 7 fue una D.O. de 0,05. (Anadón *et al.*, 2010).

#### **4.10.- Cuantificación de citoquinas**

Los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de estimulación de las células mononucleares aisladas de sangre periférica fueron utilizados para la cuantificación de citoquinas: se determinaron los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A y TGF-β, tal y como ya se ha indicado en el apartado 3.5. de esta sección de Material y Métodos.

#### **4.11.- Efectos de la dieta**

Se consideró mejoría clínica cuando un paciente mostró diferencias  $\geq 1$  entre el *UAS* obtenido al inicio del estudio y el observado a los tres meses de su aleatorización a dieta/no dieta.

#### **4.12.- Estadística**

El análisis estadístico fue realizado utilizando el SPSS 15.0 para Windows.

##### ***Evaluación transversal***

Se calcularon las prevalencias para el sexo, el estado atópico y la positividad del ASST en ambos grupos de estudio y se compararon mediante la prueba de *Chi-cuadrado*. La edad media, el UAS y el TGF- $\beta$  de los sobrenadantes fueron calculados en todos los grupos de estudio mediante ANOVA (distribución normal de datos). También fueron calculadas y se compararon los cocientes obtenidos de la producción de citoquinas anti- (IL-10, TGF- $\beta$ )/proinflamatorias (IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). La duración previa de la urticaria, los niveles de otras citoquinas, así como los datos de los hábitos en el consumo de pescado, la IgE específica de *A. simplex* y la IgE total, mostraron una distribución no normal, por lo que se calcularon la mediana y los rangos intercuartiles y se compararon mediante el método de *Mann-Whitney*. Además, analizamos mediante los mismos métodos, los cocientes de los niveles de citoquinas pro/antiinflamatorias.

El coeficiente de correlación de *Spearman* se utilizó en estudios de correlación entre la producción de citoquinas y la ingesta de pescado, así como con el UAS.

La regresión logística se realizó con el fin de analizar los hábitos de ingesta de pescado y su relación con los diferentes fenotipos de urticaria. Además, los modelos de regresión ayudaron a la búsqueda de una explicación multivariable de la producción de citoquinas en ambos fenotipos de urticaria.

Se aplicaron dos modelos de regresión lineal para analizar, en primer lugar, los hábitos de ingesta de pescado con respecto al resultado del UAS y, en segundo lugar, la producción de citoquinas y el UAS.

##### ***Efectos de la dieta y pronóstico***

Se comparó la mejoría de los resultados en los grupos UC+ y UC- (dieta/no dieta) mediante la prueba de *Chi-cuadrado*. Además, fueron comparadas la evolución de los índices en ASST+ vs ASST- y en pacientes atópicos vs no atópicos.

Se comparó la producción inicial de citoquinas en pacientes con mejoría clínica vs no mejoría. Los cambios individuales en la producción de las citoquinas tras el ensayo clínico fueron evaluados mediante el cociente entre su post-/pre-producción. De nuevo, fueron calculados la mediana y los rangos intercuartiles y se compararon a través del método de *Mann-Whitney*.

Se compararon los hábitos de ingesta de pescado entre los pacientes a dieta que mostraron una mejoría clínica vs no mejoría.

Aquí, se desarrolló un modelo de regresión logística con el fin de analizar qué factores están asociados con la mejoría. Estas variables se incluyeron inicialmente en este modelo, el cual mostró una  $P < 0,1$  en un análisis bivariable. La dieta también tuvo que incluirse como un posible factor explicativo.

## **5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii* Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A *Anisakis simplex* EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA**

### **5.1.- Población de estudio**

Se seleccionaron 42 sueros humanos procedentes de pacientes diagnosticados de urticaria crónica. Dichos pacientes, presentaban ronchas recurrentes, al menos dos veces por semana, durante un periodo mínimo de seis semanas, descartándose aquellos cuyos principales agentes estimulantes de la reacción urticarial fueran estímulos físicos. De estos pacientes, 18 presentaron sensibilización frente a *A. simplex* (UC+), mientras que los otros 24, no presentaron sensibilización frente a *A. simplex* (UC-). Como grupo control (C), se utilizaron 19 sueros humanos procedentes de individuos no atópicos. El estado atópico se determinó mediante *SPT* y diagnóstico clínico de sintomatología respiratoria. Se realizó una comparación entre los pacientes nativos (32) y los inmigrantes (10), procedentes de regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica. El Proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, siguiendo los protocolos indicados en el apartado 1.1. de esta sección de Material y Métodos.

### **5.2.- Prueba cutánea *Skin Prick Test* (*SPT*)**

Se determinó la prueba cutánea *SPT* frente a extracto larvario de *A. simplex* (Lab. ALK-Abelló, Madrid, España) y frente a los aeroalérgenos más frecuentes en nuestra región: epitelio de animales (gato y perro), ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*) y pólenes de *C. arizonica*, *O. europea* y *L. perenne*, mezcla de malezas y del mohos *A. alternata* (Lab. ALK-Abelló, Madrid, España). El *SPT* se realizó siguiendo la técnica estándar, descrita previamente en el apartado 1.2. de esta sección de Material y Métodos.

### **5.3.- Determinación de IgE total e IgE específica frente a *Anisakis simplex* mediante la técnica *CAP-System***

La determinación de los niveles de anticuerpos totales y de anticuerpos específicos anti-*Anisakis* mediante *CAP-FEIA* (Phadia AB, Uppsala, Suecia) se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, según protocolo descrito en el apartado 1.3. de esta sección de Material y Métodos.

#### **5.4.- Determinación de los niveles de IgG específica frente a *Toxoplasma gondii***

Para la determinación de los niveles de IgG específica, se utilizó el Kit comercial Novalisa™ *Toxoplasma gondii* IgG-ELISA System (NovaTec Immundiagnostica GMBH, Dietzenbach, Alemania). Dicho test, se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, así las muestras séricas fueron analizadas a una dilución 1/100. Con el fin de obtener resultados cuantitativos en UI/ml (medias), se realizó una curva de calibración, utilizando los valores de absorbancia de las cuatro muestras estándares suministrados en el kit A, B, C y D, frente a sus concentraciones correspondientes (0, 50, 100 y 200 UI/ml). De acuerdo con las directrices de la OMS, se consideraron como positivos, aquellos sueros cuyos niveles de anticuerpos alcanzaron valores  $\geq 35$  UI/ml.

#### **5.5.- Estadística**

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS ver. 15.0 para Windows. Se calcularon las prevalencias en función del sexo y la presencia/ausencia de: atopia, manifestaciones respiratorias y sensibilización frente a *A. simplex* (UC+ o UC-). Así mismo, se analizó la procedencia del paciente (nativo o inmigrante). Dichas prevalencias se compararon mediante la prueba de *Chi-cuadrado* y el *Odds Ratio* con un intervalo de confianza del 95%. Se calculó la media de edad en todos los grupos del estudio y se comparó mediante el test de ANOVA (distribución normal de los datos). Las medianas de IgE específica y total y los rangos intercuartiles fueron calculados y comparados mediante el análisis de *Mann-Whitney*. Se realizó también un modelo de regresión logística, incluyendo aquellas variables con un nivel de significación de  $P < 0,05$ .

## **6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA**

### **6.1.- Población de estudio**

Para el desarrollo de este estudio, se seleccionaron un total de 90 sujetos, que se dividieron en dos grupos: un grupo de pacientes con urticaria crónica, constituido por 68 pacientes con episodios de urticaria, al menos dos veces por semana, durante un periodo mínimo de seis semanas y el grupo control, formado por 22 controles sin urticaria.

### **6.2.- Determinación de IgE anti-*Anisakis simplex* e IgG anti-*Toxoplasma gondii***

Se analizaron los valores de IgE (CAP-*FEIA*) frente a *A. simplex* y los niveles de IgG anti *Toxoplasma gondii*, mediante la técnica de *ELISA*, siguiendo las instrucciones de los métodos comerciales citados anteriormente en los apartados 1.3. y 5.4. de esta sección de Material y Métodos.

### **6.3.- Determinación de IgG anti-*Helicobacter pylori***

La determinación de los niveles de IgG anti-*Helicobacter pylori* en suero, se realizó mediante la técnica de *ELISA*, siguiendo las instrucciones del kit comercial NovaLisa™ *Helicobacter pylori* IgG-*ELISA* System (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Alemania). Las muestras de suero de los pacientes, se utilizaron a una dilución 1/100 en tampón fosfato y se incubaron en placas comerciales de 96 pocillos tapizadas con antígeno de *H. pylori*, durante 1h a 37°C. Las muestras se determinaron por duplicado para evitar la aparición de errores y se dejó el primer pocillo como blanco, incubándose también la curva de calibración suministrada en el kit comercial. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron tres veces con una solución de lavado y se adicionaron 100 µl de conjugado anti-IgG (*H. pylori*) en todos los pocillos, excepto en el blanco, incubándose a temperatura ambiente, durante 30 minutos, en oscuridad. Las placas volvieron a lavarse como en el paso anterior y se pipetearon 100 µl de sustrato (tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno) en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 15 minutos exactos, lo que confirió una coloración azul a las muestras. La reacción se frenó añadiendo 100 µl de solución de frenado (ácido sulfúrico 0,2M) en todos los pocillos, transformando la coloración azul en amarillo. Se midió la absorbancia de los pocillos a 450/620 nm en un periodo de 30 minutos, tras haber añadido la solución de frenado.

Con el fin de obtener resultados cuantitativos en NTU/ml (medias), se realizó una curva de calibración utilizando los valores de absorbancia de las cuatro muestras estándares suministrados en el kit A, B, C y D, frente a sus concentraciones correspondientes (0, 15, 75 y 150 NTU/ml). De acuerdo con las directrices de la OMS, se consideraron como positivos, aquellos sueros cuyos niveles de anticuerpos alcanzaron valores  $\geq 15$  NTU/ml.

#### **6.4.- Estadística**

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 15.0 para Windows. Únicamente se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 para determinar la prevalencia de *H. pylori* en función del sexo y de la edad, a través del test de *Mann-Whitney*. Se calcularon las prevalencias y los porcentajes de positividad/negatividad de *H. pylori*, *T. gondii* y *A. simplex* en función de la presencia/ausencia de urticaria crónica. Dichas prevalencias se compararon mediante el test *Chi-cuadrado* de *Pearson*. A través de una regresión logística, estudiamos un modelo de coinfección por *A. simplex* y *H. pylori*, completándolo luego con la introducción de la infección por *T. gondii* en un estudio a través de tablas de contingencia. El nivel de significación fue de  $P < 0,05$ .

#### *IV-RESULTADOS*

## IV-RESULTADOS

### 1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES ANI S 1 Y ANI S 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex*

#### 1.1.- Resumen

El diagnóstico de la anisakiosis gastroalérgica (AGA), se realiza de forma sencilla al combinar la historia clínica con una evaluación alergológica de la IgE específica de *Anisakis simplex* determinada a través de las medidas de *Skin Prick Test* (SPT) y las determinaciones serológicas. En la urticaria crónica asociada con la sensibilización a *A. simplex* (UC+), la evaluación clínica de un parasitismo previo es difícil, ya que la positividad de la IgE específica sérica anti-*A. simplex* puede ser debida a una reacción cruzada, o a otros factores desconocidos.

En este estudio, evaluamos la asociación entre la seropositividad de la IgE a los alérgenos recombinantes, Ani s 1 y Ani s 7, y varias alteraciones alérgicas asociadas con *A. simplex*. Se estudiaron 28 pacientes con AGA y 40 pacientes con UC+, comparando sus respuestas de IgE con un grupo control compuesto de pacientes con urticaria crónica no asociada a la sensibilización por *A. simplex* (UC-) de acuerdo con el SPT, así como con un grupo de 15 sujetos sanos sin urticaria ni síntomas asociados con *A. simplex*, en el momento del estudio.

El 82,1% de los pacientes con AGA y el 42,5% de los pacientes con UC+ fueron positivos a Ani s 1 ( $P < 0,001$ ), mientras que el alérgeno Ani s 7 fue reconocido por el 92,9% y el 92,5% de los sueros de los pacientes con AGA y UC+, respectivamente. Se alcanzó un 100% en la positividad combinada de ambos alérgenos en los pacientes con AGA y un 95% en los UC+.

Las determinaciones de IgE frente a los alérgenos, Ani s 1 y Ani s 7, son útiles para diagnosticar las infecciones por *Anisakis* y para diferenciar entre las diferentes alteraciones alérgicas asociadas a *A. simplex*. Las respuestas de la IgE frente a Ani s 1 están fundamentalmente asociadas con la AGA, mientras que esta molécula no puede ser considerada como un alérgeno principal en los pacientes de UC+.

## 1.2.- Descripción de los resultados

La edad media de los pacientes fue menor en el grupo UC-, no encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos de estudio (AGA, UC+ y UC-). La distribución en función del sexo fue homogénea en todos los grupos (Tabla 6).

Tabla 6.- Datos generales de los grupos de estudio.

	AGA (n=28)	UC+ (n=40)	UC- (n=26)	Control (n=15)	P
<b>Edad media</b> (años)	47,1 ± 11,9	47,1 ± 17	35,5 ± 14,3	42,7 ± 9,9	0,008
<b>Mujeres (%)</b>	60,7	72,5	61,6	60,0	n.s.

AGA: anisakiosis gastroalérgica; UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; UC-: urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex*; Control: sujetos sin historial de urticaria ni síntomas asociados a la ingesta de pescado. n.s.: no significativo.

Cuando comparamos la sensibilización frente a *Anisakis* en ambos grupos, observamos que los niveles de IgE específica en suero, obtenidos por CAP-System, fueron previsiblemente más altos en el grupo AGA (mediana 21,9; rangos intercuartiles (IQR) 5,8 - 69,1 kU/l) que en el grupo UC+ (mediana 8,5; IQR 3,7 - 18,7 kU/l;  $P = 0,03$ ). En cambio, no encontramos diferencias significativas entre los niveles en suero de IgE total en el grupo AGA (mediana 215; IQR 75 - 770 kU/l) ni en el grupo UC+ (mediana 145; IQR 91 - 310 kU/l;  $P = 0,16$ ) (Fig. 9).

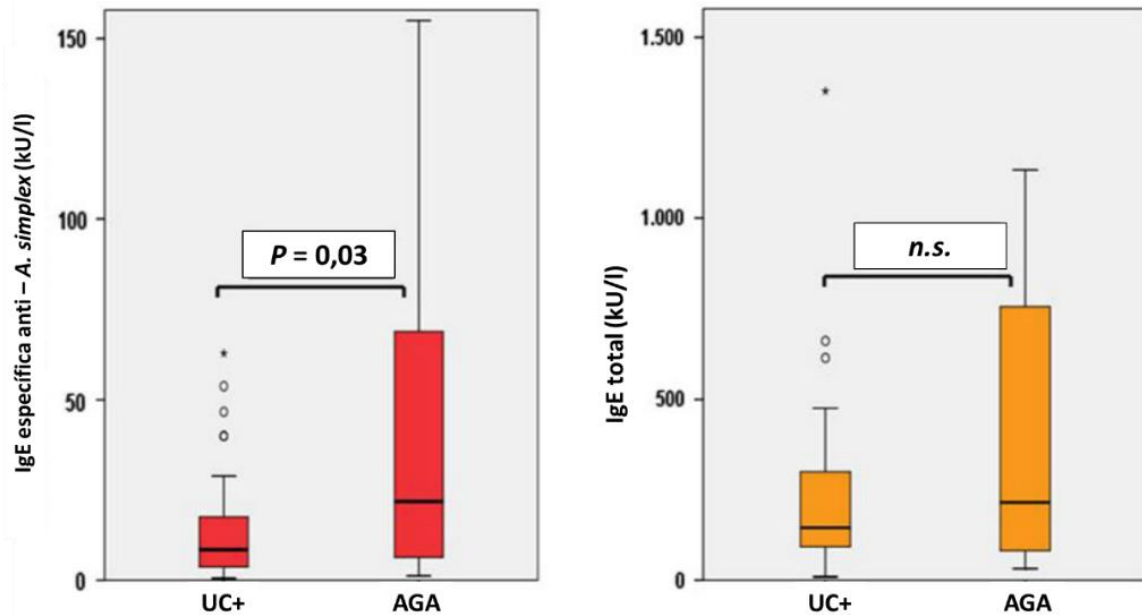


Figura 9.- IgE específica e IgE total frente a *Anisakis simplex* expresadas en kU/l. AGA: anisakiosis gastroalérgica, UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *A. simplex*. n.s.: no significativo.

La Tabla 7 nos muestra los valores de IgE sérica específica frente a los antígenos recombinantes, Ani s 1 y Ani s 7. De nuevo, se observan valores más altos en los pacientes AGA que en los UC+ ( $P < 0,0001$  para Ani s 1 y  $P = 0,003$  para Ani s 7). El cociente Ani s 1/Ani s 7, también fue más elevado en el grupo AGA ( $68,8 \pm 364,8$ ) que en el UC+ ( $3,3 \pm 15,2$ ;  $P = 0,007$ ).

**Tabla 7.- Medias de IgE sérica específica expresada en D.O. frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7, obtenidas por ELISA.**

	AGA	UC+	UC-	Control
Ani s 1 (X±DS)	1,19 ± 0,94	0,44 ± 0,7	0,09 ± 0,43	0,0 ± 0,001
Significación	$P < 0,0001$			
Ani s 7 (X±DS)	1,0 ± 0,86	0,59 ± 0,58	0,03 ± 0,13	0,02 ± 0,05
Significación	$P = 0,003$			

**AGA:** Anisakiosis Gastroalérgica; **UC+:** Urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; **UC-:** Urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis simplex*; **Control:** Sujetos sin historial de urticaria o síntomas asociados a la ingesta de pescado. Los niveles significativos se muestran comparando los pacientes AGA y UC+.

Al observar estos resultados de forma más detallada, vemos que el 82,1% de los pacientes AGA fueron positivos para Ani s 1, mientras que tan sólo un 42,5% de los pacientes UC+ reconocieron este alérgeno ( $P < 0,001$  con ambos grupos asociados a la sensibilización por *A. simplex* (AGA y UC+)) (Fig. 10). Sin embargo, el reconocimiento frente al alérgeno Ani s 7, fue del 92,9% y el 92,5% para los pacientes AGA y UC+, respectivamente (Fig.11). La positividad combinada, obtenida frente a ambos alérgenos fue de un 100% en los pacientes AGA y de un 95% en los pacientes UC+. En las Figuras 10 y 11 se puede observar que sólo el 3,8% de los pacientes UC- (1/26), fue positivo tanto para Ani s 7 como para Ani s 1, mientras que el 13,3% de los sueros del grupo control (2/15) reconocieron el alérgeno Ani s 7, y ninguno de ellos reconoció a Ani s 1.

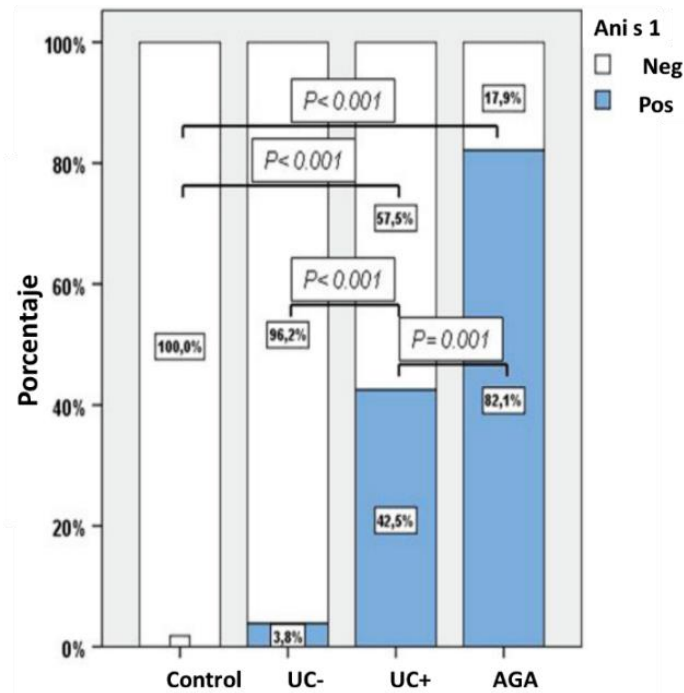


Figura 10.- Porcentaje de sueros con IgE específica positiva y negativa frente al alérgeno recombinante Ani s 1. AGA: anisakiosis gastroalérgica; UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; UC-: urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex*; Control: sujetos sin historial de urticaria o síntomas asociados a la ingesta de pescado

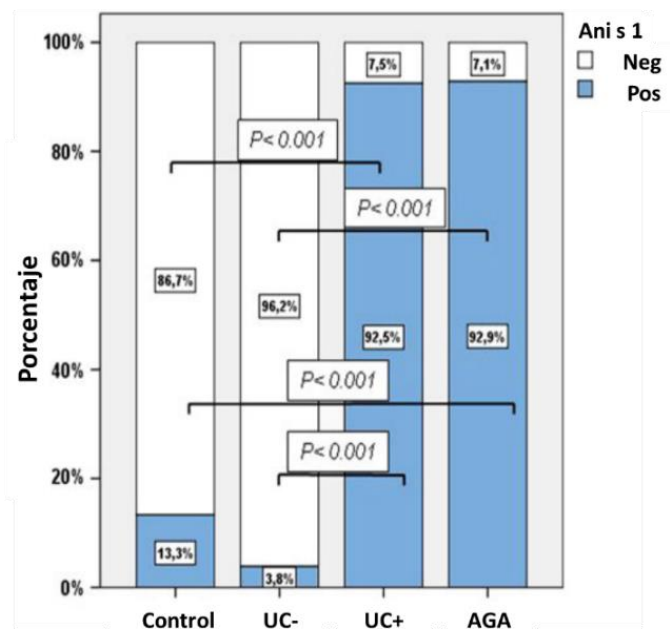


Figura 11.- Porcentaje de sueros con IgE específica positiva y negativa frente al antígeno recombinante Ani s 7. AGA: anisakiosis gastroalérgica; UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; UC-: urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex*; Control: sujetos sin historial de urticaria o síntomas asociados a la ingesta de pescado.

## 2.- IgG<sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGENESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON *Anisakis*

### 2.1.- Resumen

La IgE y la IgG<sub>4</sub> son dos isotipos de inmunoglobulinas, mediadas por el mismo mecanismo Th<sub>2</sub>. La función patogénica y protectora que tienen en las alteraciones alérgicas, respectivamente, se invierte en las infecciones parasitarias.

Se estudió el posible papel de la IgG<sub>4</sub> frente a los principales alérgenos recombinantes en la aparición de las diferentes alteraciones alérgicas asociadas con *A. simplex*. Se comparó el reconocimiento de Ani s 1 y Ani s 7, por la IgE y la IgG<sub>4</sub> específicas en la AGA y en la UC+. La AGA mostró niveles más elevados de IgE e IgG<sub>4</sub> frente al extracto crudo larvario y frente a ambos alérgenos recombinantes que en el caso de la UC+. Mientras que el reconocimiento de Ani s 7 por la IgE no difiere en ambos grupos estudiados y respalda que ambas entidades están asociadas con un parasitismo agudo previo. La tasa de reconocimiento de Ani s 1 por IgE y la del reconocimiento de Ani s 1 y de Ani s 7 por la IgG<sub>4</sub>, fueron mayores en AGA. Los niveles de IgG<sub>4</sub> se asociaron con la IgE, pero también con la edad, con el tiempo transcurrido desde el último episodio de parasitismo y la frecuencia en el consumo de pescado. El análisis de regresión logística mostró que, la presencia de IgG<sub>4</sub> específica frente a Ani s 7 fue un marcador independiente asociado con AGA. En el diagnóstico de los fenotipos de las alteraciones alérgicas asociadas con *Anisakis* (AGA vs UC+), la medida de la IgG<sub>4</sub> específica frente a los alérgenos recombinantes puede ser útil. Además, la evaluación de la IgE e IgG<sub>4</sub> específicas facilita una mayor profundización en el potencial protector frente al patogénico de ambas inmunoglobulinas.

### 2.2.- Descripción de los resultados

La edad media de los pacientes fue de  $51,1 \pm 12,0$  años en AGA y  $51,1 \pm 15,4$ , en UC+ (n.s.). Dentro del grupo UC+, el 88% de los pacientes eran mujeres, mientras que dentro del grupo AGA, tan sólo lo fue el 40% ( $P = 0,001$ ). La mediana del Intervalo de Tiempo (IT) (ver apartado 2.2. de la sección de Material y Métodos) en los pacientes AGA fue de cuatro meses (IQR 2 - 6 meses) y la mediana de la duración de la urticaria crónica en UC+ fue de 12 meses (IQR 6 - 36 meses).

Comparando los niveles de anticuerpos en los pacientes con AGA y UC+, observamos que la IgE específica y la IgG<sub>4</sub> frente al antígeno total de *Anisakis*, así como la IgE y la IgG<sub>4</sub> frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7, fueron significativamente más elevados en AGA (Tabla 8).

**Tabla 8. Mediana y rangos intercuartiles (IQR) de los niveles de inmunoglobulinas estudiados en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y en la urticaria crónica asociada con sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+).**

Grupo	IQR	Ani s 1-IgE	Ani s 7-IgE	Ani s 1-IgG <sub>4</sub>	Ani s 7-IgG <sub>4</sub>	IgE específica	IgG <sub>4</sub> específica
<b>AGA</b>	25	1,12	0,09	0,08	0,16	16,4	985
	50	2,00	1,93	0,78	0,45	68,9	2585
	75	2,28	2,20	2,87	1,39	335,0	5245
<b>UC+</b>	25	0,01	0,06	0,01	0,00	1,6	92
	50	0,02	0,27	0,08	0,03	4,9	395
	75	0,30	0,58	0,45	0,16	11,9	1157
<b>P</b>		<0,001	0,01	0,01	<0,001	<0,001	<0,001

Los valores de significancia se obtienen al comparar AGA y UC+. Las IgE e IgG<sub>4</sub> específicas frente al antígeno total larvario se expresan en kU/l. Los anticuerpos IgE e IgG<sub>4</sub> frente a los antígenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 se expresan en D.O. obtenida por el método de *ELISA*.

Se observó una elevada variabilidad en los cocientes IgG<sub>4</sub>/IgE. Mientras que el cociente IgG<sub>4</sub>/IgE-Ani s 7 fue más elevado con cercanía a la significación en AGA que en UC+ ( $P = 0,06$ ), no observamos diferencias en los cocientes IgG<sub>4</sub>/IgE inducidos por Ani s 1 o el antígeno total larvario de *Anisakis* (Fig.12).

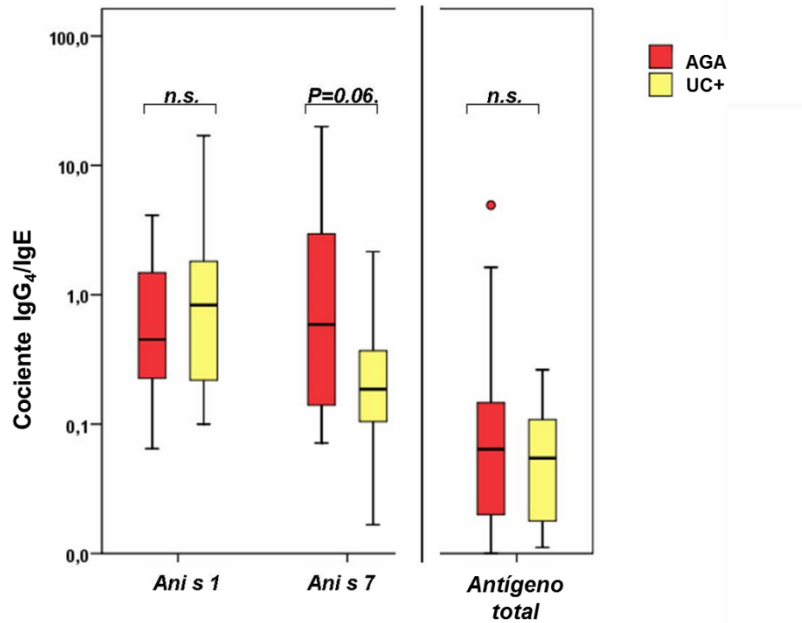


Figura 12.- Cocientes IgG<sub>4</sub>/IgE frente a los antígenos recombinantes Ani s 1, Ani s 7 y frente al antígeno total larvario de *Anisakis*. Este gráfico compara los cocientes de los isotipos de inmunoglobulinas presentes en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada con la sensibilización a *Anisakis* (UC+) frente a los antígenos principales, Ani s 1 y Ani s 7.

Igualmente, los anticuerpos IgG<sub>4</sub> frente a Ani s 1 y Ani s 7 fueron, frecuentemente, más positivos en AGA ( $P = 0,05$  y  $P = 0,001$ , respectivamente; Fig.13).

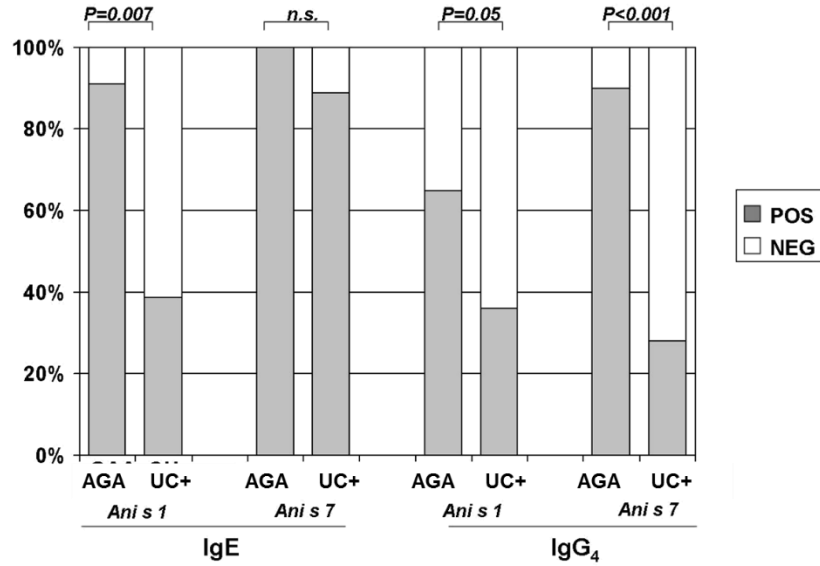


Figura 13.- Frecuencia de la positividad (POS) o negatividad (NEG) a Ani s 1 y Ani s 7 en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y en la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis simplex* (UC+). Los valores de corte para la IgE y la IgG<sub>4</sub> fueron de 0,09/0,05 y 0,16/0,08 para Ani s 1 y Ani s 7, respectivamente.

La Figura 14 muestra los patrones de positividad al analizar, simultáneamente, los anticuerpos IgE e IgG<sub>4</sub> frente a los antígenos recombinantes. Podemos establecer que, en ambas patologías, AGA y UC+, la IgG<sub>4</sub>-Ani s 1 sólo es positiva cuando la IgE frente al mismo alérgeno también es positiva.



Figura 14.- Positividad simultánea para IgE e IgG<sub>4</sub> frente a Ani s 1 y Ani s 7 en la anisakiosis gatroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis* (UC+). En este análisis, sólo se incluyeron pacientes, en los cuales estaban disponibles tanto los valores de IgE, como los de IgG<sub>4</sub>.

Considerando, únicamente, los pacientes AGA, las correlaciones más significativas se observaron entre Ani s 1-IgG<sub>4</sub> y la inmunoglobulina IgG<sub>4</sub> específica frente al antígeno total ( $R = 0,66$ ;  $P = 0,02$ ) y entre Ani s 7-IgG<sub>4</sub> y la IgG<sub>4</sub> específica frente al antígeno total ( $R = 0,77$ ;  $P < 0,001$ ). En contraste, las correlaciones más significativas en los pacientes UC+ fueron entre Ani s 1-IgG<sub>4</sub> y Ani s 1-IgE ( $R = 0,64$ ;  $P = 0,004$ ), así como IgG<sub>4</sub> específica frente al antígeno total ( $R = 0,4$ ;  $P < 0,05$ ).

En AGA, la IgG<sub>4</sub> específica frente al antígeno total de *Anisakis* y frente a Ani s 7 se correlacionó con la edad ( $R > 0,5$ ;  $P < 0,03$ ), mientras que en UC+, Ani s 1-IgG<sub>4</sub> se correlacionó negativamente con el IT ( $R = 0,63$ ;  $P = 0,001$ ) y ambas IgG<sub>4</sub>, anti-Ani s 1 y anti-Ani s 7, se correlacionaron positivamente con la ingesta de pescado ( $R$  entre 0,45 y 0,6;  $P < 0,02$ ).

Con respecto al análisis de regresión lineal, también hemos observado que:

- 1) La respuesta de IgG<sub>4</sub> específica generada frente al antígeno total de *Anisakis*, estuvo significativamente e independientemente influenciada por la edad ( $B = 2,2$ ;  $P = 0,03$ ) y por la IgE específica ( $B = 3,1$ ;  $P = 0,004$ ), como variables predictoras;
- 2) La respuesta de Ani s 1-IgG<sub>4</sub> estuvo independientemente influenciada por la IgE específica ( $B = 2,5$ ;  $P = 0,02$ ) y, con tendencia a la significación, por el intervalo de tiempo ( $B = -1,8$ ;  $P = 0,08$ ) como variables predictoras; y

- 3) La respuesta de Ani s 7-IgG<sub>4</sub> estuvo significativamente e independientemente influenciada por la IgE específica ( $B = 3,7; P \leq 0,001$ ) y la pertenencia al grupo UC+ o AGA ( $B = 2,2; P = 0,03$ ) como variables predictoras, lo que confirma que la frecuencia de los anticuerpos IgG<sub>4</sub> anti-Ani s 7 es mayor en AGA que en UC+.

Finalmente, el análisis de regresión logística realizado, utilizando la pertenencia de grupo como variable dependiente, mostró que la IgE específica anti-*Anisakis*, así como la IgG<sub>4</sub> anti-Ani s 7, fueron variables predictoras independientes (Fig. 15).

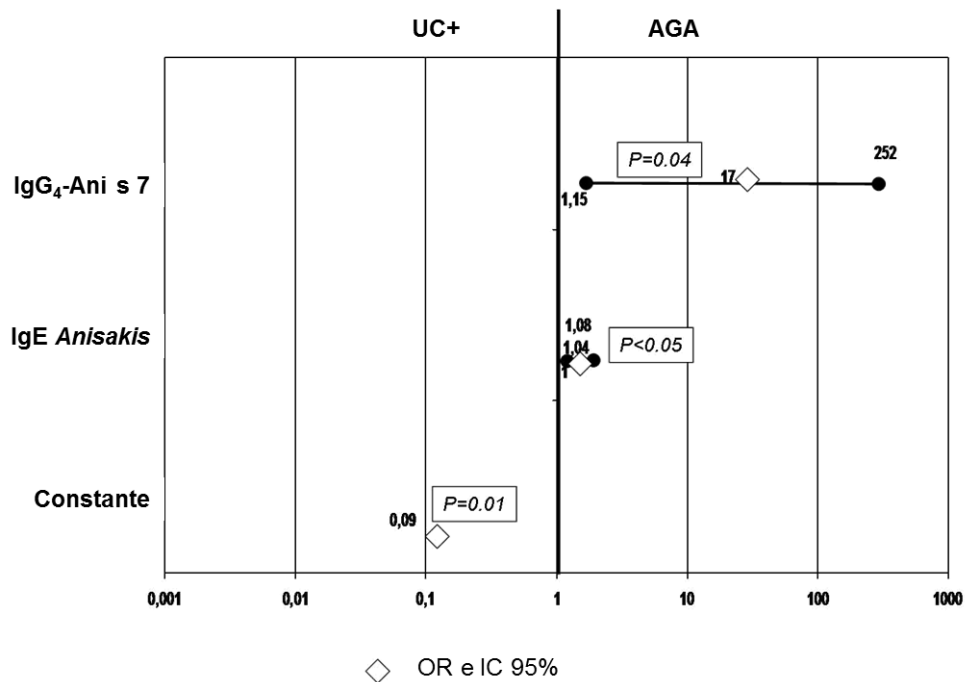


Figura 15.- Variables predictoras independientes en un modelo de regresión logística acerca de la pertenencia a anisakiosis gastroalérgica (AGA) o a la urticaria crónica asociada a la sensibilización con *Anisakis* (UC+). La IgE y la IgG<sub>4</sub> frente al antígeno total, así como frente a Ani s 1 y Ani s 7, que inicialmente fueron incluidas en el análisis, fueron secuencialmente excluidas como variables no-significativas.

### 3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA A SENSIBILIZACIÓN A *Anisakis*

#### 3.1.- Resumen

*Anisakis simplex* está asociado con la presencia de urticaria aguda en la AGA y con la urticaria crónica, en la UC+. En los estudios realizados previamente, utilizando los principales alérgenos recombinantes de *A. simplex*, observamos que la sensibilización frente a este nematodo, en la mayoría de los pacientes con UC+, se produce a través de un parasitismo previo. En el presente estudio, utilizamos 23 pacientes AGA y 22 UC+, comparados frente a 28 pacientes UC-. Se midió la producción de citoquinas en el suero de los pacientes y en los sobrenadantes obtenidos tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica, con antígeno de *A. simplex* o con Concanavalina A (Con A). Previsiblemente, las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con AGA y UC+, produjeron, en general, mayores cantidades de citoquinas que los pacientes con UC-, tras la estimulación con el antígeno larvario. Al comparar AGA y UC+, se detectaron niveles más elevados de IL-4 e IL-10 en AGA. En AGA, observamos niveles mayores de IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , tras la estimulación con el mitógeno, comparándolos con los niveles obtenidos tras la estimulación con *A. simplex*. Por el contrario, se encontraron concentraciones más elevadas de IL-2 al estimular las células mononucleares de sangre periférica con antígeno parasitario. Se encontraron resultados similares en el caso de la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con UC+ y UC-, observándose, nuevamente, mayores niveles de citoquinas tras la estimulación con el mitógeno, fundamentalmente, de IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Con respecto al TGF- $\beta$ , se observaron niveles significativamente más elevados en los pacientes UC- que en los UC+, tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con antígeno larvario de *A. simplex*. Como conclusión final, las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-6 fueron incrementadas tras la estimulación con antígeno de *A. simplex* en los pacientes con AGA y UC+. La producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue mayor en los pacientes con AGA que en los UC+, mientras que la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$  fue mayor en UC+ que en AGA. La producción de TGF- $\beta$  en los pacientes AGA y UC+, fue mayor tras la estimulación con mitógeno que tras la estimulación con antígeno larvario de *A. simplex*. Al determinar los niveles de estas citoquinas en suero, se observaron niveles muy bajos, apenas perceptibles, de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-17A, siendo significativamente mayor la producción de esta citoquina en los pacientes con AGA que en los UC-, o en los UC+, donde los niveles son prácticamente inexistentes ( $P = 0,0003$  y  $P = 0,0107$ ). En el caso de la determinación de TGF- $\beta$  en suero, se encontraron niveles significativamente más elevados en AGA que en UC- ( $P = 0,0313$ ). En otras palabras, el fenotipo AGA produce

una mayor respuesta antiinflamatoria que el UC+, el cual produce una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias.

### 3.2.- Resultados obtenidos en sobrenadantes

Como era de esperar, las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes AGA y UC+ produjeron mayores cantidades de citoquinas que los pacientes UC- tras ser estimuladas con el antígeno larvario de *A. simplex*, a excepción del TGF- $\beta$ , del que se encontraron niveles más elevados en UC- que en AGA y UC+.

Cuando comparamos entre sí AGA y UC+, encontramos niveles significativamente más elevados de IL-4 ( $P = 0,0015$ ) e IL-10 en AGA ( $P = 0,0389$ ) (Tabla 9).

**Tabla 9.- Producción de citoquinas (pg/ml sobrenadante) tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* o Concanavalina A. Los valores de P1 corresponden a la comparación de los niveles de citoquinas en UC+ vs UC-. P2 corresponden a AGA vs UC-. Los valores de P3 corresponden a UC+ vs AGA. (Mediana y rangos intercuartiles).**

Producción de citoquinas inducida con extracto de <i>Anisakis simplex</i>								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
UC-	3,73 (0,73 - 51,12)	0,001 (0,001 - 0,3125)	221,6 (37,33 - 539,5)	1,55 (0,0975 - 5,528)	0,001 (0,001 - 12,30)	0,03 (0,001 - 1,02)	1,415 (0,001 - 7,635)	548,1 (289,3 - 914,8)
UC+	144,8 (31,46 - 412,7)	0,51 (0,001 - 1,65)	730,1 (100,1 - 1560)	4,23 (1,3 - 25,22)	5,7 (0,001 - 12,66)	0,53 (0,001 - 5,85)	15,52 (1,175 - 78,57)	316,2 (119 - 572,7)
AGA	381,3 (85,64- 713,2)	10,5 (2,418 - 50,31)	447,2 (147,4 - 1647)	19,67 (6,05 - 64,04)	13,47 (3,225 - 25,78)	1,39 (0,001 - 6,11)	3,21 (0,2525 - 24,30)	395,7 (232,2 - 685,7)
P1	0,0010	0,0183	0,0699	0,03	0,3781	0,1966	0,0045	0,0421
P2	< 0,0001	< 0,0001	0,0725	< 0,0001	0,0378	0,0381	0,3078	0,1831
P3	0,2299	0,0015	0,9832	0,0389	0,0755	0,5629	0,1496	0,5184
Producción de citoquinas inducida con Concanavalina A								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
UC-	12,13 (1,193 - 133,2)	1,62 (0,02275 - 7,34)	10970 (4229 - 17398)	239,2 (70,58 - 414,2)	279,1 (57,46 - 691,5)	79,75 (4,56 - 147,5)	1036 (238 - 4308)	565,1 (432 - 836,2)
UC+	89,05 (7,605 - 540,3)	2,4 (0,855 - 12,44)	20489 (11719 - 24855)	497,2 (238,3 - 819,5)	529,5 (232,8 - 1296)	136,9 (34,33 - 558,3)	1843 (241,4 - 5553)	542,5 (290 - 806,4)
AGA	15,51 (5,493 - 177,5)	9,735 (1.888 - 21.98)	12190 (5642 - 16368)	300,5 (10,12 - 676,8)	658,8 (67,96 - 1699)	110,9 (21,27 - 598,6)	2979 (59,92 - 6700)	613,9 (261,1 - 1066)
P1	0,1202	0,2458	0,0044	0,0274	0,0029	0,1345	0,0993	0,5498
P2	0,3694	0,0184	0,3775	0,1721	0,1588	0,5757	0,1487	0,9626
P3	0,3547	0,2359	0,0265	0,4798	0,3223	0,6129	0,8239	0,6894

Al observar la producción de citoquinas por células mononucleares periféricas estimuladas con Con A, observamos que, por regla general, los niveles de citoquinas fueron más elevados en los pacientes con AGA y UC+ que en los UC-, con excepción del TGF- $\beta$  (n.s.), siendo significativas las diferencias encontradas en los niveles de la citoquina IL-6 ( $P = 0,0265$ ) de los pacientes con AGA y UC+.

Al comparar la producción de las distintas citoquinas entre las células estimuladas con mitógeno y las estimuladas con antígeno larvario de *A. simplex*, observamos que aquellos AGA que fueron estimulados con el mitógeno Con A, produjeron niveles significativamente más elevados de IL-6 ( $P = 0,0003$ ), IL-10 ( $P = 0,03$ ), IL-17A ( $P < 0,0001$ ), TNF- $\alpha$  ( $P = 0,0002$ ), IFN- $\gamma$  ( $P = 0,0004$ ), que los estimulados con antígeno de *A. simplex*, aunque los niveles de IL-2 fueron significativamente más elevados tras la estimulación con el antígeno parasitario ( $P = 0,0018$ ).

En el caso de los pacientes UC-, se observaron resultados similares, detectándose nuevamente, niveles significativamente mayores de citoquinas tras la estimulación con el mitógeno con grandes diferencias para las citoquinas IL-4 ( $P = 0,0006$ ), IL-6 ( $P < 0,0001$ ), IL-10 ( $P < 0,0001$ ), IL-17A ( $P < 0,0001$ ), TNF- $\alpha$  ( $P < 0,0001$ ) e IFN- $\gamma$  ( $P < 0,0001$ ).

En el caso de los pacientes UC+, se observaron niveles significativamente más altos en los sobrenadantes de los cultivos de las células estimuladas con mitógeno de las citoquinas IL-6 ( $P < 0,0001$ ), IL-10 ( $P < 0,0001$ ), IL-17A ( $P < 0,0001$ ), TNF- $\alpha$  ( $P < 0,0001$ ) e IFN- $\gamma$  ( $P < 0,0001$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.- Comparación de los niveles de citoquinas (pg/ml sobrenadante) en UC-, UC+ y AGA, tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* y con Concanavalina A.**

Diferencias significativas entre los niveles de citoquinas detectados en sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con antígeno larvario de <i>Anisakis simplex</i> y con mitógeno (Concanavalina A).								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
P UC-	0,3897	0,0006	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,6772
P UC+	0,4447	0,1541	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0556
P AGA	0,0018	0,5105	0,0003	0,0351	< 0,0001	0,0002	0,0004	0,2583

### 3.3.- Resultados obtenidos en sueros

A continuación, comparamos los niveles de citoquinas existentes en los tres grupos de pacientes, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos son de concentraciones mucho más bajas a las encontradas en lo sobrenadantes de los cultivos de linfocitos estimulados con mitógeno y con antígeno.

Los niveles encontrados en suero de las citoquinas IL-2, IL-4, e IFN- $\gamma$  son prácticamente inexistentes. Los niveles de IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  son muy bajos.

Encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-17A entre los grupos AGA y UC- ( $P = 0,0003$ ) y los grupos AGA y UC+ ( $P = 0,0107$ ), siendo mucho mayores los niveles encontrados en AGA (en los individuos con urticaria crónica es prácticamente inexistente).

Con respecto a los niveles de TGF- $\beta$  determinados en suero, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AGA y UC- ( $P = 0,0313$ ) (Tabla 11).

**Tabla 11.- Producción de citoquinas (pg/ml suero) en suero de pacientes UC-, UC+ y AGA. Los valores de P1 corresponden a la comparación de los niveles de citoquinas en UC+ vs UC-. P2 corresponden a AGA vs UC-. Los valores de P3 corresponden a UC+ vs AGA. (Mediana y rangos intercuartiles).**

Producción de citoquinas en suero								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
UC-	0,001 (0,001 - 0,001)	0,001 (0,001 - 0,001)	3,88 (2,08 - 55,48)	0,001 (0,001 - 2,12)	0,001 (0,001 - 1,421)	0,44 (0,001 - 22,4)	0,001 (0,001 - 1,12)	5526 (2542 - 6711)
UC+	0,001 (0,001 - 0,001)	0,001 (0,001 - 0,001)	6,83 (2,04 - 204,1)	0,73 (0,001 - 2,99)	0,001 (0,001 - 4)	6,5 (0,001 - 26,09)	0,001 (0,001 - 0,2)	4510 (2959 - 7255)
AGA	0,001 (0,001 - 0,001)	0,001 (0,001 - 0,001)	6,74 (0,7503 - 292,6)	1,85 (0,001 - 3,978)	49 (11,52 - 202,2)	4,115 (0,001 - 63,11)	0,001 (0,001 - 1,15)	7323 (4260 - 9218)
P1	0,1455	0,6956	0,6723	0,4189	0,5770	0,4844	0,3377	0,7612
P2	0,1957	0,8588	0,9532	0,1122	0,0003	0,3655	0,6864	0,0313
P3	0,7362	> 0,9999	0,7357	0,3112	0,0107	0,9461	0,5015	0,1168

#### **4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO *Anisakis simplex***

##### **4.1.- Resumen**

La sensibilización frente a *A. simplex* se ha asociado con la urticaria aguda, pero también con la urticaria crónica. El objetivo de este estudio es caracterizar la UC+ y la UC- en una evaluación transversal y longitudinal. Se seleccionaron 16 pacientes UC+ y 22 UC-, determinándose el *Urticaria Activity Score (UAS)* (ver apartado 4.3. de la sección de Material y Métodos), el consumo de pescado (a través de un cuestionario) (ver apartado 4.2. de la sección de Material y Métodos) y la producción de citoquinas (a través de la citometría de flujo) por las células mononucleares de sangre periférica, tras la estimulación con extracto de *A. simplex* o con Con A. Se puso a los pacientes una dieta libre de pescado durante tres meses y, transcurrido ese tiempo, se volvió a evaluar el UAS y la producción de citoquinas. Se definió como mejoría una diferencia del  $UAS \geq 1$ . No se observaron diferencias en el UAS de ambos grupos. La inducción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  por *Anisakis* fue mayor en UC+. La inducción de IL-6 e IL-10 fue mayor en UC+. La UC+ estuvo asociada con un mayor consumo de pescado, mientras que la UC- se asoció con la ingesta de pescado graso. La correlación del UAS con el pescado graso fue positiva, mientras que con el consumo total de pescado resultó negativa. Se observó un mejor pronóstico de UAS en los pacientes UC+ no sometidos a dieta. La mejoría se asoció con mayores cocientes IL-10/IFN- $\gamma$  e IL-10/IL-6 inducidos por Con A. Además, el consumo previo de pescado graso, se asoció con la mejoría en esos pacientes. Como conclusión: nuestros datos confirman la existencia de diferentes fenotipos clínicos e inmunológicos de UC+. Nuestros resultados muestran una relación compleja entre los hábitos de consumo de pescado, la producción de citoquinas y el pronóstico de la urticaria, que puede tener importantes consecuencias sobre las recomendaciones dietéticas en los pacientes con urticaria crónica. Al encontrar una sensibilización por *A. simplex*, no se debe recomendar a los pacientes automáticamente una dieta libre de pescado para reducir el contacto con los productos de *A. simplex*.

#### 4.2.- ¿Qué diferencia la UC+ de la UC-?

##### 1 Epidemiología, clínica y determinaciones rutinarias de laboratorio

Se incluyeron 22 pacientes con UC- y 16 con UC+, 26 fueron mujeres y 12 hombres. La edad media fue superior en los pacientes con UC+ ( $54,7 \pm 12,5$  años), que en los que tenían UC- ( $39,3 \pm 15,6$  años,  $P = 0,02$ ).

Dentro del grupo UC+, 13/16 pacientes fueron atópicos, mientras que en el grupo UC- fueron 17/22. En UC+, 7/16 pacientes estaban sensibilizados frente al polen, mientras que en UC- fueron 10/22. En UC+, 5/16 estaban sensibilizados frente a ácaros y en UC-, 6/22 (n.s.).

El *Autologous Serum Skin Test* (ASST) (ver apartado 4.5. de la sección de Material y Métodos) fue positivo en 3/12 pacientes UC+ y en 4/11 UC- (n.s.).

La mediana de la duración previa de la urticaria fue de 20 meses, con un IQR de 8 - 36 meses en UC+ y de seis (IQR 2,8 - 24) meses en UC- ( $P = 0,07$ ).

El UAS fue  $3,6 \pm 1,5$  en UC+ y  $4,0 \pm 1,4$  en UC- (n.s.).

La mediana de IgE específica de *A. simplex* fue de 4,8 (IQR 1,5 - 11,5) kU/l en UC+. La mediana de la IgE total fue de 117 (IQR 83 - 414) kU/l en UC+ y 103 (43 - 161) kU/l en UC- (n.s.). Tal y como exigían los criterios de inclusión, todos los UC+ mostraron anticuerpos IgE frente a *Anis 7*.

Un paciente UC+ y un paciente UC- fueron positivos en la serología frente a Hepatitis B, un paciente UC- mostró anticuerpos positivos frente a Hepatitis C, y un paciente UC+ sufría hipotiroidismo no-autoimune y estaba bajo terapia de sustitución.

## 2 Hábitos de ingesta de pescado

El análisis bivariante sólo mostró una ingesta total de pescado significativamente más elevada en los pacientes UC+ (2,5; IQR 1,6 - 2,5 vs 1,25; 1 - 2,5 porciones por semana;  $P = 0,04$ ).

En la Figura 16, se muestran los hábitos de ingesta de pescado en diferentes fenotipos de urticaria crónica. Se observa una fuerte asociación entre UC+ y la ingesta total de pescado ( $B = +3,2$ ; IC 1,3 - 8,1;  $P = 0,01$ ), y una clara asociación entre UC- y la ingesta de pescado graso ( $B = 0,2$ ; IC 0,03 - 1,0;  $P = 0,05$ ). El pescado en conserva y los boquerones en vinagre no están significativamente asociados con ninguno de los dos fenotipos de urticaria estudiados.

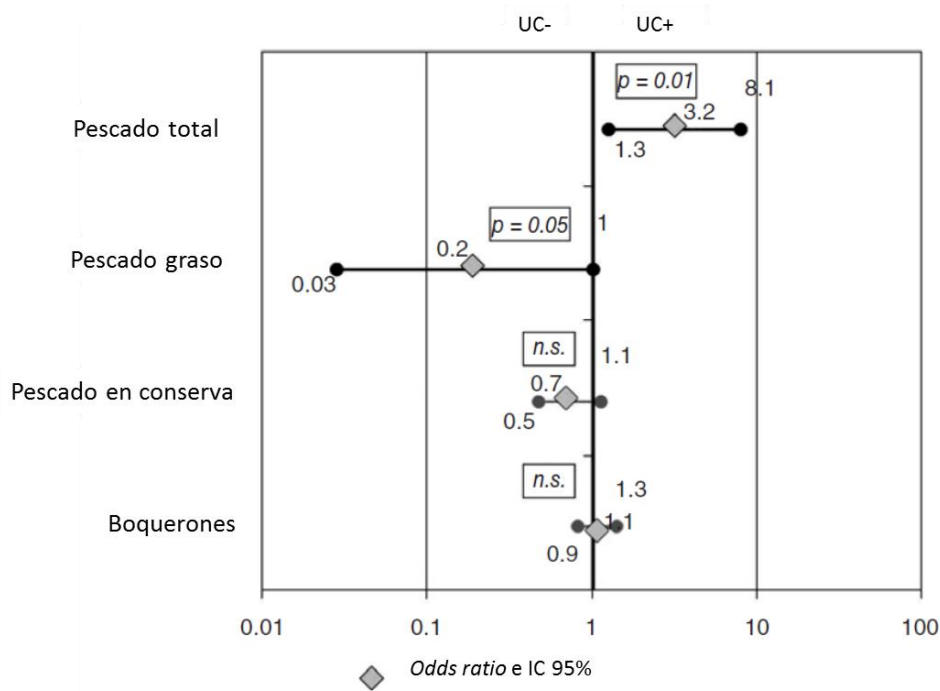


Figura 16.- Hábitos de ingesta de pescado en diferentes fenotipos de urticaria crónica. Resultados tras análisis de regresión logística, incluyendo todas las posibles variables de ingesta de pescado. La mediana de las porciones de pescado semanal (total, pescado graso, pescado enlatado) y mensual (boquerones en vinagre) en urticaria crónica sin (UC-) y con (UC+) sensibilización frente a *Anisakis simplex*.

### 3 Producción de citoquinas

De forma general, se observó que todas las citoquinas estudiadas en los sobrenadantes, tras la estimulación con extracto de *Anisakis*, eran producidas en mayor cantidad en el grupo UC+ que en el UC-, aunque tan sólo se establecieron diferencias significativas para la IL-2, la IL-4 y el IFN- $\gamma$  (Tabla 12).

Así mismo, la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con Con A también fue superior en el grupo UC+, registrándose diferencias significativas a nivel de las citoquinas IL-6 e IL-10 (Tabla 12).

**Tabla 12.- Producción de citoquinas (pg/ml) en sobrenadantes tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* o Concanavalina A.**

<b>Citoquinas inducidas con extracto de <i>Anisakis simplex</i></b>								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
UC-	6,8 (0,7-51,1)	0 (0-0,1)	286 (37-576)	2 (0,3-8,1)	0 (0-8,5)	0,14 (0-1,5)	1,3 (0-7,5)	252 (162-677)
UC+	108 (37-537)	0,4 (0-1,8)	879 (43-1601)	2,4 (1,4-41)	7,2 (0-14,8)	0 (0-6,1)	10,1 (0,7-51)	390 (199-578)
<i>P</i>	0,001	0,014	0,25	0,25	0,19	0,76	0,019	0,46
<b>Citoquinas inducidas con Concanavalina A</b>								
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
UC-	18,2 (2,3-163)	1,7 (0,06-7,3)	10757 (2153-16100)	220 (103-371)	318 (59-730)	94 (26-334)	1020 (322-2902)	342 (134-741)
UC+	102 (10,6-618)	2,7 (1,0-26,5)	18152 (13016-23299)	338 (231-604)	482 (202-1283)	163 (42-522)	2758 (303-5297)	519 (308-698)
<i>P</i>	0,14	0,23	0,004	0,03	0,13	0,26	0,18	0,24

Medianas y rangos intercuartiles en sobrenadantes (pg/ml). Los valores de *P* se obtuvieron comparando los niveles de citoquinas en UC+ vs UC-.

En la Tabla 13 podemos observar las correlaciones existentes entre las citoquinas detectadas. En general, la producción de las diferentes citoquinas con frecuencia se correlacionaba positivamente, entre sí.

Tabla 13.- Estudios de correlación.

a)	<i>Anisakis</i>	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-17	TGF- $\beta$
IL-2	Rho		0,466	-0,090	0,108	0,174	0,142	-0,075	0,318
	P		0,014	0,654	0,592	0,394	0,480	0,715	0,113
IL-4	Rho	0,466		0,237	0,565	0,486	0,561	0,434	0,183
	P	0,014		0,170	0,000	0,004	0,000	0,010	0,307
IL-6	Rho	-0,090	0,237		0,709	0,090	0,049	0,179	0,248
	P	0,654	0,170		0,000	0,614	0,781	0,310	0,163
IL-10	Rho	0,108	0,565	0,709		0,393	0,250	0,385	0,116
	P	0,592	0,000	0,000		0,021	0,148	0,025	0,522
TNF- $\alpha$	Rho	0,174	0,486	0,090	0,393		0,400	0,347	-0,034
	P	0,394	0,004	0,614	0,021		0,019	0,048	0,851
IFN- $\gamma$	Rho	0,142	0,561	0,049	0,250	0,400		0,473	0,049
	P	0,480	0,000	0,781	0,148	0,019		0,005	0,788
IL-17	Rho	-0,075	0,434	0,179	0,385	0,347	0,473		-0,271
	P	0,715	0,010	0,310	0,025	0,048	0,005		0,133
TGF- $\beta$	Rho	0,318	0,183	0,248	0,116	-0,034	0,049	-0,271	
	P	0,113	0,307	0,163	0,522	0,851	0,788	0,133	
b)	Con A	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-17	TGF- $\beta$
IL-2	Rho		0,746	0,246	-0,061	0,807	0,350	0,080	0,220
	P		0,000	0,137	0,717	0,000	0,031	0,635	0,192
IL-4	Rho	0,746		0,336	0,212	0,534	0,472	0,291	0,249
	P	0,000		0,039	0,202	0,001	0,003	0,076	0,138
IL-6	Rho	0,246	0,336		0,470	0,125	0,479	0,534	0,273
	P	0,137	0,039		0,003	0,454	0,002	0,001	0,102
IL-10	Rho	-0,061	0,212	0,470		0,052	0,538	0,709	-0,126
	P	0,717	0,202	0,003		0,756	0,000	0,000	0,458
TNF- $\alpha$	Rho	0,807	0,534	0,125	0,052		0,412	0,132	0,253
	P	0,000	0,001	0,454	0,756		0,010	0,431	0,130
IFN- $\gamma$	Rho	0,350	0,472	0,479	0,538	0,412		0,528	0,144
	P	0,031	0,003	0,002	0,000	0,010		0,001	0,396
IL-17	Rho	0,080	0,291	0,534	0,709	0,132	0,528		0,154
	P	0,635	0,076	0,001	0,000	0,431	0,001		0,364
TGF- $\beta$	Rho	0,220	0,249	0,273	-0,126	0,253	0,144	0,154	
	P	0,192	0,138	0,102	0,458	0,130	0,396	0,364	

Coefficiente de correlación de *Spearman* y significación entre la producción de las diferentes citoquinas tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con a) *Anisakis* o b) Concanavalina A.

En este análisis de regresión no se obtuvieron datos de la producción de citoquinas que explicaran el desarrollo de UC+ o UC-. No se establecieron resultados significativos sobre los cocientes de producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

#### 4 Relación entre los grupos de datos

En pacientes con UC+, se correlacionó la ingesta total de pescado con la producción de IL-6 e IL-17A inducida con Con A (Rho > 0,5;  $P < 0,05$ ).

Sin embargo, en UC-, la ingesta total de pescado se asoció positivamente con la producción de IL-2 inducida por *A. simplex* (Rho 0,46;  $P < 0,05$ ) y, negativamente, con el TNF- $\alpha$  detectado tras la estimulación por *A. simplex* (Rho = -0,53;  $P = 0,02$ ). La ingesta de pescado graso también se asoció con la producción de IL-2 inducida por *A. simplex* (Rho 0,56;  $P = 0,01$ ). Los boquerones en vinagre fueron asociados negativamente con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Rho < -0,53;  $P < 0,02$ ). El pescado en lata fue correlacionado negativamente con la producción de IL-4 (Rho 0,44;  $P = 0,05$ ).

El análisis de regresión, realizado sobre los resultados de las citoquinas, mostró que sólo la IL-6 inducida por la estimulación con Con A estaba asociada con el grupo UC+, pero con un insignificante *Odds Ratio* (OR 1,0003 IC 1,000 - 1,0006;  $P = 0,05$ ).

El UAS se relacionó con la producción de citoquinas específicas, aunque en los pacientes UC+ se observó una correlación positiva con los cocientes IL-10/IL-17A (Rho 0,63;  $P = 0,02$ ) e IL-10/IFN- $\gamma$  (Rho 0,51;  $P = 0,05$ ) inducidos por *A. simplex* y, en UC-, una correlación positiva con IL-10/TNF- $\alpha$  (Rho 0,48;  $P = 0,04$ ) y negativa con el cociente TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$  (Rho -0,51;  $P = 0,03$ ).

El UAS sí se asoció con los hábitos de ingesta de pescado. A través de un análisis de regresión, se demostró que el UAS estaba positivamente asociado con la ingesta de pescado graso ( $B = 0,89$ ;  $P = 0,02$ ), pero negativamente con la ingesta total de pescado ( $B = -0,47$ ;  $P = 0,03$ ) (Fig. 17).

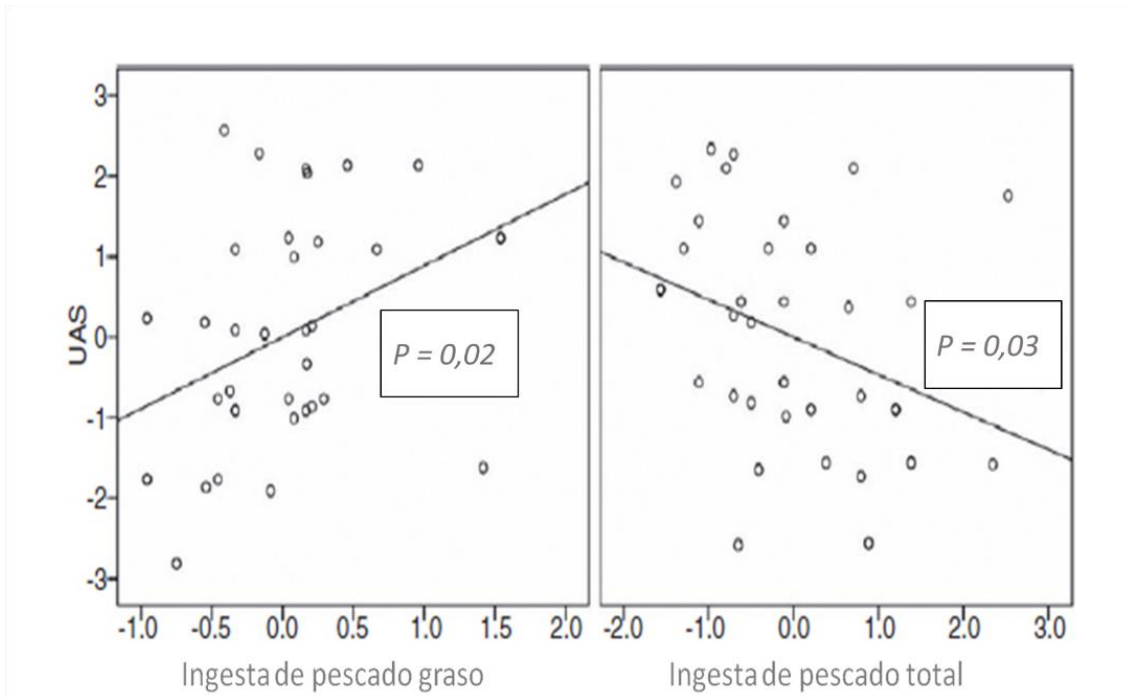


Figura 17.- *Urticaria Activity Score (UAS)* y hábitos de ingesta de pescado. Gráfica de regresión parcial: se muestran aquellas variables que alcanzaron  $P \leq 0,05$  en un modelo de regresión. Todas las variables, incluyendo los datos de hábitos de ingesta de pescado, se incluyeron en este modelo con el fin de encontrar una explicación al resultado del UAS.

#### 4.3.- ¿Qué factores afectan al pronóstico de la urticaria crónica?

##### ○ Análisis bivariable

No pudimos encontrar un efecto positivo de la dieta sobre la mejoría de los pacientes UC+; de hecho, existía una ligera tendencia hacia una mejoría clínica, si los pacientes no se encontraban a dieta ( $P = 0,07$ ). Este efecto tampoco se observó en los pacientes UC- ni aparecieron resultados diferentes con respecto a los ASST positivos.

Cuando analizábamos sólo el grupo UC+, la mejoría se asociaba con la atopia (principalmente con la sensibilización frente a ácaros,  $P = 0,03$ ). Este efecto no se encontró en UC-.

El aumento inicial de los cocientes IL-10/IFN- $\gamma$  ( $P = 0,009$ ) e IL-10/IL-6 ( $P = 0,07$ ), inducidos por Con A, fue asociado con la mejoría.

Al comparar, individualmente, la producción de citoquinas antes y después del estudio en el grupo UC-, la mejoría se asoció con una mayor producción de TNF- $\alpha$  ( $P = 0,04$ ) y de IFN- $\gamma$  ( $P = 0,01$ ) inducida por la estimulación con *Anisakis*, con una mayor producción de IFN- $\gamma$  ( $P = 0,04$ ) inducida por Con A y con una menor producción de TGF- $\beta$  ( $P = 0,01$ ) inducida también por Con A. En UC+, la mejoría estuvo asociada con una mayor producción de TGF- $\beta$  inducida por la estimulación con el antígeno de *Anisakis* ( $P = 0,04$ ).

- **Análisis multivariable**

El análisis de regresión mostró que ambas dietas, así como una mayor ingesta previa de pescado total, estaban asociadas con un peor pronóstico, mientras que una mayor ingesta de pescado graso estaba asociada con un mejor pronóstico (Fig. 18A).

Así mismo, al analizar sólo los pacientes que se pusieron a dieta, se observó que existió mejoría en aquellos que previamente habían consumido mayores cantidades de pescado graso y menores cantidades de pescado total (Fig. 18B).

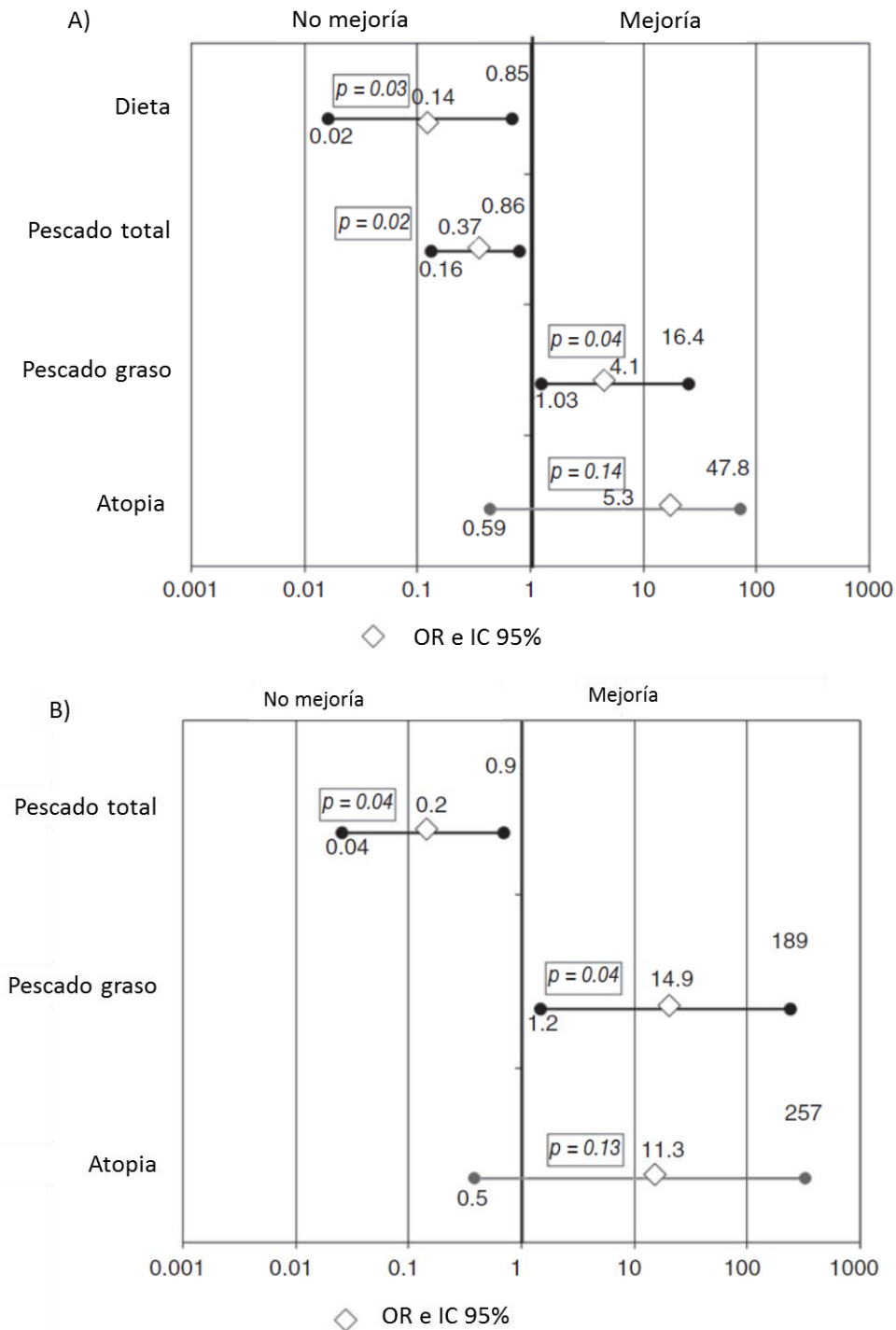


Figura 18.- Variables que explican la mejoría clínica de la urticaria crónica. La mejoría se define como una disminución mínima de la puntuación del *Urticaria Activity Score (UAS)* de 1, tras el estudio. Estas variables se incluyeron inicialmente en este modelo, que registró una  $P < 0,1$  en el análisis bivariable (hábitos de ingesta de pescado, dieta, estado atópico). A) Aquí se incluyó también la dieta como un posible factor explicativo y adquiere significación para un peor pronóstico. B) Análisis únicamente en aquellos pacientes que mantuvieron una dieta libre de pescado.

## 5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii* Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A *Anisakis simplex* EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA

### 5.1.- Resumen

*Toxoplasma gondii* es un microorganismo que se transmite a través de los alimentos y de la vía oral-fecal, estableciendo una infección crónica, relacionada de forma negativa con la atopia, en el contexto de la hipótesis de la higiene. Como ya se ha indicado antes, *A. simplex* es un parásito del pescado asociado con la urticaria crónica en regiones endémicas. Hemos analizado la relación entre ambos agentes infecciosos en la urticaria crónica. Hemos incluido 42 pacientes con urticaria crónica (18 pacientes con UC+ y 24 pacientes con UC-). Evaluamos el estado atópico de los pacientes, a través de *SPT* frente a los aeroalérgenos más comunes y la sintomatología respiratoria. Determinamos la sensibilización a *A. simplex* a través del *SPT* y a través de la detección de IgE específica por la técnica de *CAP-System*. Los niveles de IgG anti-*T. gondii* fueron determinados a través del método de *ELISA*. En los pacientes con urticaria crónica, se determinó la seropositividad a *T. gondii*, la sensibilización a *A. simplex*, la atopia y si eran inmigrantes o no. La seroprevalencia de *T. gondii* fue del 40,5% en los pacientes con urticaria crónica y del 42,1% en el grupo control. La frecuencia de infección por *T. gondii* fue mayor en los pacientes inmigrantes (41,2% vs 12%;  $P = 0,036$ ). Los anticuerpos IgG anti-*T. gondii* se asociaron con un parasitismo previo por *A. simplex* ( $OR\ 6,73$ ;  $P = 0,03$ ) y con una sensibilización atópica, de forma independiente ( $OR\ 5,85$ ;  $P = 0,04$ ). En los pacientes con urticaria crónica, *T. gondii* no tuvo ningún efecto protector en la sensibilización atópica, ni en la sensibilización a *A. simplex*.

### 5.2.- Descripción de los resultados

La media de la edad de todos los sujetos del estudio fue  $43,2 \pm 14,6$  años, siendo el porcentaje de mujeres de un 62,3%. El 37,7% de los pacientes fue diagnosticado clínicamente de rinoconjuntivitis y/o asma bronquial, y el 60,7% tuvo, al menos, una prueba cutánea positiva (*SPT*) frente a alguno de los aeroalérgenos estudiados. El 16,4% de los pacientes eran inmigrantes.

La mediana de los valores de IgE específica anti-*Anisakis* en el grupo UC+, expresada en kU/l) fue 5,6 kU/l (*IQR* 2,1 - 12,3 kU/l) y los niveles séricos de IgE total (kU/l) fueron (Mediana 240; *IQR* 60,8 - 601 kU/l), siendo ambos valores superiores a los observados en el grupo UC- (Mediana 103,5; *IQR* 36,5 - 157 kU/l;  $P = 0,03$ ).

La prevalencia de la infección por *T. gondii* mediante la detección de niveles de IgG específica  $\geq 35$  UI/ml por *ELISA*, fue de un 42,1% en la población control y de 40,5% en los pacientes diagnosticados de urticaria crónica (n.s.).

La prevalencia de la infección por *T. gondii* fue superior en el grupo UC+ que en el UC-, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa en el análisis bivariable ( $P = 0,08$ ; Fig.19).

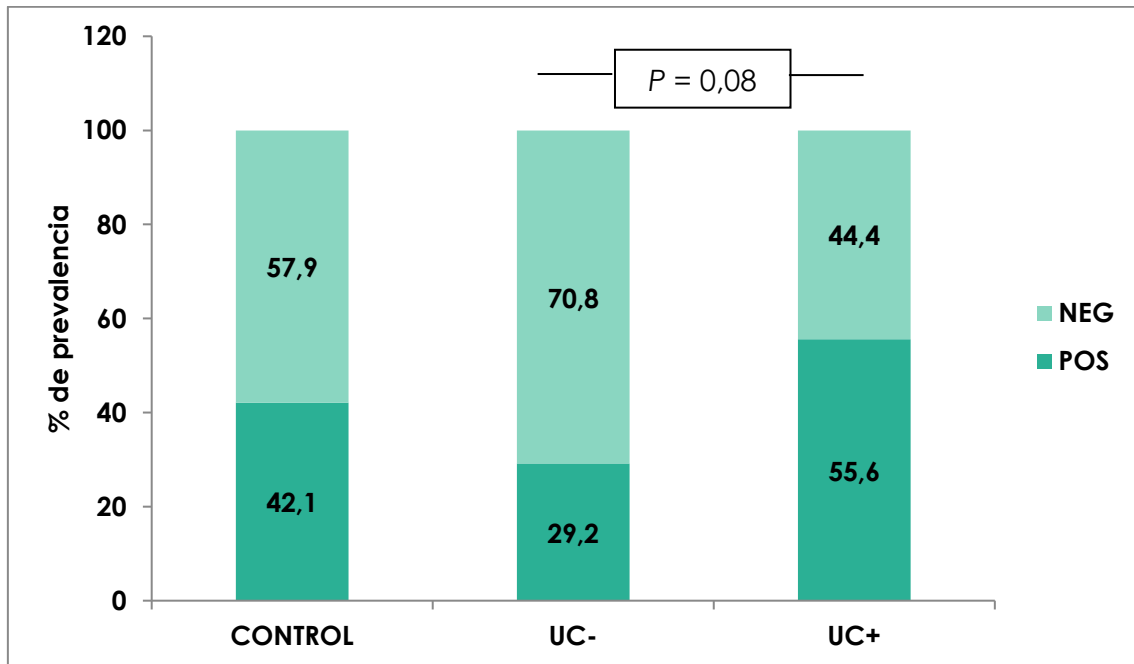


Figura 19.- Prevalencia (%) de la infección por *Toxoplasma gondii*, determinada por *ELISA*, en los individuos control, pacientes con urticaria crónica con sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+) y pacientes con urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex* (UC-).

Los pacientes con niveles de IgG anti-*T. gondii*  $\geq 35$  UI/ml tuvieron una mayor prevalencia de sensibilización frente a aeroalérgenos (atopia) que los pacientes seronegativos (82,4% vs 44%,  $P = 0,014$ ; Fig. 20).

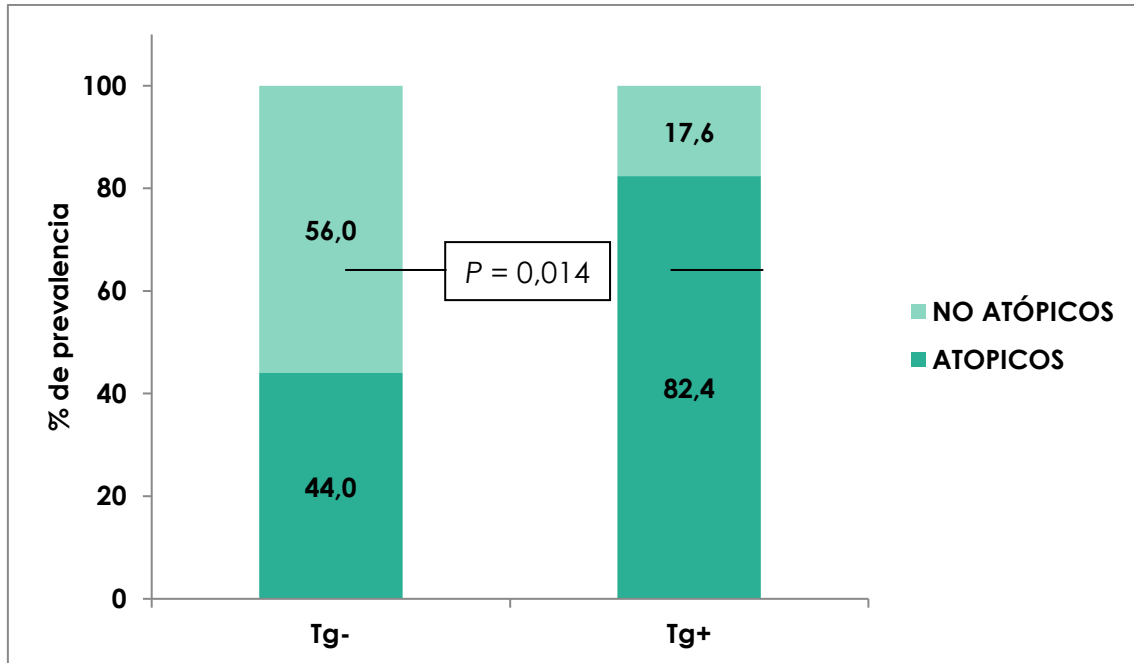


Figura 20.- Prevalencia (%) de atopia relativa a la infección por *Toxoplasma gondii*, medida por ELISA, en pacientes con urticaria crónica, independientemente de la infección por *Anisakis simplex*; no infección por *T. gondii* (Tg-), seropositividad frente a *T. gondii* (Tg+).

Además, se observó que la sensibilización de estos pacientes positivos a *T. gondii*, era mayor frente a polen (58,8% vs 32%,  $P = 0,08$ ) y menor frente a ácaros, moho y epitelio de gato y perro, comparando frente al grupo *T. gondii*. No se apreció diferencia entre las manifestaciones respiratorias de ambos grupos. Al comparar el porcentaje de inmigrantes dentro del grupo de pacientes de urticaria crónica, se observó un porcentaje de individuos inmigrantes superior en el grupo de los positivos (41,2%) al compararlos con los negativos frente a *T. gondii* (12%) ( $P = 0,036$ ; Fig.21).

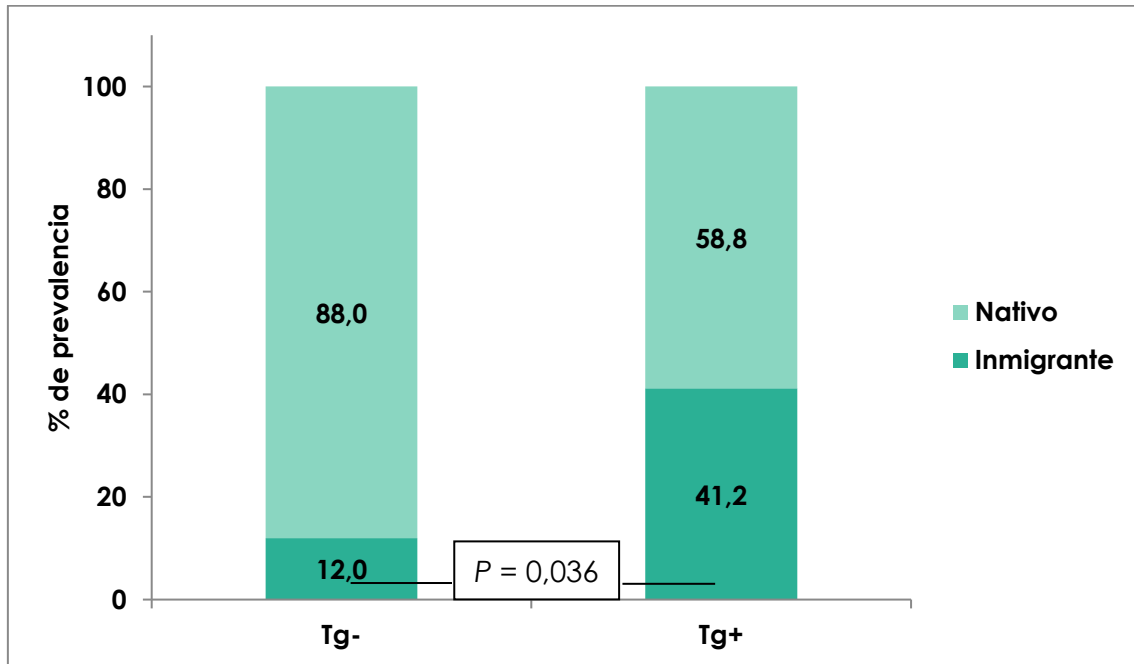


Figura 21.- Porcentaje de inmigrantes procedentes de Sudamérica dentro de los grupos de pacientes con urticaria crónica seropositivos (Tg+) y seronegativos (Tg-) a *Toxoplasma gondii*.

Los inmigrantes de nuestra región proceden fundamentalmente de Sudamérica. Al no tener los mismos hábitos alimenticios, en relación a la ingesta de pescado, que la población local española, la frecuencia del contacto con las larvas de *A. simplex* podría ser menor en estos sujetos, por lo que procedimos a la realización de un modelo de regresión logística, con el fin de analizar la posible relación entre la sensibilización frente a *A. simplex*, atopia y el estatus de inmigrante. En este análisis, la sensibilización frente a *A. simplex*, así como la atopia, registraron una significación estadística expresada como una mayor probabilidad de estar también infectados por *T. gondii* y una asociación positiva cercana a la significación entre el estatus inmigrante y *T. gondii* (Tabla 14).

Tabla 14.- Variables explicativas de la infección por *Toxoplasma gondii* en un modelo de regresión logística.

	<i>Odds ratio</i>	<i>P</i>	Error estándar
<b>Sensibilización a <i>A. simplex</i></b>	6,73	0,03	0,87
<b>Atopia</b>	5,85	0,04	0,87
<b>Estatus de inmigrante</b>	0,18	0,08	0,97
<b>Constante</b>	0,33	0,32	1,1

Aunque, según lo propuesto por Flegr y Stříž en 2011, las mujeres tendrían mayores probabilidades de estar infectadas por *T. gondii*, en nuestro estudio no hemos encontrados diferencias significativas en relación al sexo entre ambos grupos seropositivos y seronegativos. Por esta razón, esta variable no ha sido incluida en el análisis logístico como una variable independiente.

## 6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA

### 6.1. Resumen

A lo largo de las últimas décadas, se ha observado un incremento en la prevalencia de las reacciones alérgicas en los países desarrollados. Se han elaborado diversos estudios que demuestran que la infección por microorganismos que se transmiten a través de la vía fecal-oral, o a través de los alimentos y que, raramente, producen alteraciones de la flora intestinal, como es el caso de *T. gondii*, reducen la prevalencia de las alteraciones alérgicas mediadas por la IgE, asociada con la respuesta inmunológica de tipo Th<sub>2</sub>. Por otro lado, *A. simplex* y *Helicobacter pylori*, han sido asociados positivamente con la urticaria crónica, una enfermedad multifactorial no mediada por los mecanismos inmunológicos de tipo Th<sub>2</sub>. Se seleccionaron 90 pacientes, divididos en dos grupos: 68 pacientes con urticaria crónica y 22 controles, que no mostraron ningún episodio de urticaria. Se determinaron los niveles de IgE anti-*A. simplex*, y la IgG frente a *T. gondii* y *H. pylori*. Se analizaron los resultados, utilizando un método de comparación bivariable. En los pacientes con urticaria se observaron los siguientes resultados (Mediana, IQR): IgE frente a *A. simplex* (0,25 kU/l; 0 - 4,18); IgG anti-*T. gondii* (32,28 UI/l; 14 - 242,82); IgG anti-*H. pylori* (120,9 NTU/ml; 59,74 - 157,13). En el grupo control los valores fueron: IgE CAP frente a *A. simplex* (0 kU/l; 0 - 11,25); IgG anti-*T. gondii* (15,80 UI/l; 2,12 - 199,69); IgG anti-*H. pylori* (64,32 NTU/ml; 30,27 - 121,23). Cuando analizamos el parasitismo previo por *A. simplex*, tan sólo se observó un valor de IgE positivo en el 13,6% de los controles, mientras que el 50% de los pacientes con urticaria crónica mostraron un contacto previo con este parásito. En el caso de la IgG anti-*T. gondii*, no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo de urticaria crónica, con porcentajes de positividad del 36,4% y del 46,3%, respectivamente. La infección por *H. pylori* estuvo significativamente asociada con la urticaria crónica. A pesar de la ya conocida elevada prevalencia de IgG anti-*H. pylori* en nuestra región, que también queda demostrada en nuestra población de estudio, tan sólo el 6,1% de los pacientes con urticaria crónica fueron negativos, mientras que en el grupo control, el porcentaje de individuos que no tenían una infección demostrable por este microorganismo fue del 22,7% ( $P = 0,025$ ). A continuación, estudiamos el posible efecto sinérgico de la coinfección en la urticaria crónica. Este efecto se observó en el caso de la coinfección por *A. simplex* y *H. pylori*, viéndose en el 50% de los pacientes con urticaria crónica, frente a un 4,5% en el grupo control. En contraste, la inclusión de *T. gondii* en el análisis de la coinfección, redujo las diferencias entre ambos grupos, siendo del 4,5% en los controles, frente al 27,3% en el grupo de urticaria crónica. En conclusión, el parasitismo por *A. simplex*, así como la infección por *H. pylori*, están asociados con la

urticaria crónica y este efecto se encuentra potenciado por la coinfección por ambos agentes infecciosos.

El supuesto efecto protector de las infecciones oro-fecales en las alteraciones mediadas por IgE, en el contexto de la hipótesis de la higiene, no pueden extrapolarse a la urticaria crónica, a la que se encuentran asociados diferentes mecanismos inmunológicos.

## 6.2.- Determinación de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en función del sexo y de la edad

Al determinar los niveles de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* en función del sexo y de la edad, no observamos diferencias significativas entre hombres y mujeres ( $P = 0,3$ ), ni en función de la edad (menores o mayores de 40) ( $P = 0,4$ ) (Tablas 15 y 16).

**Tabla 15.- Determinación de los niveles de IgG anti-*Helicobacter pylori* en función del sexo (Medianas y rangos intercuartiles) (en este caso, se utilizó n = 89).**

Mediana (IQR)	Mujeres (n = 59)	Hombres (n = 30)
IgG anti- <i>H. pylori</i> NTU/ml	96,82 (59,39 - 145,9)	129,3 (41,33 - 172)

**Tabla 16. Determinación de los niveles de IgG anti-*H. pylori* en función de la edad (Medianas y rangos intercuartiles).**

Mediana (IQR)	Edad < 40 años (n = 38)	Edad > 40 años (n = 52)
IgG anti- <i>H. pylori</i> NTU/ml	97,15 (37,52 - 157,1)	119,8 (60,43 - 152,8)

### 6.3. Determinación de anticuerpos específicos frente a *Anisakis simplex*, *Toxoplasma gondii* y *Helicobacter pylori*

En primer lugar, estudiamos la presencia de cada uno de los tres agentes infecciosos en los grupos de sujetos con y sin urticaria crónica, a través de un análisis bivariable, en el que se compararon, individualmente, las medianas de los valores obtenidos de IgE anti-*A. simplex*, IgG anti-*T. gondii* e IgG anti-*H. pylori*, observándose en todos los casos valores más elevados en el grupo de pacientes con urticaria crónica (Tabla 17) (Fig.22).

**Tabla 17.- Comparación por análisis bivariable de IgE anti-*A. simplex* (kU/l), IgG anti-*T. gondii* (UI/l) e IgG anti-*H. pylori* (NTU/ml) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (Medianas y rangos intercuartiles).**

Mediana (IQR)	Grupo de pacientes con urticaria crónica (n = 68)	Grupo control (n = 22)
IgE-CAP <i>A. simplex</i> kU/l	0,25 (0 - 4,18)	0 (0 - 11,25)
IgG anti- <i>T. gondii</i> UI/l	32,28 (14 - 242,82)	15,80 (2,12 - 199,69)
IgG anti- <i>H. pylori</i> NTU/ml	120,9 (59,74 - 157,13)	64,32 (30,27 - 121,23)

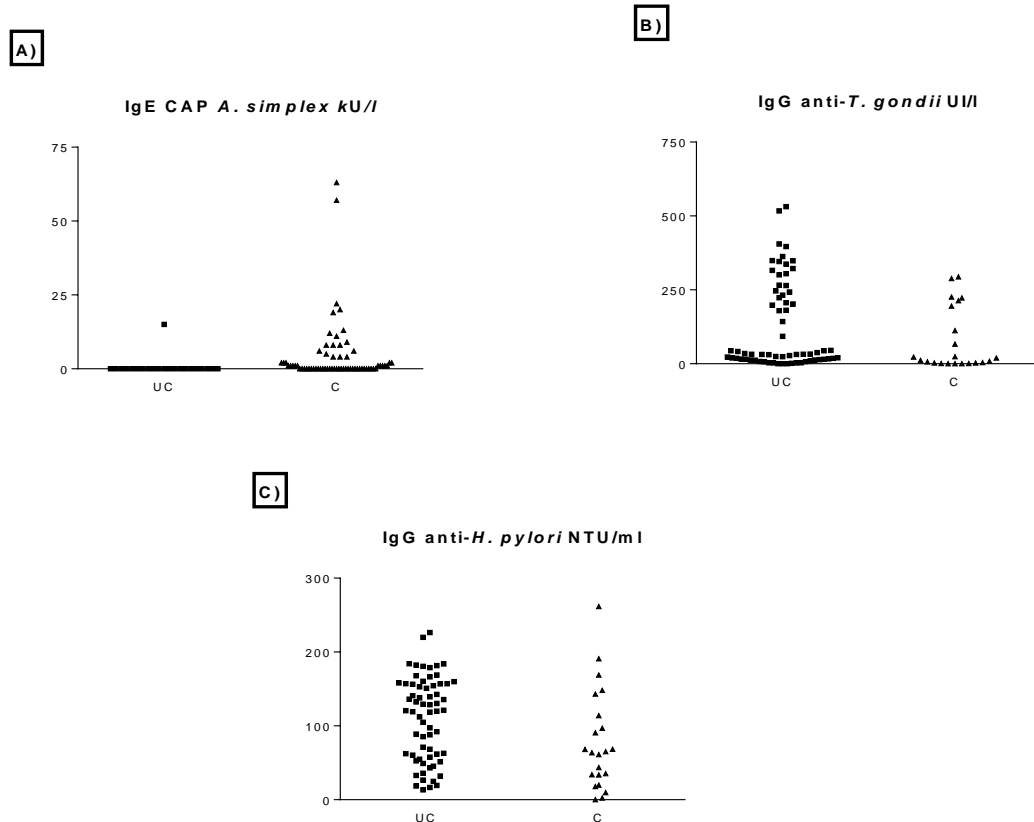


Figura 22.- Valores de A) IgE (CAP-FEIA) anti-*Anisakis simplex* (kU/l), B) IgG anti-*Toxoplasma gondii* (UI/l) y C) IgG anti-*Helicobacter pylori* (NTU/ml) en pacientes con y sin urticaria crónica.

#### 6.4. Determinación del porcentaje de positivos frente a *Anisakis simplex*, *Toxoplasma gondii* y *Helicobacter pylori*

A continuación, procedimos a evaluar el porcentaje de positividad frente a cada uno de los organismos incluidos en el estudio en el grupo de pacientes con urticaria y en el grupo control.

Primero, al examinar si los sujetos incluidos en el estudio habían sido previamente parasitados por *A. simplex*, observamos que el valor de IgE fue positivo sólo en el 13,6% de los sujetos del grupo control, mientras que el porcentaje de positividad en el grupo de pacientes con urticaria crónica, fue de un 50% ( $P = 0,003$ ) (Tabla 18) (Fig. 23).

Tabla 18.- Determinación del porcentaje de positividad a IgE anti-*Anisakis simplex* (kU/l) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (n = 90).

Parasitismo previo por <i>A. simplex</i>	Grupo de pacientes con urticaria crónica	Grupo control
% positivos IgE (kU/l)	50% (n = 34)	13,6% (n = 3)
TOTAL	68	22

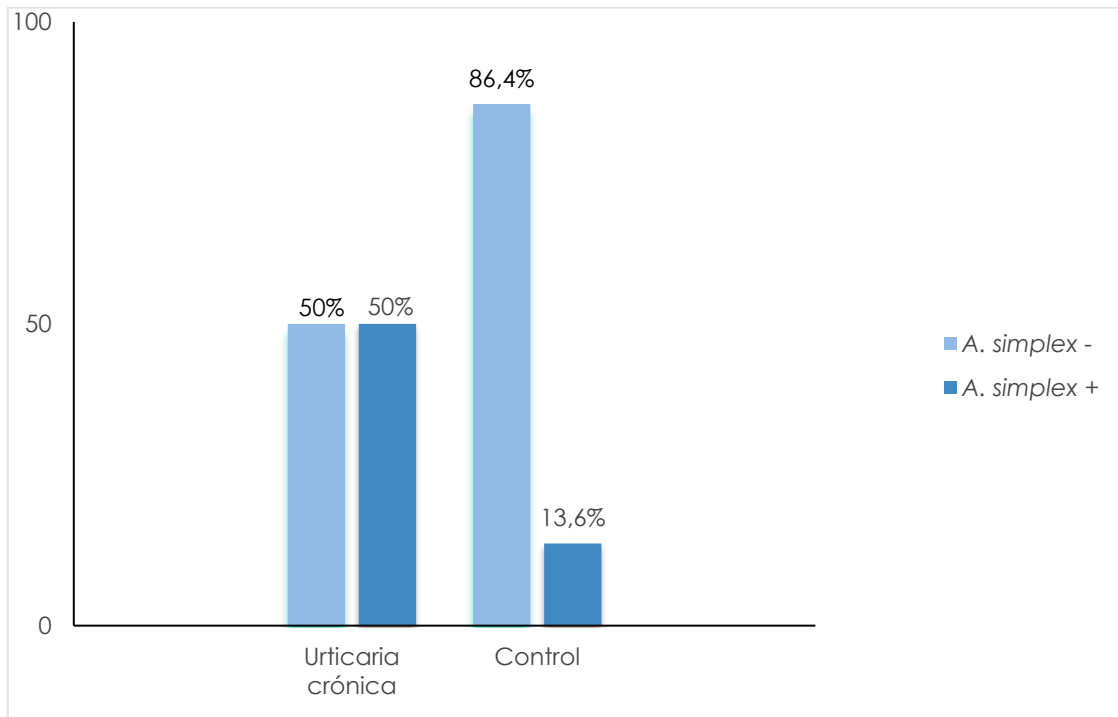
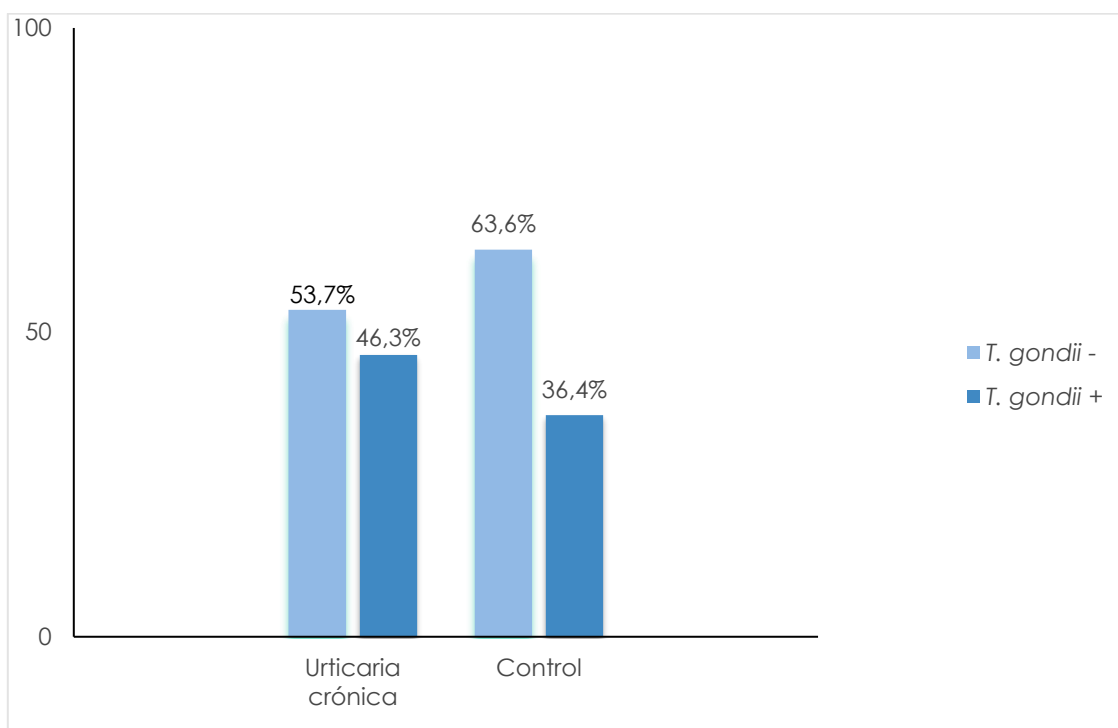


Figura 23.- Porcentaje de positivos y negativos a IgE (kU/l) anti-*Anisakis simplex* del grupo control y del grupo de pacientes con urticaria crónica.

Segundo, al comparar los niveles de IgG anti-*T. gondii* en el grupo control y en el grupo de pacientes con urticaria, no se observaron diferencias significativas, siendo los porcentajes de positividad, de un 36,4% y un 46,3%, respectivamente ( $P = 0,417$ ) (Tabla 19) (Fig. 24).

**Tabla 19.- Determinación del porcentaje de positividad a IgG anti-*Toxoplasma gondii* (UI/l) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (n = 89).**

Positividad frente a IgG anti- <i>T. gondii</i> (UI/l)	Grupo de pacientes con urticaria crónica	Grupo control
IgG anti- <i>T. gondii</i> (UI/l)	46,3% (n = 31)	36,4% (n = 8)
TOTAL	67	22

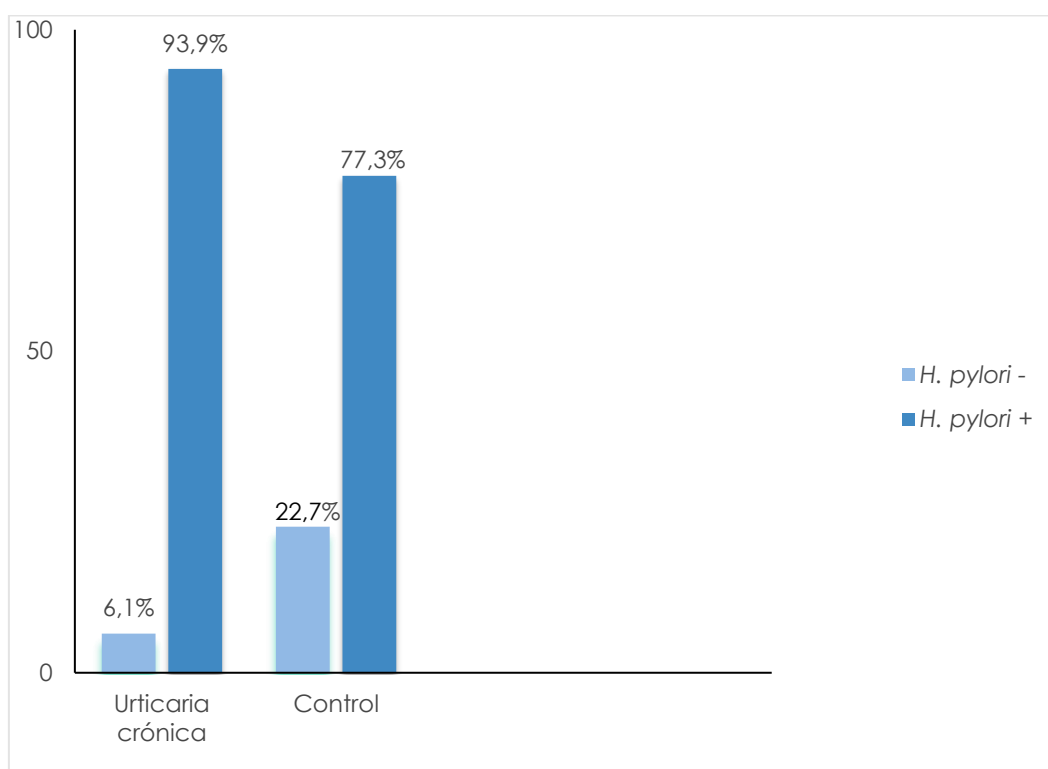


**Figura 24.- Porcentaje de positivos y negativos a IgG (UI/l) anti-*Toxoplasma gondii* en el grupo control y en el grupo de pacientes con urticaria crónica.**

Tercero, al analizar la posible relación entre la infección por *H. pylori*, a través de la determinación de los niveles de IgG anti-*H. pylori*, y la urticaria crónica, se observó una relación positiva, ya que sólo fueron negativos a este microorganismo el 6,1% de los pacientes con urticaria crónica, mientras que en el grupo control sólo fue negativo el 22,7% de los pacientes ( $P = 0,025$ ) (Tabla 20) (Fig. 25).

**Tabla 20.- Determinación del porcentaje de positividad a IgG anti-*Helicobacter pylori* (NTU/ml) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control. (n = 88).**

Positividad frente a IgG anti- <i>H. pylori</i> (NTU/ml)	Grupo de pacientes con urticaria crónica	Grupo control
IgG anti- <i>H. pylori</i> (NTU/ml) +	93,9% (n = 62)	77,3% (n = 17)
IgG anti- <i>H. pylori</i> (NTU/ml) -	6,1% (n = 4)	22,7% (n = 5)
TOTAL	66	22



**Figura 25.- Porcentaje de positivos y negativos a IgG (NTU/ml) anti-*Helicobacter pylori* en el grupo control y en el grupo de pacientes con urticaria crónica.**

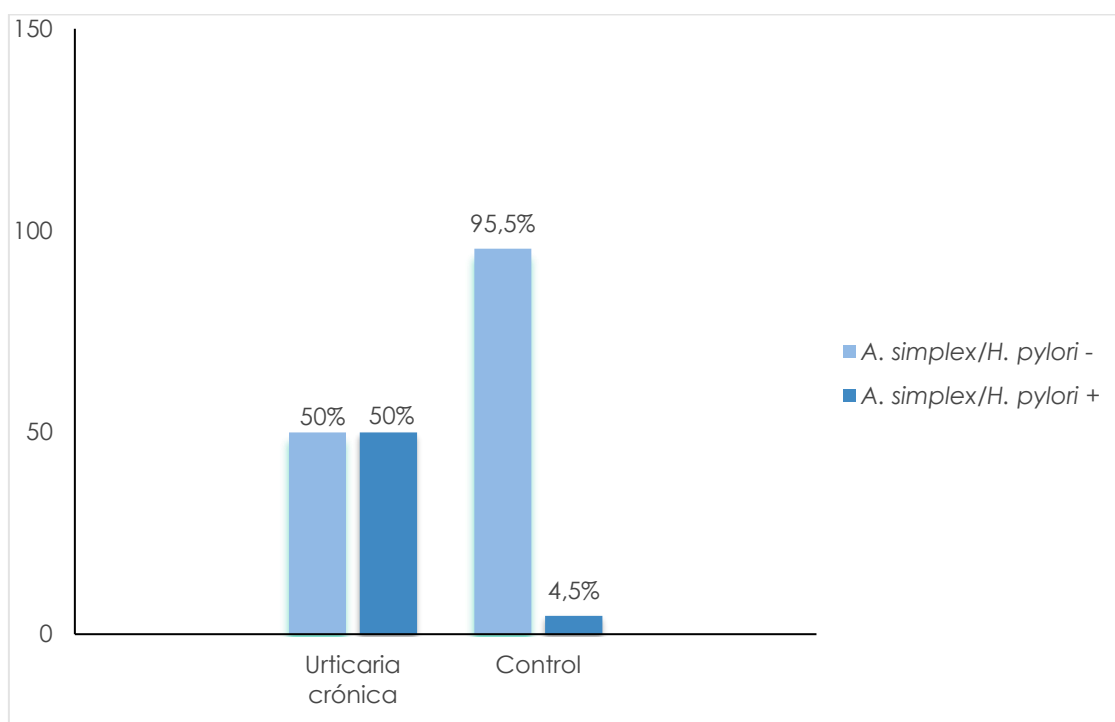
### 6.5. Estudio del efecto de la coinfección entre *Anisakis simplex*, *Toxoplasma gondii* y *Helicobacter pylori* sobre la urticaria crónica

Una vez estudiada la relación de la infección producida por cada uno de los tres agentes estudiados con la urticaria crónica, procedemos a estudiar el posible efecto sinérgico de las coinfecciones.

Primero, estudiamos el caso de la coinfección por *A. simplex* y *H. pylori*. Ambos patógenos aparecen en un 50% de los pacientes con urticaria crónica, por lo que se deduce un efecto sinérgico de ambas infecciones ( $P = 0,001$ ) (Tabla 21), (Fig. 26).

**Tabla 21.- Determinación del porcentaje de coinfección por *Anisakis simplex* y *Helicobacter pylori* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica. (n = 88).**

	Grupo de pacientes con urticaria crónica	Grupo control
Coinfección por <i>H. pylori</i> y <i>A. simplex</i>	50% (n = 33)	4,5% (n = 1)
TOTAL	66	22

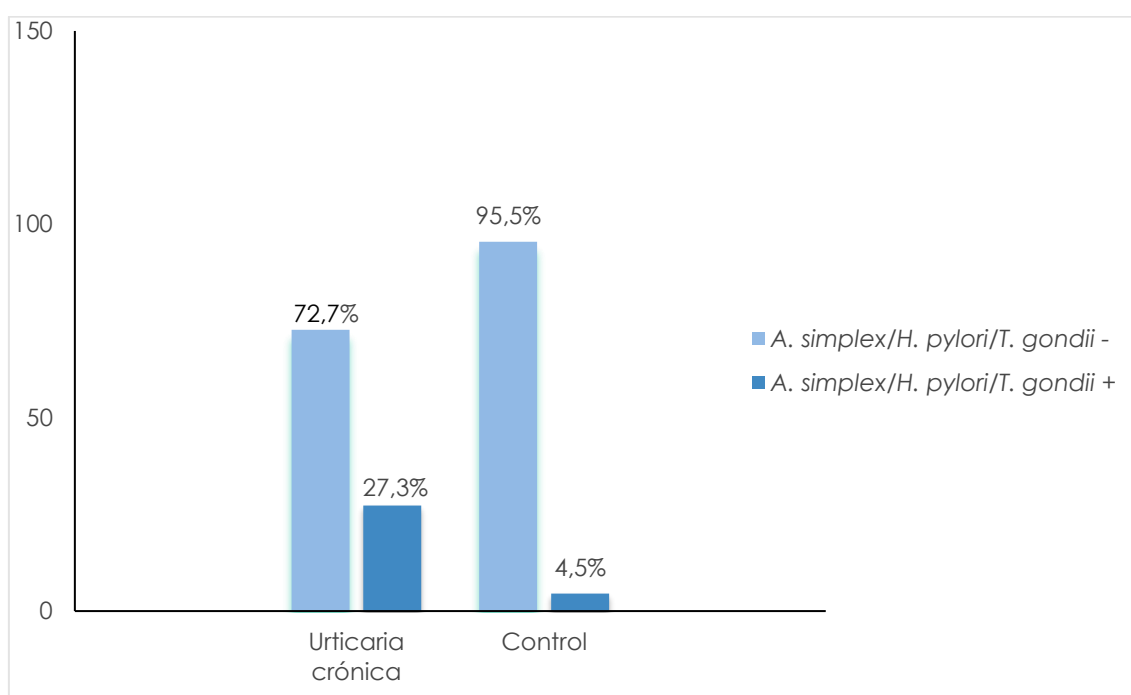


**Figura 26.- Determinación del porcentaje de positivos y negativos a *Anisakis simplex* y *Helicobacter pylori* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica.**

En contraste, al incluir *T. gondii* en el análisis de la coinfección, las diferencias entre los diferentes grupos se redujeron, siendo tan sólo de un 27,3% en el grupo de urticaria crónica, aunque se mantiene el efecto sinérgico significativo de la coinfección sobre la urticaria crónica ( $P = 0.031$ ) (Tabla 22), (Fig. 27).

**Tabla 22.- Determinación del porcentaje de coinfección por *Anisakis simplex*, *Helicobacter pylori* y *Toxoplasma gondii* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica. (n = 88).**

	Grupo de pacientes con urticaria crónica	Grupo control
Coinfección por <i>H. pylori</i> , <i>A. simplex</i> y <i>T. gondii</i>	27,3% (n = 18)	4,5% (n = 1)
TOTAL	66	22



**Figura 27.- Determinación del porcentaje de positivos y negativos a *Anisakis simplex*, *Helicobacter pylori* y *Toxoplasma gondii* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica.**

*V-DISCUSIÓN*

## V-DISCUSSION

### 1.- USO DE LOS ALÉRGENOS RECOMBINANTES Ani s 1 Y Ani s 7 PARA DIFERENCIAR LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS A *Anisakis simplex*

Este es el primer estudio que revela la utilidad de los alérgenos recombinantes de *Anisakis*, Ani s 1 y Ani s 7, para realizar un diagnóstico diferencial de las alteraciones alérgicas asociadas a *Anisakis simplex*.

En los últimos 20 años, se ha extendido el conocimiento, no sólo acerca de la relación de la anisakiosis gástrica con el consumo de pescado crudo o poco cocinado, sino también acerca de las alteraciones alérgicas producidas por el contacto con este parásito (Daschner y Pascual, 2005).

Dentro de las alteraciones alérgicas asociadas con la parasitación por *A. simplex*, destacan la patología denominada anisakiosis gastroalérgica (AGA), la cual ha sido descrita como una entidad clínica, bien diferenciada, en las regiones con hábitos de consumo de pescado crudo, o poco cocinado y la urticaria crónica, que frecuentemente se encuentra asociada con la sensibilización frente a este nematodo (UC+) (Puente *et al.*, 2008).

En los últimos años, se ha propuesto el uso de alérgenos recombinantes para el diagnóstico de la alergia, pudiendo diferenciar no sólo los distintos patrones de sensibilización, sino también los diferentes fenotipos clínicos (Valenta *et al.*, 1999; Twardosz-Kropfmüller *et al.*, 2010). Se han caracterizado 14 alérgenos de *A. simplex* (<http://www.allergome.org>), de los cuales, algunos han demostrado ser útiles para la determinación de la alergia frente a *A. simplex* (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2008) aunque, habitualmente, no se tenga en cuenta la diferenciación clínica de los pacientes. Recientemente, se ha discutido acerca de si los alérgenos de *A. simplex* deben ser considerados, o no, como alérgenos alimentarios (Daschner *et al.*, 2012). En nuestro análisis, hemos sido capaces de demostrar que las alteraciones alérgicas asociadas a una sensibilización por *A. simplex* (por ej.: AGA y UC+) tienen un perfil de reconocimiento distinto frente a Ani s 1.

Tras analizar los principales descubrimientos hechos en este estudio, hemos confirmado la elevada sensibilidad y especificidad de los alérgenos recombinantes utilizados. Así se ha puesto de manifiesto la elevada proporción de sueros positivos a Ani s 7, tanto en los pacientes UC+ como en los AGA, y la baja proporción de sueros positivos a Ani s 1 en

UC+, con respecto al grupo de AGA. El concepto de alérgeno principal se aplica cuando la frecuencia de reconocimiento de un alérgeno, entre los pacientes alérgicos al organismo fuente de ese alérgeno, es superior al 50%. Los últimos resultados nos permiten discutir la definición de Ani s 1 como alérgeno principal, mientras que nos confirman la ya reportada inmunodominancia de Ani s 7 en el contexto de los alérgenos de *A. simplex*. Es más, nuestros datos también confirman que el uso combinado de las determinaciones de IgE frente a Ani s 1 y Ani s 7 es, actualmente, la mejor opción en términos de especificidad y sensibilidad para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana, ya que, este método, proporciona una sensibilidad del 100% en pacientes diagnosticados de AGA. La complementariedad de los datos obtenidos frente al alérgeno Ani s 1, junto con los obtenidos con las determinaciones de Ani s 7, ya había sido establecida previamente (Anadón *et al.*, 2009; Anadón *et al.*, 2010). En nuestro estudio hemos observado que un paciente UC- fue, inesperadamente, positivo a ambos alérgenos y que, dos pacientes del grupo control fueron positivos frente a Ani s 7. No es probable que estos resultados sean falsos positivos, sino que sean consecuencia de parasitaciones asintomáticas previas en dichos sujetos. De hecho, en otro estudio se obtuvieron unos resultados similares (Anadón *et al.*, 2010) donde el 2,1% de los sueros positivos a Ani s 7 se encontraron entre los pacientes con valores de CAP inferiores a 1,5 kU/l.

Los resultados de este estudio también subrayan la hipótesis de que la sensibilización de la mayor parte de los pacientes UC+ de nuestra región, está causada realmente por un contacto previo con *A. simplex*. Anteriormente, se ha visto que Ani s 7 es reconocido a nivel de IgE específica en ratas Wistar, a las cuales se había inoculado, intraperitonealmente, una larva viva de tercer estadio (L3) de *A. simplex* (Anadón *et al.*, 2009). Este reconocimiento, durante la fase aguda de la infección, también se ha demostrado en este estudio, en pacientes con una historia clara de AGA. El hecho de que casi todos los pacientes con UC+ hayan reconocido también Ani s 7, confirma que la detección de IgE específica está realmente asociada con un parasitismo activo previo, y descarta la posibilidad de que dicho reconocimiento sea debido como consecuencia de una reacción cruzada (Johansson *et al.*, 2001). Hay que resaltar que los pacientes utilizados en dicho estudio procedían de una zona geográfica donde la sensibilización frente a los ácaros del polvo no es muy frecuente, debido a la sequedad del clima. Es muy interesante ver cómo, aunque los niveles de IgE específica son menores en UC+, Ani s 7 continúa siendo reconocido por la mayor parte de los pacientes. Estos resultados también pueden ser útiles a la hora de estudiar otras alteraciones asociadas a *Anisakis*. En un estudio previo de urticaria prolongada inducida por un parasitismo agudo (definida como una reacción de urticaria aguda de duración inferior a seis semanas, pero superior a 72h), las características serológicas fueron similares a UC+, con valores séricos menores de IgE específica y total (Daschner *et al.*, 2010c). Por lo que incluso, aunque la

UC+ o la urticaria prolongada estén asociadas con una menor producción de inmunoglobulinas, el alérgeno principal Ani s 7 es reconocido independientemente de la cantidad de IgE específica producida. Por lo tanto, estos resultados también pueden aplicarse para la interpretación de estudios futuros en pacientes sin urticaria, pero con prueba cutánea o IgE específica positivos, o con sintomatología asociada al consumo de pescado. En este sentido, la alta prevalencia de IgE sérica positiva asociada a *A. simplex* en algunas regiones, ha sido interpretada como un parasitismo subclínico previo y no como una reacción cruzada (Valiñas *et al.*, 2001; Puente *et al.*, 2008).

Se han obtenido resultados diferentes para Ani s 1, el primer alérgeno descrito de *A. simplex*, denominado alérgeno principal (Moneo *et al.*, 2000). Mientras que en los pacientes AGA, este alérgeno fue reconocido en la misma proporción que Ani s 7, en los UC+ tan sólo el 42,5% de los pacientes presentaron IgE específica frente a este alérgeno recombinante. Este alérgeno, usado en combinación con Ani s 7, es capaz de diferenciar, en una elevada proporción, ambas alteraciones alérgicas asociadas a *A. simplex*. En UC+, no podemos saber en qué momento ha tenido lugar el parasitismo agudo, pero los bajos niveles de inmunoglobulina específica han sido interpretados como indicador de que la parasitación tuvo lugar hace un largo periodo de tiempo. Tal y como mostró un estudio previo, en los pacientes que presentaron síntomas alérgicos compatibles con las alergias relacionadas con el consumo de pescado, la respuesta frente a Ani s 1 fue más prolongada en el tiempo que frente a Ani s 7, siendo la urticaria y/o angioedema las manifestaciones alérgicas más frecuentemente observadas (Anadón *et al.*, 2010). Nuestros resultados están en concordancia con la hipótesis de que la UC+ está asociada, no sólo con niveles bajos de IgE específica, sino también con un reconocimiento antigénico diferente. Un aspecto a destacar de nuestros resultados es la interpretación del alérgeno principal como un alérgeno reconocido por más del 50% de los pacientes alérgicos. Mientras que no existe duda de que Ani s 7 es un alérgeno principal en ambos grupos de estudio, únicamente en los pacientes AGA, también puede denominarse alérgeno principal a Ani s 1. Esto remarca la necesidad de una evaluación minuciosa de la historia clínica de los pacientes cuyo suero es analizado, si se realizan estudios con varios alérgenos recombinantes o alérgenos purificados.

En conclusión, se ha demostrado que los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 son útiles para el diagnóstico no sólo de AGA, sino también de UC+, combinando especificidad y sensibilidad y abriendo nuevas vías de estudio de posibles mecanismos, cuando estudiamos las causas o la patofisiología de la UC+. Nuestros resultados también prueban que Ani s 7 es un fuerte marcador de infecciones previas por *A. simplex*. Además, la sensibilización frente a *A. simplex* en la mayor parte de los pacientes con UC+ parece ser debida a una parasitación previa.

## **2.- IgG<sub>4</sub> ESPECÍFICA: NUEVO MARCADOR EN EL DIAGNÓSTICO Y POSIBLE PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LAS ALTERACIONES ALÉRGICAS ASOCIADAS CON *Anisakis***

La producción de la IgE está asociada con la patogenicidad de las alteraciones alérgicas, aunque, en el caso de las enfermedades parasitarias, se piensa que ha evolucionado, al menos parcialmente, como una respuesta inmunitaria protectora. La producción de IgE está, junto con la activación de los mastocitos y la eosinofilia, dirigida por una respuesta tipo Th<sub>2</sub>. La IgG<sub>4</sub> reconoce estructuras antigénicas idénticas a la IgE (Hussain *et al.*, 1992).

Ha sido estudiado el cambio de clase secuencial IgM-IgG<sub>4</sub>-IgE, observando que los antígenos responsables de la inducción de IgE, lo son también de la producción de IgG<sub>4</sub> (Vercelli *et al.*, 1998; Aalberse *et al.*, 2009).

En las alteraciones alérgicas asociadas a *Anisakis*, hemos encontrado un modelo interesante, donde las características alérgicas y la respuesta inmunológica inducida por el parásito, se producen conjuntamente. La AGA es una entidad clínica en la que se ha verificado la producción simultánea de varios isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo la IgE y la IgG<sub>4</sub> (Daschner *et al.*, 2002). Por otro lado, en la UC+, no sólo los niveles de la inmunoglobulina IgE circulantes son menores que en AGA, sino que también los niveles de IgG<sub>4</sub> son bajos y frecuentemente indetectables (Daschner y Pascual, 2005). Se ha demostrado que el comportamiento de la UC+ difiere clínicamente de otras formas de urticaria crónica sin sensibilización a *Anisakis* (UC-). Aquí, los fenómenos inmunológicos, como la producción de citoquinas, también son diferentes (Daschner y Pascual, 2005; Daschner *et al.*, 2011; Cuéllar *et al.*, 2012). La urticaria crónica tiene un origen multifactorial, asociado o desencadenado en algunos casos con la presencia de infección (Zuberbier *et al.*, 2009) y también se ha postulado recientemente esto en la UC+, aunque la patogénesis no ha sido aún dilucidada. De hecho, la presencia de IgE en esta entidad debe interpretarse como una evidencia de parasitismo previo por *A. simplex*, pero el papel directo de esta inmunoglobulina es incierto (Cuéllar *et al.*, 2012). En una publicación reciente, donde la hipersensibilidad a *Anisakis* también ha sido asociada con la urticaria crónica, los autores incluso propusieron esta sensibilización como causa de la urticaria crónica (Ventura *et al.*, 2013). Mientras que la urticaria aguda, o la anafilaxia en la AGA, se explican por el reconocimiento de la IgE por los alérgenos de la larva invasora cuando penetra en la mucosa gastrointestinal, el papel de otros isotipos de inmunoglobulinas no está establecido aún en la patogénesis de la UC+.

En este sentido, en comparación con la AGA, nosotros encontramos, como esperábamos, menores niveles de IgE e IgG<sub>4</sub> específicas frente al antígeno total, así como frente a los alérgenos recombinantes estudiados en UC+. La positividad de IgG<sub>4</sub> a

Ani s 1 y Ani s 7, así como de IgE a Ani s 1, fue también menor en UC+, mientras que no se encontraron diferencias en la positividad de la IgE a Ani s 7, un hecho descrito previamente. Además, esto indica un contacto previo con la larva viva (Anadón *et al.*, 2010; Cuéllar *et al.*, 2012).

Aunque en conjunto, todos los niveles de inmunoglobulinas fueron inferiores en UC+, el bajo cociente IgG<sub>4</sub>/IgE cercano a la significación en UC+ cuando analizamos la inmunorreactividad frente a Ani s 7 es interesante y puede ser una de las características principales de diferenciación entre AGA y UC+, que serán más estudiadas a continuación.

Como se muestra en la sección de Resultados, la reactividad de la IgG<sub>4</sub> sólo se evidencia si, simultáneamente, existe también reactividad de la IgE frente al mismo alérgeno. El hecho de que las inmunoglobulinas IgE e IgG<sub>4</sub>, de algunos pacientes con UC+, no reaccionaran frente a ninguno de estos alérgenos, podría ser debido a que estos anticuerpos han sido producidos frente a otros alérgenos no estudiados. Por otro lado, no podemos descartar que la lectura de niveles de inmunoglobulinas muy bajos e incluso indetectables, se deba al tiempo transcurrido tras el contacto con el parásito. Surge la cuestión de si los índices inferiores de positividad de IgG<sub>4</sub> en ambas entidades, se deben a una diferente velocidad de caída de la IgE y la IgG<sub>4</sub> a lo largo del tiempo desde el último contacto, o si pueden reflejar una respuesta inmunológica diferente al comparar AGA y UC+. Los estudios de correlación, así como los modelos de regresión, muestran claramente una asociación positiva de la IgG<sub>4</sub> con la IgE, pero incluso si la IgE ha demostrado previamente una caída continua tras el pico (4-6 semanas) del episodio de parasitación aguda, especialmente para IgG<sub>4</sub>-Ani s 1 parece haber una asociación negativa independiente. Pero incluso, si la IgE fuera realmente producida secuencialmente tras la IgG<sub>4</sub>, el último isotipo podría caer más rápidamente que la IgE tras el episodio de parasitación. Se ha postulado que la IgG<sub>4</sub> refleja una exposición extensa en una respuesta Th<sub>2</sub> modificada, una infección prolongada por parásitos o repetidas picaduras de himenópteros (Urban *et al.*, 1992; Akdis *et al.*, 1998; Platts-Mills *et al.*, 2001). Además, la IgG<sub>4</sub> disminuye tras la quimioterapia antiparasitaria (Atmadja *et al.*, 1995; Pinelli *et al.*, 2007). ¿Cómo puede ser interpretada la IgG<sub>4</sub> en nuestro modelo?

Los hábitos de consumo de pescado y la alta prevalencia de la infección por *Anisakis* en el pescado consumido, pueden ser capaces de mantener una respuesta inmunológica producida por un contacto repetido con, al menos, alguno de los antígenos inductores de respuestas tipo Th<sub>2</sub> (Daschner *et al.*, 2010c). Esto se soporta por la correlación positiva de IgG<sub>4</sub>-Ani s 1 y Ani s 7 con la ingesta de pescado. Por el contrario, el contacto

repetido con la larva viva y sus proteínas excretoras-secretoras, podría encontrar similitud en un modelo de inducción de IgG<sub>4</sub> tras repetidas picaduras de himenópteros.

Diferentes estudios han mostrado que los hábitos de consumo de pescado crudo están asociados con la sensibilización frente a *A. simplex* (Fernández de Corres *et al.*, 2001; Puente *et al.*, 2008; Mattiucci *et al.*, 2013). Además, previamente, ha sido hipotetizado que una mayor frecuencia de episodios de parasitación estaría asociada con la aparición de urticaria aguda (AGA), mientras que una probabilidad más baja de parasitación con larvas vivas estaría asociada con la urticaria crónica (UC+) (Daschner *et al.*, 2010c). Teniendo en cuenta los diferentes cocientes IgG<sub>4</sub>/IgE y la mayor tasa de positivos de IgG<sub>4</sub> a Ani s 1 y Ani s 7 en AGA, el presente estudio además indica que la IgG<sub>4</sub> es producida tras un parasitismo repetido, con la urticaria aguda como una característica limitada en el tiempo y exclusivo del cuadro clínico de la AGA. La correlación positiva de la edad con IgG<sub>4</sub> e IgG<sub>4</sub>-Ani s 7 en AGA e IgE específica, así como la edad considerada como variable independiente predictora en el análisis de regresión de IgG<sub>4</sub>, indica que la producción de IgG<sub>4</sub> está relacionada con una mayor probabilidad de la repetición previa de los episodios de parasitación aguda.

Esto lleva a un patrón atípico de edad de los fenómenos alérgicos debidos a una sensibilización por *A. simplex*, comparado con lo que ocurre en las clásicas alergias atópicas (Daschner *et al.*, 2000; Fernández de Corres *et al.*, 2001).

Por el contrario, en los pacientes UC+, la ausencia de la IgG<sub>4</sub> protectora lleva a una forma crónica de la manifestación dérmica. De hecho, los niveles intermedios de IgG<sub>4</sub> han sido asociados con manifestaciones prolongadas de urticaria aguda (Daschner *et al.*, 2010c).

Es interesante destacar que la IgG<sub>4</sub>, especialmente la específica del alérgeno Ani s 7, difiere en ambas entidades clínicas. Ani s 7 además no sólo es un alérgeno principal, sino que también es un alérgeno dominante, que en AGA, aunque raramente en UC+, también induce anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos.

La regresión logística mostró que no sólo la IgE específica es más alta en AGA, como había sido observado previamente, sino que también mostró que los niveles de IgG<sub>4</sub>-Ani s 7 son mayores en AGA que en UC+, pudiendo diferenciar de manera independiente ambas entidades clínicas. Estudios previos con *Ascaris* mostraron una ausencia de correlación cuando se analizó IgG<sub>4</sub> e IgE frente al antígeno total, pero mostraron una asociación clara cuando se utilizó la proteína recombinante ABA-1A, resaltando la utilidad del estudio de los alérgenos específicos dominantes (Turner *et al.*, 2005).

Una limitación de este estudio es el pequeño tamaño de la muestra analizada, dictada por la disponibilidad de los pacientes, lo que debe ser considerado a la hora de interpretar los resultados. Pero a pesar de ello, los datos obtenidos están en concordancia con las características inmunológicas conocidas de la enfermedad parasitaria aguda, lo que ayuda a ampliar las posibilidades diagnósticas del isotipo IgG<sub>4</sub>.

Teniendo todas estas consideraciones en mente, este estudio demuestra que las alteraciones alérgicas asociadas a *Anisakis*, pueden ser consideradas como un modelo humano entre las alergias y el parasitismo, permitiendo una mayor profundización en el estudio del papel protector *versus* el potencial patogénico de la IgE y la IgG<sub>4</sub>.

Especialmente, la producción de IgG<sub>4</sub>-Ani s 7 parece estar asociada con la AGA, no siendo sólo un marcador capaz de diferenciar esta entidad de la UC+, sino también un factor que podría tener su implicación en la protección de la urticaria crónica.

### **3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN ANISAKIOSIS GASTROALÉRGICA Y EN LA FORMA DE URTICARIA CRÓNICA ASOCIADA**

*A. simplex* es un nematodo parásito, presente en gran cantidad de pescados ingeridos en nuestra dieta. Los humanos no formamos parte de su ciclo biológico, por lo que somos considerados como meros hospedadores accidentales. Dada la nula adaptación de este helminto al ser humano, no es capaz de sobrevivir más de unas horas, como mucho unos días, en nuestro organismo, lo cual no impide que desencadene diferentes fenotipos de urticaria, tanto aguda (AGA) como crónica (UC+), dado el potencial alergénico de sus proteínas excretoras/secretoras (Daschner y Pascual, 2005; Daschner *et al.*, 2010c).

Estudios anteriores, realizados en pacientes infectados por distintas especies de nematodos, observaron que la respuesta inmunológica tipo Th<sub>2</sub> inhibe la respuesta tipo Th<sub>1</sub> y Th<sub>17</sub> inmunológica inicial. Esta respuesta Th<sub>2</sub> frente a los helmintos, está caracterizada por la liberación de las citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Allen y Maizels, 2011), lo que disminuye el perfil proinflamatorio de la respuesta inmunológica. La inducción de la producción de las diferentes citoquinas es uno de los mecanismos propuestos que participan en la modulación de la respuesta inmunológica del hospedador por los helmintos parásitos (Steel y Nutman, 2003). En la revisión realizada por Basso *et al.* (2009), defienden una dicotomía existente entre las células Th<sub>17</sub> y T reguladoras, siendo ambas activadas por TGF-β en presencia y ausencia, respectivamente, de la citoquina proinflamatoria IL-6. Gaze *et al.* (2012) encontraron una fuerte respuesta Th<sub>2</sub> producida por los antígenos de *Ancylostoma*, con alguna evidencia de una respuesta Th<sub>1</sub> sistémica, pero no en mucosa, ya que se encuentra inhibida por la presencia de IL-10 y TGF-β. No encontraron evidencias de una respuesta Th<sub>17</sub>.

La respuesta inmunitaria hacia los helmintos está mediada por la misma subpoblación de células que en las reacciones alérgicas, la Th<sub>2</sub> (Santiago y Nutman, 2016). Schramm *et al.* (2016), describieron una mayor proporción de células Th<sub>2</sub> en niños con asma, acompañado por un aumento de la IL-4, una disminución del IFN-γ, sin modificaciones en los niveles de TNF-α ni de IL-17, aunque el tipo de respuesta inmunológica dependerá de las características del antígeno.

Ma *et al.* (2014) defendieron la importancia de una respuesta inmunológica de tipo Th<sub>1</sub> en las etapas más tempranas de la infección por la larva de *Echinococcus multilocularis* y de la respuesta Th<sub>2</sub> en etapas más tardías, observando que, en una etapa intermedia de la infección, cuando los antígenos ya son suficientemente bajos, la respuesta

inmunológica se desvía hacia un perfil Th<sub>2</sub>, entrando en la fase crónica de la infección. Durante la fase temprana, el IFN- $\gamma$ , asociado a la respuesta Th<sub>1</sub>, es capaz de inhibir el desarrollo de la respuesta Th<sub>2</sub>. La respuesta Th<sub>1</sub>, junto con la Th<sub>17</sub>, tienen un papel en el aclaramiento del parásito. El IFN- $\gamma$  aumenta durante los primeros tres meses de la infección y luego disminuye, momento en el que se observan niveles elevados de citoquinas Th<sub>2</sub>. La IL-4 permanece a niveles bajos durante los dos primeros meses de la infección, aumentando al tercer mes. Esta citoquina es producida por las células Th<sub>2</sub> activadas, estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B, inhibiendo la proliferación celular y la respuesta Th<sub>1</sub> y disminuye los niveles de IFN- $\gamma$ . Las citoquinas Th<sub>2</sub> están asociadas con el crecimiento y la persistencia del parásito y facilita su evasión del sistema inmunológico.

Panzer *et al.* (2012), desarrollaron un modelo murino en el que observaron que en las células de los ratones estimuladas con un antígeno de *Nippostrongylus brasiliensis*, las subpoblaciones Th<sub>1</sub> y Th<sub>17</sub>, podían convertirse fácilmente en células tipo Th<sub>2</sub>, lo que suponía una desaparición de la producción de las citoquinas propias de estas subpoblaciones, IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente, y la expresión de IL-4, lo que explicaría la correlación inversa entre la infección por los helmintos y la protección frente a los desórdenes autoinmunes. Este efecto no se observó en el caso de las células T reguladoras.

A pesar de que la urticaria crónica ha sido etiquetada, en la mayoría de los casos, como de origen idiopático o autoinmune, al menos un porcentaje de la misma ha sido relacionado con un contacto previo con la larva viva de *A. simplex* (UC+) y, por tanto, se encuentra vinculado con los hábitos de consumo de pescado (Kolkhir *et al.*, 2016). Estudios previos de perfiles de citoquinas en la urticaria crónica han demostrado un predominio de la respuesta inmunológica de tipo Th<sub>0</sub> o un perfil mixto Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> (Ferrer *et al.*, 2002), aunque otros estudios han demostrado un aumento de la respuesta Th<sub>17</sub> y una desviación del equilibrio Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> hacia un perfil Th<sub>2</sub>, promoviendo la degranulación de los mastocitos, la producción de IgE y el daño tisular (Moy *et al.*, 2016).

En nuestro estudio, evaluamos los niveles de las citoquinas en muestras de sueros humanos, que, aunque previsiblemente bajos, existe la posibilidad de que su presencia en la circulación sanguínea pueda deberse a una amplificación de la inflamación de un proceso crónico inflamatorio, como es la urticaria crónica (Caproni *et al.*, 2004; Tedeschi *et al.*, 2006; Kasperska-Zajac *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2008). El hallazgo de menores niveles de citoquinas circulantes podría deberse a su rápido metabolismo, por lo que se llevó a cabo la determinación en los sobrenadantes obtenidos de la incubación de células mononucleares de sangre periférica, con antígeno larvario de *A. simplex* o con el mitógeno Concanavalina A (Con A). Los sueros utilizados procedieron de tres grupos de

pacientes: pacientes con urticaria crónica sensibilizados a *A. simplex* (UC+), pacientes con urticaria aguda sensibilizados a este mismo nematodo (AGA) y pacientes con urticaria, sin sensibilización a *A. simplex* (UC-).

Los niveles de citoquinas determinados en los sueros de los pacientes, fueron muy inferiores a los determinados en los sobrenadantes, siendo prácticamente inexistentes, en algunos casos. Se encontraron cantidades significativamente más elevadas de las citoquinas IL-17 y TGF- $\beta$ , en el suero de los pacientes con AGA que en los sueros de los pacientes UC+ y UC-. Los niveles de IL-6 en estos pacientes, se encontraron más elevados en los pacientes con sensibilización a *A. simplex* (AGA y UC+), que en los individuos sin contacto previo con este parásito (UC-), aunque no fueron estadísticamente significativos. Basso *et al.* (2009) revisan que, la respuesta tipo Th<sub>2</sub>, propia de la infección por helmintos, produce niveles elevados de IL-2, la cual disminuye los niveles de IFN- $\gamma$ , propios de la respuesta inmunológica tipo Th<sub>1</sub> y responsable de la regulación negativa de las células Th<sub>17</sub>, lo que, junto con el aumento en la producción de TGF- $\beta$  e IL-6, provoca mayores cantidades de IL-17.

Al comparar los niveles de las citoquinas determinadas en los sobrenadantes de las células incubadas con antígeno larvario y con Con A, observamos que, de forma general, son más elevados tras la estimulación con mitógeno que tras la estimulación con antígeno, con una única excepción, los niveles de IL-2 fueron significativamente más elevados tras la estimulación con antígeno larvario en los pacientes con AGA, que tras la estimulación con Con A.

La IL-2 tiene un papel fundamental en el crecimiento y la supervivencia de las subpoblaciones Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, demostrando así, con estos niveles significativamente más elevados en los sobrenadantes de las células estimuladas con extracto crudo de *Anisakis*, la potencia del extracto utilizado y asegurando así, la estimulación específica de las células de los pacientes, lo que garantiza la inducción de las respuestas inmunológicas, por lo que los valores obtenidos con otras citoquinas se podrían interpretar como una inhibición de su producción, propia de la parasitación por *A. simplex* (Cuéllar *et al.*, 2010). Esta citoquina, además, es la principal estimuladora de la producción de IgE, fundamental para el desarrollo de una respuesta inmunológica tipo Th<sub>2</sub>, respuesta característica de las reacciones alérgicas y de las infecciones helmínticas (Basso *et al.*, 2009). Pese a que no existen evidencias alergológicas que demuestren que la detección de IgE, o la respuesta celular frente a diversos alérgenos, esté relacionada con la aparición de sintomatología clínica alérgica, ya que su presencia puede deberse simplemente a la inmunidad parasitaria (Caraballo *et al.*, 2016). Algunos autores, como Gonzalez-Muñoz *et al.* (2010), asociaron la presencia de mayores niveles de IgE y de citoquinas IL-4 e IL-5 con la sintomatología asociada a la reacción de tipo alérgica

(angioedema-urticaria o anafilaxia), producida por *A. simplex*, independientemente de si el extracto de este nematodo con el que estimularon los cultivos de células era extracto crudo larvario, o extracto termoestable.

Los pacientes con AGA, tras repetidos y numerosos, aunque breves contactos con la larva viva de *A. simplex* desarrollan una reacción inmunológica muy potente capaz de expulsar a la larva y de dar lugar a una urticaria aguda acompañada de manifestaciones alérgicas y gastrointestinales, junto con niveles elevados de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10. Por otro lado, en los pacientes con UC+, en los cuales los contactos con este parásito son menos numerosos, aunque más duraderos en el tiempo, desarrollan una respuesta inmunológica mediada por mayores niveles de citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ .

Algunos estudios han relacionado el perfil de citoquinas con el número de contactos con los helmintos parásitos. Abdel-Ghaffar *et al.* (2015) observaron en un modelo murino que las ratas infectadas por *A. simplex* producían niveles más elevados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 e IL-17, lo que se relacionaba con un aumento de IgE. Estos niveles de IgE eran aún mayores tras una segunda infección. Así mismo, Alcântara-Neves *et al.* (2014) desarrollaron un estudio en el que observaron que el mayor número de contactos helmínticos potenciaba la liberación de mediadores de las reacciones alérgicas, como la IgE. Caraballo *et al.* (2016) resumieron numerosos estudios, llegando a la conclusión de que, en función de la presencia del poliparasitismo por varios nematodos, diversas respuestas inmunológicas pueden no solo ser estimuladas, sino que pueden ser capaces de modificar los efectos de los alérgenos de los helmintos en poblaciones tropicales.

Turner *et al.* (2008), observaron que la potenciación de la producción de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$  en niños africanos, estaba directamente relacionada con la carga de helmintos intestinales y que, las infecciones crónicas producidas por estos parásitos, jugaban un importante papel en los mecanismos inmunorreguladores humanos, disminuyendo la incidencia de enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas y asma. Esta regulación del sistema inmunológico fue más acusada en aquellos pacientes con parasitismos helmínticos múltiples y con fuertes cargas parasitarias, que la producida por el helminto *per se*.

Dentro de los sobrenadantes de las células estimuladas con antígeno larvario, encontramos que los pacientes sensibilizados a *A. simplex* (AGA y UC+) tenían niveles más elevados de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que los pacientes sin sensibilización frente a este parásito. Resultados similares fueron encontrados por Arndts *et al.* (2012), quienes analizaron los niveles de citoquinas en sobrenadantes de pacientes parasitados

con microfilarias de *Wuchereria bancrofti*, obteniendo niveles más elevados de IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ .

Curiosamente, los pacientes con una sensibilización previa a este nematodo (AGA y UC+) presentaron niveles más elevados de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ , sobre todo en aquellos pacientes que manifestaron una urticaria de tipo agudo (AGA).

Los niveles de IL-4 en este estudio fueron significativamente más elevados en los pacientes sensibilizados a *A. simplex* (AGA y UC+), y dentro de estos, los que desarrollaron una reacción de tipo agudo (AGA).

Previamente, se ha demostrado que los niveles de IL-4 se encuentran elevados en el suero de los pacientes con urticaria crónica (Ferrer *et al.*, 2002), aunque las medianas de las concentraciones fueron muy bajas, inferiores a 1 pg/ml. En nuestro estudio, probablemente como consecuencia de la baja sensibilidad de nuestros métodos, los niveles de IL-4 en suero fueron prácticamente indetectables, aunque, curiosamente, tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con antígeno de *A. simplex* y con Con A, observamos niveles significativamente más elevados de esta citoquina en los pacientes con AGA que en pacientes con urticaria crónica (UC+ y UC-), lo que está en concordancia con lo defendido por Basso *et al.* (2009), acerca de que la infección por helmintos desencadena fuertes reacciones de tipo Th<sub>2</sub>, mediadas por IgE, cuya producción está estimulada por IL-4. Los bajos niveles encontrados en UC+ podrían deberse a las mayores cantidades de IFN- $\gamma$  detectadas. Araujo *et al.* (2015) encontraron niveles significativamente elevados de IL-4 en pacientes infectados por *Toxocara canis*, mientras que no encontraron ninguna significación en la expresión de otras citoquinas en estos pacientes, ni tampoco en los pacientes infectados con *Ascaris suum*, aunque sólo por ese aumento de IL-4 defienden la polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil Th<sub>2</sub>.

Turner *et al.* (2008) observan una relación inversa entre la mayor producción de IL-10 y TGF- $\beta$  en las infecciones por helmintos y la IL-4 producida por la respuesta tipo Th<sub>2</sub>.

Estudios previos acerca de las citoquinas proinflamatorias circulantes en la urticaria crónica han sido altamente dispares. Mientras en un estudio, las citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL12p70 e IL-6 se han visto elevadas en la mayoría de los pacientes con urticaria crónica (Dos Santos *et al.*, 2008), en otro estudio no ha podido encontrarse ninguna evidencia detectable de TNF- $\alpha$  en suero (Tedeschi *et al.*, 2006). Aunque en un estudio anterior, realizado por nuestro grupo con determinaciones en muestras séricas (Daschner *et al.*, 2011), los resultados obtenidos no fueron consistentes con este

hallazgo con respecto a TNF- $\alpha$  e IL-6. En este estudio realizado por Daschner *et al.*, (2011) se observaron niveles significativamente más elevados de IL-6 en los UC+ que en los AGA y los UC-, tras la estimulación de las células mononucleares periféricas con mitógeno, y niveles significativamente más elevados de TNF- $\alpha$  en AGA que en UC+, en los sobrenadantes de células estimuladas con antígeno larvario de *A. simplex*. El hecho de que el TNF- $\alpha$  sea capaz de inducir la liberación de mediadores por parte de los mastocitos de la piel, subraya la posibilidad de ser la causa y no el efecto de la urticaria crónica.

La IL-6 puede ser producida por los mastocitos; se ha especulado que un incremento en el número de estas células, como sucede en la piel de los pacientes con UC, puede derivar en un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, incluyendo la IL-6 (Nettis *et al.*, 2001). En nuestros resultados observamos que los niveles de IL-6 en sobrenadantes estimulados con mitógenos son significativamente más elevados que los encontrados en sobrenadantes estimulados con antígeno. Además, se detectaron niveles superiores de esta citoquina en los pacientes UC+ que en los AGA y en los UC-, siendo significativa esta diferencia en los estimulados con mitógeno. Los bajos niveles de IL-6 encontrados en los pacientes con AGA, pueden deberse a que, según lo observado por Ma *et al.* (2014) en un modelo de infección por *E. multilocularis*, los niveles máximos de esta citoquina se encontraban participando en la inflamación aguda, transcurridos dos días desde la infección, por lo que en el caso de los pacientes con AGA ya se habría metabolizado. Según estos mismos autores, si el sistema inmunológico no es capaz de eliminar los parásitos del organismo humano, entonces la infección, se cronifica.

Los niveles séricos de IL-10 no han sido previamente asociados con la urticaria crónica, aunque hay dos estudios que han evaluado la producción de esta citoquina. En uno de ellos, desarrollado por Piconi *et al.* (2002), la producción de IL-10, junto con la producción de TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  y RANTES, fue más elevada tras la estimulación con fitohemaglutinina. En el otro estudio, desarrollado por Dos Santos *et al.* (2008), en los pacientes con urticaria crónica y prueba de *Autologous Serum Skin Test (ASST)* positiva también se vieron incrementados los niveles de IL-10 tras la estimulación con mitógeno. En nuestro estudio, los niveles de esta citoquina detectados en suero fueron bastante bajos, no encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes. Sin embargo, al estudiar los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de células mononucleares periféricas, estimuladas con antígeno larvario, observamos una producción significativamente más elevada en los pacientes AGA que en los UC+ y los UC- y, en el caso de las células estimuladas con mitógeno, los niveles fueron significativamente más elevados en UC+ que en UC-. La IL-10 es una citoquina inmunorreguladora asociada con

la infección por helmintos, por lo que nuestros resultados concuerdan con los determinados anteriormente (Metenou *et al.*, 2010; Caraballo *et al.*, 2016).

En un estudio desarrollado por Cooper *et al.* (2015) en el que comparaban la producción de citoquinas en niños procedentes de población urbana y rural en países tropicales, se encontraron niveles más elevados de IL-10 en los niños urbanos, hecho que podría explicarse por una mayor prevalencia de la infección por el helminto, *Ascaris lumbricoides*, lo que también se encuentra en concordancia con nuestros resultados. Anuradha *et al.* (2015) observaron un incremento de IL-10 y TGF- $\beta$  en pacientes infectados con *Strongyloides stercoralis*, considerando la IL-10 como una citoquina con un papel fundamental en la regulación de la respuesta Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> y Th<sub>17</sub>, no así TGF- $\beta$ , quien tiene un papel mínimo en esta regulación. La IL-10, en el estudio desarrollado por Alcântara-Neves *et al.* (2014) está asociada con una inhibición de las reacciones de hipersensibilidad en la piel, lo que podría ser uno de los motivos por lo que la urticaria es de tipo agudo en esta patología. Gabrie *et al.* (2016), observaron que, los niveles más elevados de IL-10 se encontraban en los niños parasitados con *A. lumbricoides*, pero éstos eran independientes de la intensidad de la infección. Metenou *et al.* (2010), observaron que el incremento de los niveles de IL-10 en los pacientes parasitados con filarias, estaba relacionado con el establecimiento de una fase crónica de la infección, consiguiendo evadir la respuesta inmunológica desencadenada frente a estos parásitos.

Por otro lado, hemos observado niveles más elevados de IFN- $\gamma$  en los UC+ que en los AGA y en los UC-, siendo las diferencias con estos últimos, estadísticamente significativas. En un estudio realizado por Dige *et al.* (2016), se observó que la polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil Th<sub>2</sub>, disminuía la respuesta tipo Th<sub>1</sub>, provocando una disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  en los pacientes parasitados por el helminto, *Trichuris trichiura*. Nuestros resultados difieren con los observados por Bourke *et al.* (2013), quienes observaron que los niveles de las citoquinas IL-13 y TNF- $\alpha$ , asociadas con la inmunopatología inducida por los huevos de *Schistosoma*, así como las citoquinas Th<sub>1</sub> (IFN- $\gamma$  e IL-12p70) tendían a ser menores en los pacientes infectados de forma crónica. Hay que tener en cuenta, al comparar estos dos estudios que la parasitación por *A. simplex* en ninguna de las dos patologías, AGA y UC+, es un parasitismo crónico, por lo que la respuesta inmunológica puede diferir de la desarrollada por otros helmintos. Además, Gabrie *et al.* (2016) observaron que los niveles de IFN- $\gamma$  estaban inversamente relacionados con la intensidad de la infección por *A. lumbricoides*. Otros autores tampoco encontraron niveles de IFN- $\gamma$  en los pacientes infectados con helmintos, como Gaze *et al.* (2012) y George *et al.* (2013).

Los niveles de TGF- $\beta$  observados por nosotros fueron significativamente más elevados en los pacientes sin sensibilización a *Anisakis* (UC-), al contrario de lo defendido por

Caraballo *et al.* (2016), quienes observan que las infecciones por helmintos van acompañadas por un aumento, entre otras, de esta citoquina. TGF- $\beta$  es un polipéptido multifuncional implicado en la regulación de una variedad de procesos celulares, entre otros, se encarga de inhibir los mecanismos de diferenciación de Th<sub>1</sub> y de Th<sub>2</sub> (Wilson y Maizels, 2004; Schmidt-Weber *et al.*, 2007). En nuestro estudio observamos que los niveles de TGF- $\beta$  detectados en los sueros de los pacientes AGA fueron significativamente más elevados que en los UC-. La infección crónica por helmintos ha sido asociada con una mayor producción de citoquinas antiinflamatorias (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002). El parasitismo por *A. simplex* en humanos sólo es agudo, ya que las larvas de tercer estadio no son capaces de completar su ciclo de vida en este hospedador accidental, pero este contacto con los humanos tiene una característica especial: mientras que la reacción alérgica aguda se produce únicamente por la larva viva de tercer estadio, los pacientes están continuamente expuestos a otros antígenos de *A. simplex* mientras continúan consumiendo de forma frecuente pescado parasitado. Por lo tanto, podría ser interesante explorar, además, la posibilidad de que existe una estimulación continua por algunos antígenos o mediadores liberados por *A. simplex*, los cuales podrían dirigir la regulación positiva del TGF- $\beta$  (Correale y Farez, 2009).

Según Ma *et al.* (2014), el TGF- $\beta$  sufre un incremento en las etapas intermedias de la infección por *E. multilocularis*, siendo más acusado en la etapa crónica. Observan que el aumento de esta citoquina, está asociada con los niveles de IL-17, proponiendo un posible papel en la diferenciación de las células Th<sub>17</sub>.

Nuestro resultado más interesante y significativo fueron los bajos niveles de IL-17 en el suero de los pacientes con UC+ y UC-, comparados con el de los pacientes con AGA. A raíz de estos resultados, podemos dilucidar que no es el hecho de un episodio de parasitismo previo como en AGA y UC+, lo que está asociado con los niveles de IL-17, sino que está asociado, mas bien, con la actividad de la urticaria presente en el momento de la toma la muestra de suero. Al evaluar los resultados obtenidos tras la estimulación de los leucocitos con antígeno y mitógeno, observamos niveles más elevados en AGA y UC+ que en UC-, resultado que podría ser debido a que la IL-17 está asociada con la actividad de la enfermedad y los pacientes con UC+ desarrollan una actividad de la enfermedad significativamente más baja que los pacientes UC-. Hasta ahora, ningún estudio ha reportado una disminución de los niveles de esta citoquina en la urticaria crónica. Curiosamente, el posible papel regulador de esta citoquina en la urticaria crónica podría estar disminuido por el hecho de que disminuyen sus niveles.

Algunos autores han asociado la respuesta inmunológica Th<sub>17</sub> con la severidad de las distintas enfermedades, como es el caso de los pacientes con rinitis alérgica (Li *et al.*, 2014) o con artritis reumatoide (Serrano Hernández, 2009), mediante la liberación de

grandes cantidades de IL-17, una de las citoquinas con mayor efecto proinflamatorio. Aunque otros como Schramm *et al.* (2016) no encontraron diferencias significativas en los niveles de esta citoquina, entre los pacientes con y sin sensibilización a pólenes, debido probablemente al bajo número de individuos del grupo control estudiados.

Debemos ser cuidadosos al interpretar los niveles séricos de estas citoquinas, ya que estos no reflejan necesariamente una disminución de la producción ya que podría estar produciéndose un aumento en su consumo. Además, un estudio llevado a cabo por Piconi *et al.* (2002) mostró una producción simultánea elevada de IL-10 y TNF- $\alpha$  y esta producción de IL-10 se interpretó como secundaria al intento de bloquear la reacción inflamatoria. Conjuntamente, parece que la disminución de los niveles de IL-17, se produce por su consumo durante el proceso inflamatorio y esto, posiblemente, se encuentre asociado con la actividad de la enfermedad.

Si resumiéramos nuestros resultados más significativos, el análisis de las muestras de suero no es suficiente para dar información acerca de una posible desviación de la respuesta Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub>, pero sí muestra una disminución de los niveles séricos de IL-10 e IL-17 en la urticaria crónica, especialmente en los pacientes UC-, siendo ambas citoquinas, marcadores representativos de un mecanismo inmunorregulatorio distinto. Además, el contacto previo con *A. simplex* está asociado con niveles elevados de TGF- $\beta$ .

Nuestros resultados demuestran que una infección previa por *A. simplex*, es capaz de modular no sólo las citoquinas de los patrones Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, sino también las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-17, así como la liberación de IL-10, tal y como se demuestra por la estimulación con el antígeno. A pesar de estos hallazgos, sería necesario realizar un estudio de la inhibición producida en una estimulación conjunta con antígeno de *A. simplex* y mitógeno, con el fin de demostrar la inmunomodulación inducida por los antígenos del parásito.

Como conclusión final, las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-6 se vieron incrementadas tras la estimulación con antígeno de *A. simplex* en los pacientes de AGA y UC+. La producción de la citoquina antiinflamatoria, IL-10, fue mayor en AGA que en UC+, mientras que la producción de la citoquina proinflamatoria, IFN- $\gamma$ , fue mayor en UC+ que en AGA. En otras palabras, el fenotipo AGA produjo una mayor respuesta antiinflamatoria que UC+, que produjo mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias.

#### **4.- DIFERENCIAS EN LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE PESCADO Y EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA CON O SIN SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL PARÁSITO DEL PESCADO *Anisakis simplex***

Nuestros resultados confirman la existencia de diferencias clínicas e inmunológicas entre los grupos UC+ y UC-, independientemente de la presencia de IgE específica. Una de las diferencias observadas fue que los pacientes UC+ eran de mayores que los UC-, lo que concuerda con los resultados hallados en estudios previos, en los que se observó que la sensibilización y el parasitismo producido por *A. simplex* estaban asociados con los hábitos de consumo de pescado crudo (en nuestra región, boquerones en vinagre) en poblaciones de mayor edad. No podemos descartar que esta urticaria, ya sea en su fenotipo agudo o crónico, aparezca, como en otras alteraciones inmunológicas, como consecuencia de haber superado un determinado umbral alcanzado por la acumulación de contactos con los antígenos de *A. simplex* (Daschner *et al.*, 2010b). Al sólo haber incluido en nuestro grupo de UC+, a aquellos pacientes que presentan IgE frente al antígeno Ani s 7 y que, por tanto, han sufrido un parasitismo previo, los diferentes patrones de edad confirman que este parasitismo previo es, realmente, al menos uno de los factores desencadenantes de la aparición de UC+.

El reconocimiento de este alérgeno es suficiente para probar la existencia de un episodio parasitario previo, ya que no se ha demostrado que la presencia de panalérgenos conocidos, como las tropomiosinas y paramiosinas procedentes de otras fuentes, y que tienen su homólogo en Ani s 2 y Ani s 3, sean capaces de provocar reacciones cruzadas de significancia clínica tras el parasitismo por *A. simplex*, por lo que su determinación no fue incluida dentro de los objetivos de este estudio (Daschner *et al.*, 2012). Los hábitos de ingesta de pescado crudo han sido asociados tanto con la sensibilización frente a *A. simplex* y la AGA, así como con la UC+ (Puente *et al.*, 2008; Daschner *et al.*, 2010a). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en cuanto a la frecuencia del consumo de pescado crudo (boquerones en vinagre), pero este resultado podría ser discutido mediante dos argumentos: primero, el bajo número de pacientes estudiados y segundo, la alarma social producida por las infecciones por *A. simplex* en las últimas décadas, que ha dado lugar al establecimiento de determinadas medidas legales y ha producido un fuerte impacto en la población con respecto a la preparación y consumo del pescado crudo.

Un estudio previo demostró que la ingesta de pescado crudo era el principal factor de riesgo para la producción de IgE frente a *A. simplex*, más incluso que la ingesta total de pescado (Puente *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que la ingesta total de pescado está asociada con UC+, comparando con UC-. Esto se debe a que existe una mayor probabilidad de contacto con la larva viva producida por el segundo factor de

riesgo, el pescado poco cocinado, que conlleva la aparición de niveles detectables de IgE (Daschner *et al.*, 1998; Daschner *et al.*, 2000).

Otro dato interesante es que la cantidad de pescado graso ingerida se encuentre asociada, de forma independiente, con UC-. Además, el *Urticaria Activity Score (UAS)* depende tanto de la cantidad, como del tipo de pescado ingerido. Una posibilidad que explicaría que el *UAS* esté positivamente correlacionado con la ingesta de pescado graso es la ya conocida presencia de aminas biógenas, fundamentalmente en el pescado graso, que son parcialmente responsables de la UC- y de su severidad (Moneret-Vautrin, 2003). Por otro lado, se ha demostrado que la ingesta de pescado graso está asociada con una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  (Piconi *et al.*, 2002; Kasperska-Zajac *et al.*, 2011), un hecho que puede no coincidir con una evaluación transversal de estos datos. Pero, independientemente, de los hábitos de ingesta de pescado, la producción de citoquinas parece seguir la misma dirección contradictoria, con un *UAS* correlacionado con mayores cocientes IL-10/IL-17 e IL-10/IFN- $\gamma$ , inducidos por Con A, así como con un cociente IL-10/TNF- $\alpha$  inducido por *A. simplex*.

De forma similar, la producción de IL-10 estimulada por mitógenos, ha sido verificada en estudios previos, implicando a pacientes con urticaria crónica (Piconi *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2008). No pudimos verificar que la producción de IL-6 esté asociada con la severidad de la urticaria, como había sido propuesto en otro estudio (Kasperska-Zajac, 2011). Pero la asociación negativa entre el *UAS* y el cociente TGF- $\beta$ /IL-6 inducido por *A. simplex* en UC-, implica el posible papel de dichas citoquinas. Aquí, la IL-6 podría ser interpretada como un marcador de inflamación sistémica, así como un marcador de la patología en la urticaria crónica (Kasperska-Zajac, 2011). Por otro lado, en el eje antiinflamatorio/proinflamatorio, el TGF- $\beta$  podría estar implicado en el control de la reacción inflamatoria, disminuyendo el *UAS*. No debemos olvidar que, en nuestro estudio, no estamos utilizando una población control, por lo que nuestros resultados serán específicos cuando analicemos la urticaria crónica.

¿Cómo podemos interpretar estos datos? Como hemos visto, tanto la producción de citoquinas proinflamatorias, como de citoquinas antiinflamatorias, se encuentra correlacionada en ambas de manera considerable, cuando estimulamos con el mismo agente. Por tanto, parece ser que, en la urticaria crónica, el factor significativo que conlleva un desarrollo de la actividad de la urticaria se ha perdido en nuestro análisis y sólo se detectan los epifenómenos asociados a la estimulación inmunológica. Los procesos biológicos están marcados por una tendencia estable que busca la regulación del desequilibrio existente, como es el producido en el caso de la inflamación. Por tanto, es posible que encontremos asociaciones, como en este caso, que parezcan

contradictorias, pero que sean suficientemente buenas cuando citoquinas con propiedades antagonistas se encuentran en el mismo eje, como es la asociación con un UAS mayor *versus* menor.

Tal y como esperábamos, la producción de citoquinas inducidas por *A. simplex* es mayor en los pacientes con UC+, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa a nivel de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Es muy interesante observar que no sólo los niveles de IL-4 asociados a respuestas Th<sub>2</sub> son mayores aquí, sino que también lo son los niveles de IFN- $\gamma$  asociados a respuestas Th<sub>1</sub>. La AGA en humanos, así como el parasitismo agudo en modelo murino, están asociados con una respuesta simultánea tanto de tipo Th<sub>1</sub> como Th<sub>2</sub>, lo que concuerda con nuestros resultados (Perteguer y Cuéllar, 1998; Daschner *et al.*, 2002; Baeza *et al.*, 2005). Pero también varias citoquinas inducidas por la estimulación con Con A se ven aumentadas en los pacientes UC+, con resultados significativos para la IL-6 y la IL-10.

Esto es interesante porque refleja una mayor activación generalizada de las células secretoras de citoquinas en pacientes con un parasitismo previo, no sólo frente a un estímulo específico, sino también frente a uno inespecífico. Por lo tanto, en pacientes que han sufrido un parasitismo activo previo, sus células, tras haber sido estimuladas *in vivo* con antígenos específicos, serán específicamente estimuladas *in vitro* con los antígenos del parásito, generando una respuesta Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> típica de las infecciones helmínticas. Previamente, otros autores, al igual que nosotros, habían demostrado este tipo de respuestas, tanto en modelos humanos, como en modelos animales (Perteguer y Cuéllar, 1998; Daschner *et al.*, 2002; Baeza *et al.*, 2005). Por otro lado, aunque la ingesta total de pescado fue mayor en pacientes UC+, la de pescado graso fue menor. Por lo tanto, podríamos hipotetizar que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3 podría ser menor en pacientes UC+ y, debido a ello, sus efectos antiinflamatorios se verían reducidos.

Los valores de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-17, y TGF- $\beta$  fueron similares en ambos fenotipos de urticaria crónica, tanto tras una estimulación específica, como inespecífica. Se ha observado un aumento de TNF- $\alpha$  en piel en diferentes tipos de urticaria (Hermes *et al.*, 1999). El incremento de TNF- $\alpha$ , así como la producción de IL-10, han sido detectados también en pacientes con urticaria crónica idiopática (Piconi *et al.*, 2002). Además, el TNF- $\alpha$  está significativamente aumentado en el suero de pacientes con urticaria crónica idiopática y constituye uno de los factores implicados en las lesiones dérmicas que aparecen en la urticaria crónica, acompañado por una mayor secreción de IL-17 cuando eran ASST+ (Dos Santos *et al.*, 2008). El TGF- $\beta$ , que tiene tanto efectos positivos como negativos sobre la función y supervivencia de los mastocitos, ha sido propuesto como una citoquina pro y antiinflamatoria (Park *et al.*, 2008). Un estudio previo mostró que el

aumento de los niveles séricos circulantes de TGF- $\beta$  estaba asociado al fenotipo crónico de la urticaria en sujetos sensibilizados frente a *A. simplex* (Daschner *et al.*, 2011). Al no ser nosotros capaces de demostrar diferencias en los niveles de esta citoquina entre los grupos UC+ y UC-, podemos deducir que es posible que los niveles circulantes de TGF- $\beta$  no reflejen la producción local.

Por tanto, se puede argumentar que, en la urticaria crónica, el parasitismo previo no tiene un efecto detectable sobre aquellas citoquinas que, como ya se sabía con anterioridad, son producidas en grandes cantidades, mientras que las citoquinas del perfil Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> son estimuladas por *Anisakis* en la UC+, y las anti/proinflamatorias, IL-10 e IL-6, son estimuladas inespecíficamente en la UC-.

La relevancia clínica de UC+, como una entidad diferenciada, ha sido más que demostrada mediante la medida del efecto clínico e inmunológico de una dieta libre de pescado, lo que también significa una ausencia de contacto con los productos de *A. simplex*.

Inesperadamente, la mejoría en la UC+ no estuvo asociada con la dieta. De hecho, se ha visto el efecto contrario: aquellos pacientes que continuaban consumiendo pescado tuvieron un menor valor de UAS. Nuestros resultados muestran una compleja relación entre los hábitos de consumo de pescado, la producción de citoquinas y el pronóstico, que puede extrapolarse a todo el grupo de pacientes con urticaria crónica. La mejoría no sólo está relacionada con mantener el consumo de pescado, sino que también está relacionada con su hábito de consumo previo, sobretodo de pescado graso, ya que la ingesta de pescado total tiene el efecto contrario. La mejoría también mostró una asociación significativa con los altos cocientes generados en la producción inicial de citoquinas anti/proinflamatorias. En la UC+, el aumento de la producción de TGF- $\beta$  se observó en aquellos pacientes que mostraron una mejoría, mientras que en el caso de los pacientes UC-, se observó en aquellos que mostraron un aumento en el perfil de citoquinas proinflamatorias y una disminución en la producción de TGF- $\beta$ .

Estos resultados arrojan luz sobre la producción de citoquinas y sus posibles propiedades anti o proinflamatorias, así como sobre su influencia sobre el UAS dependiendo del fenotipo de urticaria estudiado y, posiblemente, de otros muchos factores. En conjunto, los posibles factores que afectan clínica e inmunológicamente al fenotipo estudiado de urticaria crónica, así como al pronóstico con y sin dieta, no sólo dependerán del contacto con los productos de *A. simplex*, sino que dependerán también de otros factores asociados con los hábitos de consumo de pescado, que de nuevo afectarán a la relación de citoquinas pro y antiinflamatorias.

Como conclusión, podemos proponer el fenotipado de la urticaria crónica en función de la presencia de un parasitismo previo, en el que se asocia una compleja interacción de *A. simplex* con el balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> y el balance de citoquinas pro y antiinflamatorias (IL-10/TGF-β - IL-17/IL-6), modulado también por la ingesta de pescado. Todo esto, además de estar asociado con el fenotipo de urticaria crónica, también lo estará con el pronóstico y el resultado obtenido tras recomendar una dieta libre de pescado.

En cuanto a la influencia de la dieta, no sólo podemos tener en cuenta evitar los factores estimulantes, sino que también debemos evaluar la posible pérdida de factores protectores. Cuando nos encontremos ante una sensibilización frente a *A. simplex*, los pacientes no deberían ser puestos automáticamente bajo una dieta libre de pescado con el fin de reducir el contacto con los productos de *A. simplex*. Estudios futuros podrían completar este análisis usando biomarcadores del consumo de pescado con el fin de enfatizar nuestros resultados en el cuestionario.

## 5.- ASOCIACIÓN POSITIVA ENTRE LA INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii* Y LA SEROPOSITIVIDAD FRENTE A *Anisakis simplex* EN PACIENTES CON URTICARIA CRÓNICA

Se observó una concordancia entre el porcentaje de seropositividad a *Toxoplasma gondii*, obtenido en este estudio mediante la determinación de IgG específica por ELISA, y el hallado en estudios previos, realizados en población europea (50% - 80%) (Hill y Dubey, 2002). La comparación de la prevalencia de la infección por *T. gondii* entre los pacientes de urticaria crónica y los individuos del grupo control, no mostró diferencias significativas. Al analizar la prevalencia de IgG anti-*T. gondii* con respecto al estatus de inmigrante, se observó un 70% de seropositividad. Este porcentaje fue mucho mayor que el 40,5% obtenido en el grupo de urticaria crónica. Hay que destacar que el 23,8% de los pacientes con diagnóstico de urticaria crónica del estudio eran inmigrantes latinoamericanos.

Esta elevada prevalencia de IgG anti-*T. gondii* observada en nuestro estudio en los pacientes inmigrantes, es similar a la obtenida por otros autores y se encuentra relacionada con la presencia de unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes en los países de procedencia de estos inmigrantes, fundamentalmente de clima tropical. Estudios previos han aportado datos significativos acerca de la alta seroprevalencia de *T. gondii* en Centro y Sur América (Montoya y Liesenfeld, 2004; Ramos *et al.*, 2011). Igualmente, Ramos *et al.* (2011) encontraron un 41,1% de positividad frente a *T. gondii* en un estudio realizado en España en inmigrantes embarazadas, frente a un 12% de positividad en españolas. Por tanto, podemos decir que los datos de seropositividad a *Toxoplasma*, en nuestros pacientes con urticaria crónica, van en paralelo con los datos previamente conocidos en población general.

Inesperadamente, hemos detectado en nuestro grupo de pacientes, la presencia de una asociación positiva entre la infección crónica frente a *T. gondii* y la existencia de un parasitismo previo por *A. simplex*. Así, el 58,82% de los sueros positivos con IgG frente a *T. gondii* también lo fueron frente a *A. simplex*, observándose, por tanto, un sinergismo entre ambos parásitos. Por tanto, existe la posibilidad de que la urticaria crónica se encuentre exacerbada cuando aparezcan, simultáneamente, anticuerpos específicos frente a *A. simplex* y *T. gondii*.

*A. simplex* es un nematodo parásito cosmopolita, capaz de producir reacciones alérgicas a través del consumo de pescado crudo o poco cocinado, parasitado por larvas viables (López-Serrano *et al.*, 2000; Alonso-Gómez *et al.*, 2004). Mientras que la fase de parasitismo agudo en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) está acompañada por una reacción de urticaria aguda, angioedema o anafilaxia, en el caso de la urticaria crónica

asociada con la sensibilización a *A. simplex* (UC+), no puede dilucidarse a partir de la historia clínica el momento en el cual se ha producido el parasitismo (Daschner *et al.*, 2000; 2010c). En cualquier caso, un parasitismo producido por este nematodo y prolongado en el tiempo no es posible en humanos, ya que la larva de tercer estadio solamente es capaz de sobrevivir en dicho hospedador unos pocos días. A pesar de la rápida expulsión de la larva del organismo del hospedador accidental en los pacientes diagnosticados de AGA, este contacto es capaz de generar una respuesta inmunológica tal, que permanecerán elevados los niveles de IgE específica y así como la positividad en la prueba cutánea (SPT) mucho tiempo después de que haya sido expulsada la larva (Daschner *et al.*, 2001).

Esto demuestra que, la respuesta inmunológica generada frente *A. simplex*, se corresponde con una respuesta tipo Th<sub>2</sub>, la cual es característica de los helmintos parásitos, a cuyo grupo pertenece *A. simplex*. Por otro lado, la infección producida por *T. gondii* genera una respuesta inmunológica tipo Th<sub>1</sub>, antes de cronificarse. Nuestros datos han demostrado que esta respuesta Th<sub>1</sub> estimulada por la infección por *T. gondii*, no es capaz de inhibir la respuesta Th<sub>2</sub> provocada por *A. simplex*. Para el establecimiento de la fase crónica de la infección, *T. gondii* induce la secreción de Leucotrieno A4, cuya potente acción antiinflamatoria disminuye la producción de IL-12 (Aliberti *et al.*, 2002). Estos bajos niveles de IL-12 podrían producir un incremento de las citoquinas Th<sub>2</sub> y, por lo tanto, un aumento de la presencia de reacciones alérgicas (Yazdanakhsh y Matricardi, 2004), como sucede tras la infección por *A. simplex*. Sin embargo, la respuesta Th<sub>2</sub> provocada por *A. simplex* es un mecanismo conservado durante la evolución que no puede considerarse como un marcador de atopia (Daschner y Cuéllar, 2010).

Por tanto, no se puede esperar que la infección producida por diferentes agentes infecciosos responsables del desarrollo de una respuesta inmunológica Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub>, sea lo suficientemente efectiva como para proteger al hospedador frente a una segunda infección. Janson *et al.* (2007) no encontraron ninguna asociación entre los niveles de anticuerpos IgG frente a *T. gondii*, *Helicobacter pylori* y el virus de la Hepatitis A, con los niveles de IgE total, en un grupo de sujetos procedentes de Islandia, Estonia y Suecia. De forma similar, Fernandes *et al.* (2010), no encontraron diferencias significativas en los niveles de IgE total, medidos en sujetos positivos y negativos a *T. gondii*, aunque los niveles de IgE total fueron significativamente más elevados en los individuos atópicos de ambos grupos. Matricardi *et al.* (2000) no encontraron diferencias en los niveles de IgE total entre los sujetos positivos y negativos a *T. gondii*, pero observaron diferencias en los niveles de IgE específica frente a alérgenos inhalados.

A raíz de estos datos, se propuso que los niveles de IgE total se encuentran controlados por mecanismos reguladores diferentes a los que regulan los niveles de IgE específica.

Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Seiskari *et al.* (2007), quienes encontraron una asociación positiva entre los niveles de IgE total y la positividad frente a *T. gondii* en pacientes procedentes de Finlandia y Rusia. Esta correlación podría ser una consecuencia de la polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil Th<sub>2</sub>, lo que provocaría una disminución de la respuesta Th<sub>1</sub>, lo cual tendría lugar durante la fase crónica de la toxoplasmosis. De acuerdo con esta explicación inmunológica, la asociación entre ambos parásitos, *Toxoplasma* y *Anisakis*, se encuentra relacionada tanto con factores ambientales como con hábitos alimenticios.

Apoyando esta hipótesis, Jones *et al.* (2008) postularon la existencia de una asociación entre los anticuerpos IgG anti-*T. gondii* e IgG anti-*Toxocara* debido a la utilización por ambos parásitos de la misma ruta de infección a través del suelo. En nuestro caso, la infección por *T. gondii* no es capaz de inhibir la atopia, de hecho, nuestros resultados mostraron una asociación entre la atopia y la infección por dicho parásito. Además de los bajos niveles de IL-12 detectados en la fase crónica de la toxoplasmosis (Yazdanbakhsh y Matricardi, 2004), otros autores han puesto de manifiesto el mismo efecto inducido por las células NK, que rápidamente liberaron IL-10 durante la fase aguda de la toxoplasmosis (Perona-Wright *et al.*, 2009).

Al estudiar la posible asociación entre la atopia y la infección por *T. gondii* hemos observado que tanto la atopia, como la sensibilización frente a *A. simplex* son variables independientes frente al riesgo de infección por *T. gondii*.

Hay que tener en cuenta que, aunque en los estudios realizados previamente, la sensibilización frente a *A. simplex* ha sido asociada con la sensibilización frente a los ácaros del polvo (Daschner *et al.*, 2008), en el estudio que hemos realizado, hemos considerado la presencia de atopia en función de la sensibilización al polen, no a los ácaros (Datos no mostrados). Nosotros hemos observado una asociación positiva cercana a la significación entre la positividad frente a *T. gondii* y la sensibilización frente al polen.

Pese a ello, en anteriores experimentos llevados a cabo en ratones BALB/c se ha observado que la infección con *T. gondii*, previa a la sensibilización con el alérgeno principal del polen del abedul (Bet v 1) provoca una disminución de los niveles de IgE específica frente al alérgeno Bet v 1, lo que se traduciría en que *T. gondii* posee propiedades inmunomoduladoras capaces de prevenir la aparición de reacciones alérgicas (Wagner *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos por nosotros, sugieren que la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de atopia en pacientes con urticaria crónica. Al compararlos en relación con lo propuesto por la hipótesis de la higiene, nuestros resultados se podrían interpretar como que la relación existente entre estos dos organismos analizados se encuentra asociada con un déficit en las condiciones higiénicas de los pacientes, lo que confiere tanto a *A. simplex* como a *T. gondii*, un posible papel antiinflamatorio. Estas observaciones están de acuerdo con el mejor pronóstico observado previamente, en los pacientes de urticaria crónica sensibilizados a *Anisakis* (UC+) al compararlos con los no sensibilizados (UC-) (Daschner y Pascual, 2005).

Las infecciones helmínticas han estado consideradas, en los países en vías de desarrollo, como un posible factor de protección frente a la atopia. Sin embargo, en el caso de la infección por *A. simplex*, las larvas únicamente son capaces de provocar un parasitismo agudo y esporádico, el cual es insuficiente para generar respuestas inmunorreguladoras suficientes para controlar y regular la aparición de atopia (Yazdanbakhsh y Matricardi, 2004).

Este estudio no se diseñó con el fin de evaluar las asociaciones descritas, previamente, en la población general, por lo que no podemos generalizar nuestros resultados y debemos interpretarlos en el contexto en el que se encuentran nuestros pacientes. Aunque la urticaria crónica no haya sido asociada con los fenotipos Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub> y aunque la proporción de seropositivos frente a *T. gondii* haya sido similar en el grupo control y el grupo de pacientes con urticaria crónica, no existe un conocimiento suficiente de los mecanismos inmunológicos asociados a esta patología con el fin de caracterizarla como una alteración inmunológica bien definida. Se ha asociado la presencia de niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , con la severidad de la enfermedad (Dos Santos *et al.*, 2008), así como con una posible alteración a nivel de la respuesta Th<sub>17</sub>/Treg, además de la Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> (Daschner *et al.*, 2011). Por lo tanto, no podemos descartar que estos fenotipos inmunológicos de urticaria crónica, aún no bien caracterizados, estén asociados con ambas respuestas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> desencadenadas frente a agentes infecciosos.

*T. gondii* pertenece, junto al virus de la Hepatitis A y a *H. pylori* al grupo de microorganismos de transmisión oral-fecal y a través del consumo de alimentos, que han sido asociados con una menor prevalencia de la atopia (Ellertsen *et al.*, 2008). En contraste, Bodner *et al.* (2000), Linneberg *et al.* (2003) y Janson *et al.* (2007) no observaron diferencias entre los porcentajes de positividad frente a *T. gondii* en los grupos de individuos diagnosticados como atópicos y no atópicos, estudiados en Islandia, Estonia, Suecia, Dinamarca y Escocia. Los resultados opuestos encontrados en

nuestro grupo de estudio toman un especial interés, ya que concretamente *H. pylori* es uno de los agentes infecciosos, que ha sido implicado en la etiología de la urticaria crónica (Wedi *et al.*, 1998). Por tanto, futuros estudios deberían focalizarse no sólo en la posible asociación entre los distintos agentes infecciosos y la urticaria crónica, sino también en la posibilidad de un diferente pronóstico (fundamentalmente, severidad y duración), y su relación con la distinta producción de citoquinas pro o antiinflamatorias (Bermudez *et al.*, 1993).

En conclusión, nuestros datos muestran una asociación positiva e independiente, entre la infección por *T. gondii* y el parasitismo por *A. simplex*, así como con el estado atópico en individuos con urticaria crónica.

## 6.- RELACIÓN ENTRE DIFERENTES PATÓGENOS CON VÍA DE TRANSMISIÓN ORAL Y LA URTICARIA CRÓNICA

Como hemos comentado en la introducción, *H. pylori* es una bacteria de elevada prevalencia a nivel mundial. Alrededor del 50% de la población global se encuentra infectada por este espirilo. En poblaciones menos desarrolladas o con unas condiciones higiénicas deficientes, este porcentaje puede verse aumentado hasta el 90% (Ek *et al.*, 2012). En nuestro estudio observamos también una prevalencia superior a la media, siendo de un 77,3% en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en los valores de IgG anti-*H. pylori* entre hombres y mujeres, ni en función de la edad (datos no mostrados).

La urticaria crónica es una enfermedad de origen desconocido, en la mayoría de los casos, aunque algunos estudios han demostrado una clara asociación con organismos patógenos, entre ellos, con *H. pylori*, por lo que, al continuar el trabajo comenzado anteriormente, en el que se evaluaba la relación entre la infección por *T. gondii* y por *A. simplex* con la urticaria crónica, introdujimos esta bacteria. Diversos estudios, descritos a continuación, han demostrado que la erradicación de este microorganismo, así como de otros agentes infecciosos como, por ejemplo, los helmintos, disminuyen e incluso llegan a eliminar los signos y síntomas de la urticaria crónica; es por ello por lo que evaluamos el papel de *H. pylori* sobre esta patología.

Así mismo, siguiendo lo establecido por la hipótesis de la higiene, se ha evaluado el efecto de la regulación del sistema inmunológico por esta bacteria en las reacciones alérgicas y en las enfermedades autoinmunes (Mortazavi *et al.*, 2015). Varios estudios han observado una inmunorregulación protectora por parte de *H. pylori* sobre la alergia, resultados que apoyan la hipótesis de la higiene, desarrollada por Strachan, en 1989. Así, Amberbir *et al.* (2011) desarrollaron un modelo en el que analizaron el papel de *H. pylori* sobre las reacciones alérgicas en niños etíopes, observando un papel protector por parte de *H. pylori* sobre las reacciones alérgicas. Von Hertzen *et al.* (2006) evaluaron las diferencias en los porcentajes de atopia en pacientes procedentes de Finlandia y de Rusia, observando una asociación entre el menor porcentaje de alteraciones atópicas en los rusos y la mayor prevalencia de varios organismos patógenos, aunque la estadística ya fue significativa tan sólo al incluir la infección por *H. pylori*. Seiskari *et al.* (2007) observaron una mayor prevalencia de las reacciones alérgicas asociadas con una menor prevalencia de anticuerpos frente a distintos microbios en individuos finlandeses, frente a los individuos procedentes de la Carelia rusa. Otros estudios tuvieron en cuenta el efecto acumulativo de la infección por varios patógenos, como el desarrollado por Janson *et al.* (2007), en el que evaluaron la influencia de las infecciones por *H. pylori*, *T. gondii*, virus de la Hepatitis A, virus *Herpes simplex*, *Chlamydia pneumoniae*, virus

*Epstein Barr* y *Cytomegalovirus*, sobre la atopia, el asma alérgico y la rinitis en adultos procedentes de Islandia, Suecia y Estonia, observando que una alta carga infecciosa protegía frente a estas patologías, independientemente de la forma de transmisión, oro-fecal o aérea, aunque, necesariamente, el número de microorganismos debía de ser superior a tres para que apareciera el efecto protector.

El 93,9% de los pacientes de urticaria crónica, incluidos en nuestro estudio, mostraron anticuerpos IgG específicos de *H. pylori*, frente a un 77,3% observado en el grupo control. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre los dos grupos, hay que resaltar que el porcentaje fue muy superior en el grupo de urticaria crónica teniendo en cuenta el porcentaje tan elevado de positivos que aparece en población presuntamente sana. Akelma *et al.* (2015) desarrollaron un estudio prospectivo, aleatorizado en el que se estudió el efecto de la administración de un tratamiento para la erradicación de *H. pylori* en pacientes infectados con esta bacteria, con y sin síntomas gastrointestinales, y con urticaria crónica, observando que, en los pacientes tratados, la urticaria crónica desaparecía en la totalidad de los niños y en un 83,3% de los adultos. Sin embargo, Rasooly *et al.* (2015) recogieron una asociación entre la urticaria crónica y la infección por *H. pylori* en aquellos casos en los que se producían de forma simultánea, la gastritis asociada con *H. pylori* y la urticaria crónica, afirmando que al menos un 10% de los pacientes con urticaria crónica, padecía una infección aguda por *H. pylori*.

Así mismo, Bruscky *et al.* (2013) estudiaron el caso de una adolescente con urticaria crónica refractaria a los tratamientos convencionales y con síntomas gastrointestinales, a la que se administró un tratamiento para erradicar *H. pylori*, desapareciendo los síntomas de la urticaria crónica.

Como ya se indicado, en nuestro estudio encontramos una relación entre los valores de IgG anti-*H. pylori* y la presencia de urticaria crónica, siendo los valores de NTU/ml más elevados en este grupo [120,9 (59,74 - 157,13)] comparado con el grupo control [64,32 (30,27 - 121,23)], por lo que nuestros resultados están de acuerdo con aquellos que afirman que la infección crónica por *H. pylori* está positivamente asociada con la urticaria crónica. Además, observamos que tan sólo el 6,1% de los pacientes con urticaria crónica fueron negativos a esta bacteria, mientras que en el grupo control, este porcentaje fue del 22,7% ( $P = 0,025$ ).

Ciertos estudios, como el desarrollado por Janson *et al.* (2007), evaluaron la posible relación de una infección por varios organismos patógenos en la regulación del sistema inmunológico. Según lo defendido en la hipótesis de la higiene (Strachan, 1989), la exposición a agentes infecciosos durante la infancia, ayudaba al sistema inmunológico a

desarrollarse, produciendo una respuesta adecuada a estas infecciones y disminuyendo las alteraciones alérgicas, inflamatorias y autoinmunes asociadas con un desequilibrio en la respuesta Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>, y con una incorrecta estimulación y desarrollo de las células T reguladoras. En varios de estos estudios se incluyeron *T. gondii* y *A. simplex*, ya evaluados en nuestro trabajo previo, incluido en el capítulo anterior de esta sección de Discusión, y *H. pylori*, entre otros muchos agentes infecciosos, como ya se ha indicado previamente. Hemos seleccionado esta bacteria para incluirla en nuestro estudio por la facilidad diagnóstica, por el hecho de pertenecer a un grupo de organismos diferentes y por la elevada cantidad de bibliografía referente a la regulación del sistema inmunológico de la que es responsable. Algunos de los estudios en lo que se ha evaluado la modulación del sistema inmunológico mediante la coinfección por distintos patógenos, helmintos, *H. pylori*, etc.: Abruzzo y Fried (2011), recogieron varios estudios en los que se analizaba la influencia de la infección por *Schistosoma* spp. y por otros organismos helmintos, protozoos o bacterias, entre otros *H. pylori*, observando que en humanos la infección por *Schistosoma* ejercía un papel protector sobre la infección por *H. pylori*, disminuyendo la severidad de la gastritis (Abou Holw *et al.*, 2008) y disminuyendo las respuestas serológicas asociadas con un menor riesgo de desarrollar atrofia gástrica (Elshal *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2006). Utilizaron tanto *S. japonicum* como *S. mansoni*, obteniendo resultados similares. En cambio, un estudio realizado en modelo murino, mostró un aumento de la patología gástrica en aquellos ratones coinfectados (Elsaied *et al.*, 2009).

Al evaluar en nuestro estudio el efecto de la coinfección por *A. simplex* y *H. pylori* sobre los pacientes con urticaria crónica, observamos que existe un efecto sinérgico sobre la presencia de urticaria crónica. El porcentaje de positivos frente a ambos organismos patógenos fue del 50% en el grupo de urticaria crónica y del 4,5% en el grupo control ( $P = 0,001$ ). La asociación entre estos dos patógenos ya ha sido estudiada por otros autores como Toro *et al.* (2006), quienes no encontraron mejoría en los síntomas de los pacientes en los que se había erradicado *H. pylori* y presentaban niveles de IgE anti-*A. simplex*; por otro lado, Fernando *et al.* (2001) encontraron que otro nematodo, *A. lumbricoides*, desencadenaba una reacción inmunológica protectora frente a *H. pylori* en un grupo de pacientes procedente de una población urbana en África. La explicación inmunológica que dan a sus resultados es la polarización hacia una respuesta tipo Th<sub>2</sub>, asociada a la parasitación por *A. lumbricoides*, que inhibiría la respuesta tipo Th<sub>1</sub>, mediadora de la patología gástrica producida por *H. pylori*. Aunque podríamos pensar que esta asociación positiva entre estos dos patógenos se debe a una característica común en su modo de transmisión, ya que uno, *A. simplex*, se transmite a través del consumo de pescado crudo o poco cocinado y el otro, *H. pylori*, a través de la vía fecal-oral (Ek *et al.*, 2012).

En un estudio anterior, Jones *et al.* (2008), observaron que existía una asociación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* y los de anticuerpos IgG anti-*Toxocara*, por tener una ruta común de transmisión. En las poblaciones estadounidenses fronterizas con México, Cardenas *et al.* (2010), observaron una mayor prevalencia de *H. pylori* y *Taenia* spp. En nuestro caso, al comparar el efecto de la coinfección por estos dos patógenos sobre los individuos con urticaria crónica, junto con la coinfección también por *T. gondii*, observamos que el porcentaje de positividad a estos tres agentes en los pacientes con urticaria crónica, es la mitad que el porcentaje de pacientes positivos a la coinfección por los dos primeros, a pesar de ello, el porcentaje de positivos a los tres organismos infecciosos continua siendo significativamente más elevado en el grupo de urticaria crónica (27,3%) al compararlo con el grupo control (4,5%) ( $P = 0,031$ ).

Ek *et al.* (2012), desarrollaron un estudio en el que compararon el impacto de la infección por *A. lumbricoides* y de *T. gondii* sobre la infección por *H. pylori*, en dos poblaciones de Colombia con distinta localización y características geográficas, observando una asociación entre los elevados niveles de IgG anti-*A. lumbricoides* y el aumento de la respuesta antiinflamatoria mediada por IgG<sub>1</sub>-Th<sub>2</sub> frente a *H. pylori*, tanto en individuos positivos como en negativos a *T. gondii*, aunque se observó que, siendo el nivel de significación de la asociación entre la positividad a *A. lumbricoides* y la positividad a *H. pylori* de  $P < 0,01$  en los pacientes negativos a *T. gondii*, esta  $P$ , aun siendo significativa, disminuía a un nivel de  $P < 0,05$  en pacientes seropositivos a *T. gondii*, resultado en concordancia al obtenido en nuestro estudio al observar que la infección por *T. gondii*, disminuye la significación de la implicación de *A. simplex* y de *H. pylori* sobre la urticaria crónica.

Varios estudios se han centrado en evaluar la relación de estos patógenos con las alteraciones alérgicas, en el contexto de la hipótesis de la higiene. Así, numerosos estudios han demostrado la existencia de una regulación del sistema inmunológico por parte de *H. pylori* con el fin de conseguir su supervivencia en el hospedador humano, mediante el establecimiento de una infección crónica, lo que, al producir una estimulación de las células T reguladoras, disminuye las alteraciones alérgicas asociadas con una respuesta tipo Th<sub>2</sub>.

Así, Lee *et al.* (2014) observaron una relación negativa entre la infección por *H. pylori* y los niveles de IgE asociados con una reacción alérgica en adultos coreanos; Lim *et al.* (2016) encontraron también una asociación negativa entre la infección por esta bacteria y la presencia de asma en adultos menores de 40 años. También se ha asociado de forma negativa la infección crónica establecida por *H. pylori* con enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Kira, 2015; Pedrini *et al.*, 2015). Sin embargo, en una revisión realizada por Ma *et al.* (2016) no encontraron evidencias del papel de *H. pylori*

en las alergias alimentarias. Teye *et al.* (2015) afirman que, aunque la infección por *H. pylori* disminuye en un 18% la atopía, aún quedan pendientes estudios acerca de los mecanismos subyacentes; afirmación también defendida por Lionetti *et al.* (2014) tras su meta-análisis sobre la relación entre *H. pylori* y la atopía.

Sitaraman (2015) quiere resaltar el hecho de que, aunque la infección por *H. pylori* está claramente asociada con el cáncer gástrico la terapia debería ser personalizada en función de cada caso, en el contexto de la hipótesis de la higiene. Kalali *et al.* (2014) también defienden que hay que tener en cuenta, a la hora de erradicar *H. pylori*, las consecuencias inesperadas que puedan aparecer sobre la prevalencia del asma. Kyburz y Müller (2016) recogen en un resumen la importancia de la composición y de la diversidad de la flora intestinal en el desarrollo de las reacciones alérgicas.

Varios estudios demostraron que la presencia de *H. pylori* produce una inmunorregulación que promueve el establecimiento de una infección crónica y un papel protector frente a las alteraciones alérgicas. En el caso de la urticaria crónica, vemos que esta asociación es contraria a la encontrada en las alergias, estando positivamente asociadas la infección por esta bacteria y la presencia de urticaria crónica: esto puede deberse a que la urticaria crónica no es una patología mediada solo por la acción de la IgE (Fine y Bernstein, 2016), por lo que no puede asociarse con la hipótesis de la higiene, ya que los mecanismos inmunológicos implicados son diferentes.

El efecto potenciador de la infección por *H. pylori* sobre la urticaria crónica, como ya hemos comentado anteriormente, ha sido estudiado por numerosos autores (Bruscky *et al.*, 2013; Campanati *et al.*, 2013; Khan, 2014; Akelma *et al.*, 2015; Rasooly *et al.*, 2015; Dionigi *et al.*, 2016). A pesar de que, en la mayoría de los casos, la urticaria crónica está producida por causas desconocidas, considerándose por ello idiopática, los mecanismos son comunes, así, se sabe que es una enfermedad mediada por los mastocitos (Zuberbier *et al.*, 2014). Los mastocitos epiteliales son activados por la unión de la IgE, lo que desencadena la liberación de mediadores químicos como la histamina, el factor activador de plaquetas y las citoquinas, causando la aparición de ronchas y angioedema. La piel afectada por las ronchas tiene un infiltrado perivascular mixto de neutrófilos y/o eosinófilos, macrófagos y linfocitos T, sin necrosis ni daño. Entre un 30% y un 50% de los pacientes con urticaria crónica, producen anticuerpos IgG específicos frente la subunidad  $\alpha$  del receptor de IgE de los mastocitos, y entre un 5% y un 10%, producen anticuerpos frente a la IgE (Bernstein *et al.*, 2014).

Arnold *et al.* (2012) recogieron que los efectos beneficiosos sobre las alteraciones alérgicas e inflamatorias crónicas estaban mediadas por células T reguladoras y células

dendríticas tolerogénicas. Robinson *et al.* (2008), realizaron un estudio en el que observaron que, aquellos pacientes infectados por *H. pylori* que era sintomáticos, tenían menor expresión de células T reguladoras, responsables de la producción de IL-10, y un aumento de las respuestas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, mientras que, aquellos pacientes asintomáticos, mostraron una elevada presencia de células T reguladoras y, por tanto, de IL-10, asociada a una mayor cantidad de bacterias, lo que se demostró a través de un estudio realizado *in vitro*, en el que se observó que la IL-10 inhibía la expresión de IL-8 y del factor nuclear de activación  $\kappa\beta$ , inducidos por *H. pylori* en las células epiteliales gástricas y aumentaba el crecimiento de *H. pylori*.

*VI-CONCLUSIONES*

## VI- CONCLUSIONES

1. El uso de los alérgenos recombinantes de *Anisakis*, Ani s 1 y Ani s 7, es útil para el diagnóstico diferencial de las alteraciones alérgicas, asociadas a *Anisakis simplex*. La Anisakiosis gastroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada a la sensibilización a *A. simplex* (UC+), tienen un perfil distinto de reconocimiento frente al alérgeno Ani s 1.
2. Los resultados obtenidos permiten cuestionar la definición de Ani s 1 como alérgeno principal, mientras que confirman la ya reportada inmunodominancia de Ani s 7, que ha demostrado ser un fuerte marcador de infecciones previas por *A. simplex*.
3. El uso combinado de las determinaciones de IgE frente a Ani s 1 y Ani s 7 es, actualmente, la mejor opción en términos de especificidad y sensibilidad para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana, ya que este método, proporciona el 100% de sensibilidad en pacientes diagnosticados de AGA.
4. La IgG<sub>4</sub>, específica del alérgeno Ani s 7, es producida tras un parasitismo repetido, con la urticaria aguda como una característica limitada en el tiempo y exclusiva del cuadro clínico de la AGA, no siendo sólo un marcador capaz de diferenciar esta entidad de la UC+, sino también un factor que podría tener su implicación en la protección de la urticaria crónica.
5. La infección previa por *A. simplex* es capaz de modular, no sólo las citoquinas de los patrones Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, sino también las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-17, así como la liberación de IL-10. El fenotipo AGA produjo una mayor respuesta antiinflamatoria que el UC+, que produjo mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias.
6. Se demuestra la compleja interacción de *A. simplex* con el balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> y el balance de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IL-10/TGF- $\beta$  - IL-17/IL-6), modulado también por la ingesta de pescado.
7. En cuanto a la influencia de la dieta, no sólo podemos tener en cuenta evitar los factores estimulantes, sino que también debemos evaluar la posible pérdida de factores protectores, por lo que los pacientes no deben ser, automáticamente,

puestos bajo una dieta libre de pescado para reducir el contacto con los productos de *A. simplex*.

8. Nuestros datos muestran una asociación positiva e independiente, entre la infección por *Toxoplasma gondii* y el parasitismo por *A. simplex*, así como con el estado atópico en individuos con urticaria crónica.
  
9. Al evaluar el efecto de la coinfección por *A. simplex* y *Helicobacter pylori* sobre los pacientes con urticaria crónica, observamos que existe un efecto sinérgico sobre la presencia de urticaria crónica. La infección por *T. gondii*, disminuye la significación de la implicación de *A. simplex* y *H. pylori* sobre la urticaria crónica.

## *VII-BIBLIOGRAFÍA*

## VII-BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse, R.C., Stapel, S.O., Schuurman, J., Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin. Exp. Allergy*. 39, 469-77.
- Abdel-Ghaffar, F., Badr, A.M., Morsy, K., Ebead, S., El Deeb, S., Al Quraishy, S., Mehlhorn, H. (2015). Cytokine signature and antibody-mediated response against fresh and attenuated *Anisakis simplex* (L3) administration into Wistar rats: implication for anti-allergic reaction. *Parasitol. Res.* 114, 2975-2984.
- Abou Holw, S.A., Anwar, M.M., Bassiouni, R.B., Hussien, N.A., Eltaweel, H.A. (2008). Impact of coinfection with *Schistosoma mansoni* on *Helicobacter pylori* induced disease. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 38, 73-84.
- Abruzzi, A., Fried, B. (2011). Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with Bacteria, Protozoa and Helminths. *Adv. Parasitol.* Volume 77 # Elsevier Ltd.
- Akao, N., Ohyama, T., Kondo, K. (1990). Immunoblot analysis of serum IgG, IgA and IgE responses against larval excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex* in patients with gastric anisakiasis. *J. Helminthol.* 64, 310-8.
- Akdis, C.A., Blesken, T., Wymann, D., Akdis, M., Blaser, K. (1998). Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG<sub>4</sub> responses by conformational antigen variants. *Eur. J. Immunol.* 28, 914-25.
- Akelma, A.Z., Cizmeci, M.N., Mete, E., Tufan, N., Bozkurt, B. (2015). A neglected cause for chronic spontaneous urticaria in children: *Helicobacter pylori*. *Allergol. Immunopathol.* 43, 259-63.
- Alcântara-Neves, N.M., de S G Britto, G., Veiga, R.V., Figueiredo, C.A., Fiaccone, R.L., da Conceição, J.S., Cruz, A.A., Rodrigues, L.C., Cooper, P.J., Pontes-de-Carvalho, L.C., Barreto, M.L. (2014). Effects of helminth coinfections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *B.M.C. Res. Notes.* 7, 817.
- Aliberti, J., Serhan, C., Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* 196, 1253-1262.
- Allen, J.E., Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375-388.
- Alonso, A., Daschner, A., Moreno-Ancillo, A. (1997). Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. *N. Engl. J. Med.* 337, 350-351.
- Alonso, A., Moreno-Ancillo, A., Daschner, A., López-Serrano, M.C. (1999). Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy*. 54, 517-520.
- Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M., Suarez-de-Parga, J., Daschner, A., Caballero, M., Barranco, P., Cabañas, R. (2004). *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitol. Res.* 93, 378-38.
- Amberbir, A., Medhin, G., Erku, W., Alem, A., Simms, R., Robinson, K., Fogarty, A., Britton, J., Venn, A., Davey, G. (2011). Effects of *Helicobacter pylori*, geohelminth infection and selected commensal bacteria on the risk of allergic disease and sensitization in 3-year-old Ethiopian children. *Clin. Exp. Allergy*. 41, 1422-30.
- Anadón, A.M., Romarís, F., Escalante, M., Rodríguez, E., Gárate, T., Cuéllar, C., Ubeira, F.M. (2009). The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin. Exp. Immunol.* 156, 471-478.
- Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, M.T., Cuéllar, C., Romarís, F., Chivato, T., Rodero, M., González-Díaz, H., Ubeira, F.M. (2010). Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 496-502.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F. Jr., Stadecker, M.J., Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975-87.

- Anuradha, R., Munisankar, S., Dolla, C., Kumaran, P., Nutman, T.B., Babu, S. (2015). Parasite Antigen-Specific Regulation of Th1, Th2, and Th17 Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection. *J. Immunol.* 195, 2241-50.
- Añíbarro, B., Seoane, F.J. (1998). Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 102, 331-332.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos). Evaluación de la presencia de nematodos del genero *Anisakis* en los pescados de acuicultura marina españoles. (2012).
- Araujo, Z., Brandes, S., Pinelli, E., Bochichio, M.A., Palacios, A., Wide, A., Rivas-Santiago, B., Jiménez, J.C. (2015). Seropositivity for ascariasis and toxocarosis and cytokine expression among the indigenous people in the Venezuelan delta region. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 57, 47-55.
- Arduoso, D.D., Quince, S., Díez, M.L., Cuevas, M., Eiras, P., Sánchez, M., Sanz, S., Losada, E. (1996). Hipersensibilidad inmediata al parásito del pescado *Anisakis simplex*. Estudio de reactividad cruzada. *Rev. Esp. Alergol. Immunol. Clin.* 2, 280-286.
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J.M., Gil, F.J., Vega, J., Arranz, M.L., Martínez, C. (1998). Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 831-834.
- Arndts, K., Deininger, S., Specht, S., Klarmann, U., Mand, S., Adjobimey, T., Debrah, A.Y., Batsa, L., Kwarteng, A., Epp, C., Taylor, M., Adjei, O., Layland, L.E., Hoerauf, A. (2012). Elevated adaptive immune responses are associated with latent infections of *Wuchereria bancrofti*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 6, e1611.
- Arnold, I.C., Hitzler, I., Müller, A. (2012). The immunomodulatory properties of *Helicobacter pylori* confer protection against allergic and chronic inflammatory disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 10.
- Asaishi, K., Nishino, C., Ebata, T., Totsuka, M., Hayasaka, H., Suzuki, T. (1980). Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. 1. Immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva. *Gastroenterol. Jpn.* 15, 120-127.
- Asaishi, K., Nishino, C., Totsuka, M., Hayasaka, H., Suzuki, T. (1980). Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. 2. Epidemiologic study of inhabitants and questionnaire survey in Japan. *Gastroenterol. Jpn.* 15, 128-134.
- Asturias, J.A., Eraso, E., Martínez, A. (2000). Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 263-267.
- Atmadja, A.K., Atkinson, R., Sartono, E., Partono, F., Yazdanbakhsh, M., Maizels, R.M. (1995). Differential decline in filaria-specific IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>4</sub>, and IgE antibodies in *Brugia malayi*-infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 172, 1567-72.
- Audicana, M.T., Fernández de Corres, L., Muñoz, D., Fernández, E., Navarro, J.A., del Pozo, M.D. (1995). Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 96, 558-560.
- Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., de Corres, L.F., Kennedy, M.W. (2002). *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trends. Parasitol.* 18, 20-25.
- Audicana, M.T., Kennedy, M.W. (2008). *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 360-379.
- Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 347, 911-20.
- Baeza, M.L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., de Barrio, M., Herrero, T., Santaolalla, M., Zubeldia, J.M. (2004). Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clin. Exp. Allergy.* 34, 296-302.
- Baeza, M.L., Conejero, L., Higaki, Y., Martín, E., Pérez, C., Infante, S., Rubio, M., Zubeldia, J.M. (2005). *Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 433-40.
- Barbuzza, O., Guarneri, F., Galtieri, G., Gangemi, S., Vaccaro, M. (2009). Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis.* 60, 239-240.

- Basso, A.S., Cheroutre, H., Mucida, D. (2009). More stories on Th17 cells. *Cell. Res.* 19, 399-411.
- Bermudez, L.E., Covaro, G., Remington, J. (1993). Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* 61, 4126-4130.
- Bernardini, R., Mistrello, G., Novembre, E., Roncarolo, D., Zanotta, S., Lombardi, E., Cianferoni, A., Pucci, N., De Martino, M., Vierucci, A. (2005). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis simplex* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18, 671-5.
- Bernstein, J.A., Lang, D.M., Khan, D.A., Craig, T., Dreyfus, D., Hsieh, F., Sheikh, J., Weldon, D., Zuraw, B., Bernstein, D.I., Blessing-Moore, J., Cox, L., Nicklas, R.A., Oppenheimer, J., Portnoy, J.M., Randolph, C.R., Schuller, D.E., Spector, S.L., Tilles, S.A., Wallace, D. (2014). The diagnosis and management of acute and chronic urticaria: 2014 update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1270-7.
- Bingham, C.O. (2008). Immunomodulatory approaches to the management of chronic urticaria: an immune-mediated inflammatory disease. *Curr. Allergy Asthma R.* 8, 278-87.
- Blaxter, M.L. Nematodes (Nematoda), in *The Timetree of Life*. (2009). Hedges, S.B., Kumar, S. Eds. Oxford University Press: New York. 247-250.
- Bodner, C., Anderson, W.J., Reid, T.S., Godden, D.J. (2000). Childhood exposure to infection and risk of adult onset wheeze and atopy. *Thorax* 55, 383-387.
- Bourke, C.D., Nausch, N., Rujeni, N., Appleby, L.J., Mitchell, K.M., Midzi, N., Mduluza, T., Mutapi, F. (2013). Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* 208, 159-169.
- Bruscky, D.M., da Rocha, L.A., Costa, A.J. (2013). Recurrence of chronic urticaria caused by reinfection by *Helicobacter pylori*. *Rev. Paul. Pediatr.* 31, 272-5.
- Caballero, M.L., Moneo, I., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M., Casado, I., Rodríguez-Pérez, R. (2008). Isolation of Anisakis 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol. Res.* 103, 1231-1233.
- Caballero, M.L., Umpierrez, A., Moneo, I., Rodriguez-Perez, R. (2011). Anisakis 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. *Parasitol. Int.* 60, 209-212.
- Campanati, A., Gesuita, R., Giannoni, M., Piraccini, F., Sandroni, L., Martina, E., Conocchiaro, L., Bendia, E., Di Sario, A., Offidani, A. (2013). Role of small intestinal bacterial overgrowth and *Helicobacter pylori* infection in chronic spontaneous urticaria: a prospective analysis. *Acta. Derm. Venereol.* 93, 161-4.
- Caproni, M., Cardinali, C., Giomi, B., Antiga, E., D'Agata, A., Walter, S., Fabbri, P. (2004). Serological detection of eotaxin, IL-4, IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TARC and IP-10 in chronic autoimmune urticaria and chronic idiopathic urticaria. *J. Dermatol. Sci.* 36, 57-9.
- Caraballo, L., Acevedo, N. (2011). New Allergens of Relevance in Tropical Regions: The Impact of *Ascaris lumbricoides* Infections. *World Allergy Organ. J.* 4, 77-84.
- Caraballo, L., Zakzuk, J., Lee, B.W., Acevedo, N., Soh, J.Y., Sánchez-Borges, M., Hossny, E., García, E., Rosario, N., Ansotegui, I., Puerta, L., Sánchez, J., Cardona, V. (2016). Particularities of allergy in the Tropics. *World Allergy Organ. J.* 9, 20.
- Cardenas, V.M., Mena, K.D., Ortiz, M., Karri, S., Variyam, E., Behraves, C.B., Snowden, K.F., Flisser, A., Bristol, J.R., Mayberry, L.F., Ortega, Y.R., Fukuda, Y., Campos, A., Graham, D.Y. (2010). Hyperendemic *H. pylori* and tapeworm infections in a U.S.-Mexico border population. *Public Health Rep.* 125, 441-7.
- Caubet, J.C., Bencharitwong, R., Moshier, E., Godbold, J.H., Sampson, H.A., Nowak-Węgrzyn, A. (2012). Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG (4) ratios in egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 739-47.
- Chen, Y., Blaser, M.J. (2008). *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J. Infect. Dis.* 198, 553-60.
- Cooper, P.J. (2009). Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9, 29-37.

- Cooper, P.J., Amorim, L.D., Figueiredo, C.A., Esquivel, R., Tupiza, F., Erazo, S., Oviedo, Y., Vaca, M., Chico, M.E., Barreto, M.L. (2015). Effects of environment on human cytokine responses during childhood in the tropics: role of urban versus rural residence. *World Allergy Organ. J.* 8, 22
- Correale, J., Farez, M. (2009). Helminth antigens modulate immune responses in cells from multiple sclerosis patients through TLR2- dependent mechanisms. *J. Immunol.* 183, 5999-6012.
- Cuéllar, C., Perteguer, M.J., De Las Heras, B. (1998). Effects of *Anisakis simplex* on nitric oxide production in J774 macrophages. *Scand. J. Infect. Dis.* 30, 603-606.
- Cuéllar, C., Perteguer, M.J., Rodero, M. (2001). Presence of IL-4-like molecules in larval excretory-secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex*. *Scand. J. Immunol.* 53, 483-488.
- Cuéllar, C., Rodero, M., Daschner, A. (2010). Inhibition of cytokine production in gastro-allergic anisakiasis and *Anisakis simplex* sensitization-associated chronic urticaria. *Parasite Immunol.* 32, 528.
- Cuéllar, C., Daschner, A., Valls, A., De Frutos, C., Fernández-Figares, V., Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, T., Rodero, M., Ubeira, F.M. (2012). Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct *Anisakis simplex*-associated allergic clinical disorders. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 283-288.
- Cullinan, P., Harris, J.M., Newman Taylor, A.J., Jones, M., Taylor, P., Dave, J.R., Mills, P., Moffat, S.A., White, C.W., Figg, J.K., Moon, A.M., Barnes, M.C. (2003). Can early infection explain the sibling effect in adult atopy? *Eur. Respir. J.* 22, 956-61.
- Daniels, J.J.H.M. (1962). De eosinofiele flegmone van het maagdarmkanaal veroorzaakt door de haringworm. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 106, 131-132.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Caballero, T., Suárez-De-Parga, J.M., López-Serrano M.C. (1999). Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clin. Exp. Allergy.* 29, 1260.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J.M., López-Serrano, M.C. (2000). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 176-181
- Daschner, A., Cuéllar, C., Alonso-Gómez, A., Pascual, C.Y., Martín-Esteban, M. (2001). Serum CD23 is not altered in gastroallergic anisakiasis, but correlates with the production of specific IgE and the amount of polyclonal stimulation. *Allergy.* 56, 1003-1007.
- Daschner, A., Cuéllar, C., Sánchez-Pastor, S., Pascual, C.Y., Martín-Esteban, M. (2002). Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasite Immunol.* 24, 243-251.
- Daschner, A., Vega de la Osada, F., Pascual, C.Y. (2005). Allergy and parasites reevaluated: wide-scale induction of chronic urticaria by the ubiquitous fish-nematode *Anisakis simplex* in an endemic region. *Allergol. Immunopathol.* 33, 31-7.
- Daschner, A., Pascual, C. (2005). *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 281-2
- Daschner, A., Cuéllar, C., Valls, A. (2008). Towards a differential definition of atopy: *Anisakis simplex* and the relationship between parasites and arthropods in respiratory allergy. *Parasite Immunol.* 30, 417-424.
- Daschner, A., De Frutos, C., Valls, A., de la Osada, F.V. (2010a). Different clinical presentation of *Anisakis simplex* associated urticaria is dependent on the frequency of raw fish intake. *Allergol. Immuno-pathol.* 38, 166-16
- Daschner, A., Rodero, M., De Frutos, C., Valls, A., Cuéllar, C. (2010b). Chronic urticaria is associated with a differential helminth-arthropod-related atopy phenotype. *J. Dermatol.* 37, 780-5.
- Daschner, A., De Frutos, C., Valls, A., Vega, F. (2010c). *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria: short-lived immediate type or prolonged acute urticaria. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 625-629.
- Daschner, A., Cuéllar, C. (2010). The hidden sense of symptoms: urticaria can be beneficial. *Med. Hypotheses.* 75, 623-626.

- Daschner, A., Rodero, M., De Frutos, C., Valls, A., Vega, F., Blanco, C., Cuéllar, C. (2011). Different serum cytokine levels in chronic vs. acute *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria. *Parasite Immunol.* 33, 357-362.
- Daschner, A., Cuéllar, C., Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends Parasitol.* 28, 9-15.
- Daugule, I., Zavoronkova, J., Santare, D. (2015). *Helicobacter pylori* and allergy: Update of research. *World J. Methodol.* 5, 203-11.
- De Ley, P. (2006). A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook.* 1-8.
- Deardorff, T.L., Fukumura, T., Raybourne, R.B. (1986). Invasive anisakiasis. A case report from Hawaii. *Gastroenterol.* 90, 1047-50.
- Deardorff, T.L., Altman, J., Nolan, C.M. (1987). Human anisakiasis: two case reports from the state of Washington. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 54, 274-275.
- del Pozo, M.D., Moneo, I., de Corres, L.F., Audicana, M.T., Muñoz, D., Fernandez, E., Navarro, J.A., García, M. (1996). Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 977.
- Desowitz, R.S., Raybourne, R.B., Ishikura, H., Kliks, M.M. (1985). The radioallergosorbent test (RAST) for the serological diagnosis of human anisakiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 256.
- Dige, A., Rasmussen, T. K., Nejsum, P., Hagemann-Madsen, R., Williams, A. R., Agnholt, J., Dahlerup, J.F., Hvas, C. L. (2016). Mucosal and systemic immune modulation by *Trichuris trichiura* in a self-infected individual. *Parasite Immunol.* 1-8.
- Dionigi, P.C., Menezes, M.C., Forte, W.C. (2016). A prospective ten-year follow-up of patients with chronic urticaria. *Allergol. Immunopathol.* 44, 286-91.
- Domínguez Ortega, J., Martínez-Cócera, C. (2000). Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergol. Immunol. Clín.* 15, 267-272.
- Dos Santos, J.C., Azor, M.H., Nojima, V.Y., Lourenço, F.D., Prearo, E., Maruta, C.W., Rivitti, E.A., da Silva Duarte, A., Sato, M.N. (2008). Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1433-1440.
- Du, Y., Agnew, A., Ye, X.P., Robinson, P.A., Forman, D., Crabtree, J.E. (2006). *Helicobacter pylori* and *Schistosoma japonicum* co-infection in a Chinese population: helminth infection alters humoral responses to *H. pylori* and serum pepsinogen I/II ratio. *Microbes Infect.* 8, 52-60.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. (2010). *EFSA Journal.* 8, 1543-1634.
- Ek, C., Whary, M.T., Ihrig, M., Bravo, L.E., Correa, P., Fox, J.G. (2012). Serologic evidence that *Ascaris* and *Toxoplasma* infections impact inflammatory responses to *Helicobacter pylori* in Colombians. *Helicobacter.* 17, 107-15.
- Ellertsen, L.K., Hetland, G., Lovik, M. (2008). Specific IgE to respiratory allergens and IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Streptococcus pneumoniae* in Norwegian military recruits. *Scand. J. Immunol.* 67, 496-500.
- Elsaied, N.A., Abbas, A.T., El-Beshbishi, S.N., Elsheikha, H.M. (2009). Increased *Helicobacter pylori*-associated pathology in outbred mice coinfecting with schistosomiasis. *Parasitol. Res.* 105, 297-9.
- Elshal, M.F., Elsayed, I.H., El Kady, I.M., Badra, G., El-Refaei, A., El-Batanony, M., Hendy, O.M. (2004). Role of concurrent *S. mansoni* infection in *H. pylori*-associated gastritis: a flow cytometric DNA-analysis and oxyradicals correlations. *Clin. Chim. Acta.* 346, 191-8.
- Evaluación de la presencia de nematodos del genero *Anisakis* en los pescados de acuicultura marina españoles. (2012). Secretaría General del Mar del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino del Gobierno de España.
- Fernandes, J.F., Taketomi, E.A., Mineo, J.R., Miranda, D.O., Alves, R., Resende, R.O., Ynoue, L.H., Sung, S.S., Silva, D.A. (2010). Antibody and cytokine responses to house dust mite allergens and *Toxoplasma gondii* antigens in atopic and non-atopic Brazilian subjects. *Clin. Immunol.* 136, 148-156.

- Fernández de Corres, L., Del Pozo, M.D., Aizpuru, F., Buendía, E. (2001). Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas en relación a las distintas tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. Estudio multicentrico de la SEAIC. Alerg. Inmun. Clín. 16, 337-46.
- Fernández-Caldas, E., Quirce, S., Marañón, F., Díez Gómez, M.L., Gijón Botella, H., López Román, R. (1998). Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. J. Allergy Clin. Immunol. 101, 554-555.
- Fernando, N., Holton, J., Zulu, I., Vaira, D., Mwaba, P., Kelly, P. (2001). *Helicobacter pylori* infection in an urban African population. J. Clin. Microbiol. 39, 1323-7.
- Ferrer, M., Luquin, E., Sanchez-Ibarrola, A., Moreno, C., Sanz, M.L., Kaplan, A.P. (2002). Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. Int. Arch. Allergy Immunol. 129, 254-260.
- Fine, L.M., Bernstein, J.A. (2016). Guideline of Chronic Urticaria Beyond. Allergy Asthma Immunol. Res. 8, 396-403.
- Fumagalli, M., Pozzoli, U., Cagliani, R., Comi, G.P., Riva, S., Clerici, M., Bresolin, N., Sironi, M. (2009). Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. J. Exp. Med. 206, 1395-1408.
- Gabrie, J. A., Rueda, M. M., Rodríguez, C. A., Canales, M., Sanchez, A. L. (2016). Immune Profile of Honduran Schoolchildren with Intestinal Parasites: The Skewed Response against Geohelminths. J. Parasitol. Res.
- García, M., Moneo, I., Audicana, M.T., del Pozo, M.D., Muñoz, D., Fernández, E., Díez, J., Etxenagusia, M.A., Ansotegui, I.J., Fernández de Corres, L. (1997). The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 99, 497.
- García-Hernández, P., Rodero, M., Cuéllar, C. (2007). *Anisakis simplex*: the activity of larval products on the complement system. Exp. Parasitol. 115, 1-8.
- García-Hernández, P., Rodero, M., Cuéllar, C. (2009). Study of the effect of *Anisakis simplex* larval products on the early and late components in the classical complement pathway. J. Parasitol. 95, 240-241.
- García-Hernández, P., Rodero, M., Gisbert-Criado, R., Puente, P., Pelayo, V., Andreu-Ballester, J.C., Cuéllar, C. (2012). The effect of anti-*Anisakis simplex* antibody levels on C3 and C4 complement components in human sera. J. Helminthol. 86, 197-201.
- García-Palacios, L., González, M.L., Esteban, M.I., Mirabent, E., Perteguer, M.J., Cuéllar, C. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblot analysis and RAST fluoroimmunoassay analysis of serum responses against crude larval antigens of *Anisakis simplex* in a Spanish random population. J. Helminthol. 70, 281.
- Gaze, S., McSorley, H. J., Daveson, J., Jones, D., Bethony, J. M., Oliveira, L. M., Speare, R., McCarthy, J.S., Engwerda, C.R., Croese, J., Loukas, A. (2012). Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. Plos Pathog. 8.
- George, P.J., Anuradha, R., Kumaran, P.P., Chandrasekaran, V., Nutman, T.B., Babu, S. (2013). Modulation of mycobacterial-specific Th1 and Th17 cells in latent tuberculosis by coincident hookworm infection. J. Immunol. 190, 5161-8.
- González-Fernández, J., Daschner, A., Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., Frutos, C.D., Valls, A., Cuéllar, C. (2015a). Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. Int. J. Parasitol. 45, 399-407.
- González-Fernández, J., Morente Fontela, M., Rodero, M., Daschner, A., Cuéllar, C. (2015b). Estudio in silico de la reactividad cruzada de la tropomiosina de *Anisakis simplex* basado en la predicción de epitopos B. XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) II Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal. Vitoria.
- Gonzalez-Muñoz, M., Rodriguez-Mahillo, A.I., Moneo, I. (2010). Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. Parasite Immunol. 32, 67-73.

- Grattan, C.E., Francis, D.M., Hide, M., Greaves, M.W. (1991). Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin. Exp. Allergy*. 21, 695-704.
- Greaves, M.W., O'Donnell, B.F. (1995). Chronic urticaria. *Br. J. Dermatol.* 132, 1023.
- Greaves, M. (2000). Chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 664-72.
- Gutiérrez, R., Guillén, R., Madero, R., Cuéllar, C. (2000). Digestive haemorrhage in patients with anti-*Anisakis* antibodies. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 337-343.
- Hermes, B., Prochazka, A., Haas, N., Jurgovsky, K., Sticherling, M., Henz, B. (1999). Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 307-14.
- Hill, D., Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634-640.
- Hopkin, J. (2009). Immune and genetic aspects of asthma, allergy and parasitic worm infections: evolutionary links. *Parasite Immunol.* 31, 267-73.
- Hussain, R., Poindexter, R., Ottesen, E. (1992). Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG<sub>4</sub> subclass. *J. Immunol.* 148, 2731-7.
- Hussain, K., Letley, D.P., Greenaway, A.B., Kenefeck, R., Winter, J.A., Tomlinson, W., Rhead, J., Staples, E., Kaneko, K., Atherton, J.C., Robinson, K. (2016). *Helicobacter pylori*-Mediated Protection from Allergy Is Associated with IL-10-Secreting Peripheral Blood Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 7, 71.
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Navarrete, I., Sanmartín, M.L. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between tirad-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.* 82, 378-381.
- Iglesias, R., Leiro, J., Santamarina, M.T., Sanmartín, M.L., Ubeira, F.M. (1997). Monoclonal antibodies against diagnostic *Anisakis simplex* antigens. *Parasitol. Res.* 83, 755
- Janson, C., Asbjörnsdóttir, H., Birgisdóttir, A., Sigurjonsdóttir, R.B., Gunnbjörnsdóttir, M., Gislason, D., Olafsson, I., Cook, E., Jögi, R., Gislason, T., Thjodleifsson, B. (2007). The effect of infectious burden on the prevalence of atopy and respiratory allergies in Iceland, Estonia, and Sweden. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 673-9.
- Johansson, E., Aponno, M., Lundberg, M., van Hage-Hamsten, M. (2001). Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy*. 56, 660-666.
- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Won, K., Wilson, M., Schantz, P.M. (2008). *Toxoplasma gondii* and *Toxocara spp.* co-infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 35-39.
- Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri, A., Gerhard, M. (2014). *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm.* 2014, 426309.
- Kasperska-Zajac, A., Brzoza, Z., Rogala, B. (2007). Plasma concentration of interleukin 6 (IL-6), and its relationship with circulating concentration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine*. 39, 142-146.
- Kasperska-Zajac, A., Sztylec, J., Machura, E., Jop, G. (2011). Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clin. Exp. Allergy*. 41, 1386-91
- Kasuya, S., Hamano, H., Izumi, S. (1990). Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet*. 335:665.
- Kennedy, M.W., Tierney, J., Ye, P., Mcmonagle, F.A., McIntosh, A., Mclaughlin, D., Smith, J.W. (1988). The secreted and somatic antigens of the third stage larva of *Anisakis simplex*, and antigenic relationship with *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, and *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 35-46.
- Khan, A.R., Fallon, P.G. (2013). Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns. *Int. J. Parasitol.* 43, 293-299.
- Khan, S. (2014). *Helicobacter pylori* associated urticarias. *Allergol. Int.* 63, 613

- Kira, J. (2015). *Helicobacter pylori* infection might prove the hygiene hypothesis in multiple sclerosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 86, 591-2.
- Kobayashi, A., Tsuji, M., Wilbur, D.L. (1985). Probable pulmonary *Anisakis* accompanying pleural effusion. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 310-313.
- Kobayashi, Y., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K. (2007a). Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. Parasitol. Res. 100, 1233-1241.
- Kobayashi, Y., Shimakura, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shiomi, K. (2007b). Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. Mol. Biochem. Parasitol. 155, 138-145.
- Kobayashi, Y., Ohsaki, K., Ikeda, K., Kakemoto, S., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K. (2011). Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. Parasitol. Int. 60, 144-150.
- Kobayashi, Y., Kakemoto, S., Shimakura, K., Shiomi, K. (2015). Molecular Cloning and Expression of a New Major Allergen, Ani s 14, from *Anisakis simplex*. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 56, 194-199.
- Kolkhir, P., Balakirski, G., Merk, H. F., Olisova, O., Maurer, M. (2016). Chronic spontaneous urticaria and internal parasites - A systematic review. Allergy: European. J. Allergy Clin. Immunol. 71, 308-322.
- Konstantinou, G., Asero, R., Maurer, M., Sabroe, R., Schmid-Grendelmeier, P., Grattan, C. (2009). EAACIGA (2) LEN task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. Allergy. 64, 1256-68.
- Kyburz, A., Müller, A. (2016). The Gastrointestinal Tract Microbiota and Allergic Diseases. Dig. Dis. 34(3), 230-43.
- Lee, J.S., Kim, B.S., Kim, S.H., Park, J.K., Choi, G., Hwang, I.K., Jeong, S.Y., Hyun, C.L., Song, H.J., Chung, Y.B. (2014). Acute invasive small-bowel Anisakiasis: clinical and CT findings in 19 patients. Abdom. Imaging. 39, 452.
- Lessof, M.H., Gant, V., Hinuma, K., Murphy, G.M., Dowling, R.H. (1990). Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity. Clin. Exp. Allergy. 20, 373-6.
- Li, C.W., Lu, H.G., Chen, D.H., Lin, Z.B., Wang, D.Y., Li, T.Y. (2014). *In vivo* and *in vitro* studies of Th17 response to specific immunotherapy in house dust mite-induced allergic rhinitis patients. PLoS ONE. 9, 1-11.
- Lim, J.H., Kim, N., Lim, S.H., Kwon, J.W., Shin, C.M., Chang, Y.S., Kim, J.S., Jung, H.C., Cho, S.H. (2016). Inverse Relationship Between *Helicobacter Pylori* Infection and Asthma Among Adults Younger than 40 Years: A Cross-Sectional Study. Medicine (Baltimore). 95, e2609.
- Linneberg, A., Ostergaard, C., Tvede, M., Andersen, L.P., Nielsen, N.H., Madsen, F., Frølund, L., Dirksen, A., Jørgensen, T. (2003). IgG antibodies against micro-organisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. J. Allergy Clin. Immunol. 111, 847-853.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. 445, 915-8.
- Lionetti, E., Leonardi, S., Lanzafame, A., Garozzo, M.T., Filippelli, M., Tomarchio, S., Ferrara, V., Salpietro, C., Pulvirenti, A., Francavilla, R., Catassi, C. (2014). *Helicobacter pylori* infection and atopic diseases: is there a relationship? A systematic review and meta-analysis. World J. Gastroenterol. 20, 17635-47.
- London, D., Hruschka, D. (2014). Helminths and human ancestral immune ecology: What is the evidence for high helminth loads among foragers? Am. J. Hum. Biol. 26, 124-129.
- Lopez, I., Pardo, M.A. (2010). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. J. Agric. Food. Chem. 58, 1469-1477.
- López Serrano, M., Moreno-Ancillo, A., Alonso Gómez, A., Daschner, A. (2000). Anisakiasis in the year 2000. Rev. Esp. Enferm. Dig. 92, 127-131.
- Lorenzo, S., Romarís, F., Iglesias, R., Audicana, M., Alonso, J., Leiro, J., Ubeira, F. (2000). O-glycans as a source of cross-reactivity in Arch. Dermatol. Res. 123 determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. Clin. Exp. Allergy. 30, 551-559

- Loukas, A., Opdebeeck, J., Croese, J., Prociw, P. (1996). Immunoglobulin G subclass antibodies against excretory/secretory antigens of *Ancylostoma caninum* in human enteric infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 672-6.
- Ma, X., Wang, L., Zhao, H., Pang, N., Zhang, F., Jiang, T., Liu, X., Mamuti, W., Ding, J. (2014). Th17 cells are associated with the Th1/Th2-cell balance during *Echinococcus multilocularis* infection. *Mol. Med. Rep.* 10, 236-240.
- Ma, Z.F., Majid, N.A., Yamaoka, Y., Lee, Y.Y. (2016). Food Allergy and *Helicobacter pylori* Infection: A Systematic Review. *Front. Microbiol.* 7, 368.
- Maizels, R.M. (2005). Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 656-661.
- Matowicka-Karna, J., Dymicka-Piekarska, V., Kemonia, H. (2009). Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clin. Dev. Immunol.* 2009-374696.
- Matricardi, P.M., Rosmini, F., Riondino, S., Fortini, M., Ferrigno, L., Rapicetta, M., Bonini, S. (2000). Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* 320, 412-417.
- Matsui, T., Iida, M., Murakami, M., Kimura, Y., Fujishima, M., Yao, Y., Tsuji, M. (1985). Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. *Radiology.* 157-299
- Matsushima, K., Nagai, S. (2012). Unraveling the mystery of the hygiene hypothesis through *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Invest.* 122, 801-4.
- Mattiucci, S., Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv. Parasitol.* 66, 47-148.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.* 74, 199-217.
- Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., Paoletti, M., Megna, A.S., Glielmo, A., De Angelis, M., Cosat, A., Meucci, C., Calvaruso, V., Sorrentini, I., Palma, G., Brischì, F., Nascetti, G. (2013). Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 496-9.
- Metenou, S., Dembele, B., Konate, S., Dolo, H., Coulibaly, S.Y., Coulibaly, Y.I., Diallo, A.A., Soumaoro, L., Coulibaly, M.E., Sanogo, D., Doumbia, S.S., Traoré, S.F., Mahanty, S., Klion, A., Nutman, T.B. (2010). At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells. *J. Immunol.* 184, 5375-82.
- Młynek, A., Zalewska-Janowska, A., Martus, P., Staubach, P., Zuberbier, T., Maurer, M. (2008). How to assess disease activity in patients with chronic urticaria? *Allergy.* 63, 777-80.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Gómez, F., Ortega, E., Alonso, M.J. (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 177-182.
- Moneret-Vautrin, D. (2003). [Allergic and pseudo-allergic reactions to foods in chronic urticaria]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 130 Spec No 1:1S35-42.
- Montoro, A., Perteguer, M.J., Chivato, T., Laguna, R., Cuéllar, C. (1997). Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy.* 52, 985-991.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O. (2004.) Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.
- Moreno-Ancillo, A., Caballero, M.T., Cabañas, R., Contreras, J., Martín-Barroso, J.A., Barranco, P., López-Serrano, M.C. (1997). Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 79, 246.
- Mortazavi, H., Hejazi, P., Khamesipour, A., Mohebalı, M., Ehsani, A.H., Mohammadi, Y., Farahani, I.V., Amirzargar, A.A. (2015). Frequency of seropositivity against infectious agents amongst pemphigus vulgaris patients: a case-control study on *Strongyloides stercoralis*, *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, and *Epstein-Barr virus*. *Int. J. Dermatol.* 54, e458-65.

- Mossali, C., Palermo, S., Capra, E., Piccolo, G., Botti, S., Bandi, C., D'Amelio, S., Giuffra, E. (2010). Sensitive detection and quantification of *Anisakis* parasite residues in food products. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 391-397.
- Moy, A.P., Murali, M., Nazarian, R.M. (2016). Identification of a Th2- and Th17-skewed immune phenotype in chronic urticaria with Th22 reduction dependent on autoimmunity and thyroid disease markers. *J. Cutan. Pathol.* 43, 372-378.
- Mudry, J., Lefebvre, P., Dei-Cas, E., Vernes, A., Poirriez, J., Débat, M., Marti, R., Binot, P., Cortot, A. (1986). Anisakiase humaine: 5 cas dans le Nord de la France. *Gastroentérol. Clin. Biol.* 10, 83-87.
- Namiki, M., Morooka, T., Kochi, H., Ueda, N., Sekiya, T. (1970). Diagnosis of acute stomach anisakiasis. *Stomache Intestine.* 5, 1437-1440.
- Nettis, E., Dambra, P., Loria, M.P., Cenci, L., Vena G.A., Ferrannini, A., Tursi, A. (2001). Mastcell phenotype in urticaria. *Allergy.* 56, 915.
- Nieuwenhuizen, N., Lopata, A.L., Jeebhay, M.F., Herbert, D.R., Robins, T.G., Brombacher, F. (2006). Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1098-1105.
- Nieuwenhuizen, N.E., Meter, J.M., Horsnell, W.G., Hoving, J.C., Fick, L., Sharp, M.F., Darby, M.G., Parihar, S.P., Brombacher, F., Lopata, A.L. (2013). A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7, e2395.
- O'Donnell, B.F., Lawlor, F., Simpson, J., Morgan, M., Greaves, M.W. (1997). The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br. J. Dermatol.* 136, 197-201.
- Oertli, M., Müller, A. (2012). *Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immune tolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma. *Gut Microbes.* 3, 566-71.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J.F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.* 160, 1-9.
- Oshima, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. En: Morishita, K., Komiya, Y., Matsubayashi, H. (Eds.). *Progress of Medical Parasitology in Japan. Vol. IV. Meguro Parasitological Museum. Tokio.* 301-393.
- Panzer, M., Sitte, S., Wirth, S., Drexler, I., Sparwasser, T., Voehringer, D. (2012). Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *J. Immunol.* 188, 615-23.
- Park, H.J., Ye, Y.M., Hur, G.Y., Kim, S.H., Park, H.S. (2008). Association between a TGFbeta1 promoter polymorphism and the phenotype of aspirin-intolerant chronic urticaria in a Korean population. *J. Clin. Pharm. Ther.* 33, 691-7.
- Park, S.K., Cho, M.K., Park, H.K., Lee, K.H., Lee, S.J., Choi, S.H., Ock, M.S., Jeong, H.J., Lee, M.H., Yu, H.S. (2009). Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. *J. Immunol.* 182, 6907-14.
- Pascual, C.Y., Crespo, J.F., San Martin, S., Ornia, N., Ortega, N., Caballero, T., Muñoz-Pereira, M., Martin-Esteban, M. (1997). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy.* 52, 514-20.
- Pedrini, M.J., Seewann, A., Bennett, K.A., Wood, A.J., James, I., Burton, J., Marshall, B.J., Carroll, W.M., Kermode, A.G. (2015). *Helicobacter pylori* infection as a protective factor against multiple sclerosis risk in females. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 86, 603-7.
- Pérez-Pérez, J., Fernández-Caldas, E., Marañón, F., Sastre, J., Bernal, M.L., Rodríguez, J., Bedate, C.A. (2000). Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123, 120-129.
- Perona-Wright, G., Mohrs, K., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Madan, R., Karp, C.L., Johnson, L.L., Smiley, S.T., Mohrs, M. (2009). Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe.* 6, 503-12.
- Perteguer, M.J., Raposo, R., Cuéllar, C. (1996). *In vitro* study on the effect of larval excretory-secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. *Int. J. Parasitol.* 26, 105-8.

- Perteguer, M.J., Cuéllar, C. (1998). Isotype-specific immune responses in murine experimental anisakiasis. *Zentralbl Veterinarmed B.* 45, 603-10.
- Perteguer, M.J., Rodero, M., Flores, J.M., Dórea, R.C., Cuéllar, C. (2001). Cellular immune responses in mice immunized with *Anisakis simplex* larval antigens. *Parasitol. Res.* 87, 396-404.
- Perteguer, M.J., Cuéllar, C., Guillén, J.L., Aguila, C., Fenoy, S., Chivato, T., Laguna, R. (2003). Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Trop.* 89, 85-89.
- Perteguer, M.J., Ortiz, G., García, E., Flores, M., Rodríguez, E., Ubeira, F.M., Gárate, T. (2004). Application of the PCR-RFLP technique for the species-specific identification of nematodes involved in human anisakiasis. *Med. Clin.* 122, 686-9.
- Piconi, S., Trabattoni, D., Iemoli, E., Fusi, M.L., Villa, M.L., Milazzo, F., Clerici, M. (2002). Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 59-66.
- Pinelli, E., Mommers, M., Kortbeek, L.M., Castagna, B., Piergili-Fioretti, D., Bruschi, F. (2007). Specific IgG<sub>4</sub> response directed against the 45-kda glycoprotein in trichinellosis: a re-evaluation of patients 15 years after infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 641-5.
- Platts-Mills, T., Vaughan, J., Squillace, S., Woodfolk, J., Sporik, R. (2001). Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet.* 357, 752-6
- Pollak, M.F., Kamplmacher, E.H. (1966). Haring wormsiekte in 1965 en voorgaande jaren. *Cersl. Volksgezondn.* 12, 344-355.
- Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F.M., Cuéllar, C. (2008). *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp. Parasitol.* 118, 271-274.
- Ramos, J.M., Milla, A., Rodríguez, J.C., Padilla, S., Masiá, M. & Gutiérrez, F. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among immigrant and native pregnant women in Eastern Spain. *Parasitol. Res.* 109, 67-74.
- Rasooly, M.M., Moye, N.A., Kirshenbaum, A.S. (2015). *Helicobacter pylori*: A significant and treatable cause of chronic urticaria and angioedema. *Nurse Pract.* 40, 1-6.
- Raybourne, R.B., Deardorff, T.L., Bier, J.W. (1986). *Anisakis simplex*: production dynamics of larval excretory-secretory proteins and their cytostatic action in mammalian cell cultures. *Exp. Parasitol.* 62, 92-97.
- REAL DECRETO 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.
- Reddy, A., Fried, B. (2008). Atopic disorders and parasitic infections. *Adv. Parasitol.* 66, 149-91.
- REGLAMENTO (CE) Nº 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal
- Robinson, K., Kenefeck, R., Pidgeon, E.L., Shakib, S., Patel, S., Polson, R.J., Zaitoun, A.M., Atherton, J.C. (2008). *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut.* 57, 1375-85.
- Rodríguez, E., Anadón, A., García-Bodas, E., Romarís, F., Iglesias, R., Gárate, T., Ubeira, F.M. (2008). Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy.* 63, 219-25.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Muñoz, M., Gomez-Aguado, F., Rodriguez-Perez, R., Corcuera, M.T., Caballero, M.L., Moneo, I. (2007). Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int. J. Parasitol.* 37, 907-917.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., Moneo, I., Solas, M.T., Mendizábal, A., de las Heras, C., Tejada, M. (2008). Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. *J. Food Prot.* 71, 2578-2581.

- Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., de las Heras, C., Tejada, M., Moneo, I. (2010). Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 967-973.
- Rodríguez-Perez, R., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A., Caballero, M.L. (2008). Cloning and expression of *Anisakis simplex* allergen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159, 92-97.
- Rook, G.A. (2007). The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory disorders. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 1072-1074.
- Rook, G.A. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology.* 126, 3-11.
- Sakanari, J.A., McKerrow, J.H. (1989). Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 278
- Sakanari, J.A. (1990). *Anisakis*-from the platter to the microfuge. *Parasitol. Today.* 6, 323-327.
- Santaolalla, M., Moneo, I., Pérez, A., Curiel, G., De Paz, S., Domínguez, A.R. (1997). Anisakidosis aguda de presentación familiar. *Rev. Esp. Allergol. Immunol. Clin.* 7, 302-305.
- Santiago, H.C., Nutman, T.B. (2016). Human helminths and allergic disease: The hygiene hypothesis and beyond. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 746-753.
- Sastre, J., Lluich-Bernal, M., Quirce, S., Arrieta, I., Lahoz, C., Del Amo, A., Fernández-Caldas, E., Marañón, F. (2000). A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy.* 55, 560-564.
- Schmidt-Weber, C., Akdis, M., Akdis, C. (2007). TH17 cells in the big picture of immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 247-254.
- Schramm, A., Jasiewicz-Honkisz, B., Osmenda, G., Wilk, G., Siedlinski, M., Sagan, A., Matusik, P.T., Maciag, J., Silwa, T., Czesnikiewicz-Guzik, M., Mikolajczyk, T.P. (2016). Th17 responses are not altered by natural exposure to seasonal allergens in pollen-sensitive patients. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 12, 55.
- Seiskari, T., Kondrashova, A., Viskari, H., Kaila, M., Haapala, A.M., Aittoniemi, J., Virta, M., Hurme, M., Uibo, R., Knip, M., Hyöty, H. (2007). EPIVIR study group. Allergic sensitization and microbial load-a comparison between Finland and Russian Karelia. *Clin. Exp. Immunol.* 148, 47-52.
- Serrano-Hernandez, A. (2009). Células cotaboradoras (Th1, Th2, Th17) y reguladoras (Treg, Th2, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* 5, 1-5.
- Shakib, F., Ghaemmaghami, A.M., Sewell, H.F. (2008). The molecular basis of allergenicity. *Trends. Immunol.* 29, 633-642.
- Sheikh, A., Smeeth, L., Hubbard, R. (2003). There is no evidence of an inverse relationship between TH2-mediated atopy and TH1-mediated autoimmune disorders: lack of support for the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 131-135.
- Shibata, E., Ueda, T., Akaike, G., Saida, Y. (2014). CT findings of gastric and intestinal anisakiasis. *Abdom. Imaging.* 39, 257.
- Simons, F.E., Arduoso, L.R., Bilò, M.B., El-Gamal, Y.M., Ledford, D.K., Ring, J., Sanchez-Borges, M., Senna, G.E., Sheikh, A., Thong, B.Y. (2011). World Allergy Organization. World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.* 4, 13-37.
- Sitaraman, R. (2015). Allergies, *Helicobacter pylori* and the continental enigmas. *Front. Microbiol.* 6, 578.
- Stapel, S.O., Asero, R., Ballmer-Weber, B.K., Knol, E.F., Strobel, S., Vieths, S., Kleine-Tebbe, J. (2008). EAACI Task Force. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy.* 63, 793-6.
- Steel, C., Nutman, T.B. (2003). CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. *J. Immunol.* 170, 1930-8.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene and household size. *Br. Medj.* 299, 1259-60

- Sugane, K., Sun, S.H., Matsuura, T. (1992). Radiolabelling of the excretory-secretory and somatic antigens of *Anisakis simplex* larvae. J. Helminthol. 66, 305-9.
- Sugimachi, K., Inokuchi, K., Ooiwa, T., Fujino, T., Ishii, Y. (1985). Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases. JAMA. 253, 1012-3.
- Supali, T., Verweij, J.J., Wiria, A.E., Djuardi, Y., Hamid, F., Kaisar, M.M., Wammes, L.J., van Lieshout, L., Luty, A.J., Sartono, E., Yazdanbakhsh, M. (2010). Polyparasitism and its impact on the immune system. Int. J. Parasitol. 40, 1171-1176.
- Takabayashi, T., Mochizuki, T., Otani, N., Nishiyama, K., Ishimatsu, S. (2014). Anisakiasis presenting to the ED: clinical manifestations, time course, hematologic tests, computed tomographic findings, and treatment. Am. J. Emerg. Med. 32, 1485.
- Taube, C., Müller, A. (2012). The role of *Helicobacter pylori* infection in the development of allergic asthma. Expert. Rev. Respir. Med. 6, 441-9.
- Taye, B., Enquesselassie, F., Tsegaye, A., Medhin, G., Davey, G., Venn, A. (2015). Is *Helicobacter Pylori* infection inversely associated with atopy? A systematic review and meta-analysis. Clin. Exp. Allergy. 45, 882-90.
- Tedeschi, A., Lorini, M., Suli, C., Asero, R. (2006). No evidence of tumor necrosis factor-alpha release in blood of patients with chronic urticaria. Allergy. 61, 510-1
- Toro, C., Caballero, M.L., Baquero, M., García-Samaniego, J., Casado, I., Martínez, P., Alarcón, T., Moneo, I. (2006). Seropositivity to a major allergen of *Anisakis simplex*, Ani s 1, in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* infection: histological and laboratory findings and clinical significance. Clin. Microbiol. Infect. 12, 453-8.
- Turner, J.D., Faulkner, H., Kamgno, J., Kennedy, M.W., Behnke, J., Boussinesq, M., Bradley, J.E. (2005). Allergen-specific IgE and IgG<sub>4</sub> are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. Microbes Infect. 7, 990-6.
- Turner, J. D., Jackson, J. A., Faulkner, H., Behnke, J., Else, K. J., Kamgno, J., Boussinesq, M., Bradley, J. E. (2008). Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness. J. Infect. Dis. 197, 1204-1212.
- Twardosz-Kropfmüller, A., Singh, M.B., Niederberger, V., Horak, F., Kraft, D., Spitzauer, S., Valenta, R., Swoboda, I. (2010). Association of allergic patients' phenotypes with IgE reactivity to recombinant pollen marker allergens. Allergy. 65, 296-303
- Ubeira, F.M., Anadón, A.M., Salgado, A., Carvajal, A., Ortega, S., Aguirre, C., López-Goikoetxea, M.J., Ibanez, L., Figueiras, A. (2011). Synergism between prior *Anisakis simplex* infections and intake of NSAIDs, on the risk of upper digestive bleeding: a case-control study. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1214.
- Urban, J.F. Jr., Madden, K.B., Svetič, A., Cheever, A., Trotta, P.P., Gause, W.C., Katona, I.M., Finkelman, F.D. (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. Immunol. Rev. 127, 205-20.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D., Grönlund, H. (1999). The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). Clin. Exp. Allergy. 29, 896-904.
- Valiñas, B., Lorenzo, S., Eiras, A., Figueiras, A., Sanmartín, M., Ubeira, F. (2001). Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. Allergy. 56, 667-671.
- Ventura, M.T., Napolitano, S., Menga, R., Cecere, R., Asero, R. (2013). *Anisakis simplex* hypersensitivity is associated with chronic urticaria in endemic areas. Int. Arch. Allergy Immunol. 160, 297-300.
- Vercelli, D., De Monte, L., Monticelli, S., Di Bartolo, C., Agresti, A. (1998). To E or not to E? Can an IL-4-induced B cell choose between IgE and IgG<sub>4</sub>? Int. Arch. Allergy Immunol. 116, 1-4.
- Vidacek, S., de las Heras, C., Solas, M.T., Mendizábal, A., Rodríguez-Mahillo, A.I., Tejada, M. (2010). Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. J. Food Prot. 73, 62-68.
- Von Hertzen, L.C., Laatikainen, T., Mäkelä, M.J., Jousilahti, P., Kosunen, T.U., Petays, T., Pussinen, P.J., Haahtela, T., Vartiainen, E. (2006). Infectious burden as a determinant of atopy- a comparison between adults in Finnish and Russian Karelia. Int. Arch. Allergy Immunol. 140, 89-95.

- Wagner, A., Förster-Waldl, E., Garner-Spitzer, E., Schabussova, I., Kundi, M., Pollak, A., Scheiner, O., Joachim, A., Wiedermann, U. (2009). Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *Int. J. Parasitol.* 39, 465-472.
- Wammes, L.J., Mpairwe, H., Elliott, A.M., Yazdanbakhsh, M. (2014). Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect Dis.* 14, 1150-1162.
- Wang, X., Zhang, N., Bo, M., Holtappels, G., Zheng, M., Lou, H., Wang, H., Zhang, L., Bachert, C. (2016). Diversity of Th cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1344-1353.
- Weaver, K.L., Ivester, P., Seeds, M., Case, L.D., Arm, J.P., Chilton, F.H. (2009). Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. *J. Biol. Chem.* 284, 15400-7.
- Wedi, B., Wagner, S., Werfel, T., Manns, M.P., Kapp, A. (1998). Prevalence of *Helicobacter pylori*-associated gastritis in chronic urticaria. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116, 288-294.
- Wedi, B., Raap, U., Kapp, A. (2004). Chronic urticaria and infections. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4, 387-396.
- Wilson, M., Maizels, R. (2004). Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 26, 35-50.
- Wright, B.L., Kulis, M., Orgel, K.A., Burks, A.W., Dawson, P., Henning, A.K., Jones, S.M., Wood, R.A., Sicherer, S.H., Lindblad, R.W., Stablein, D., Leung, D.Y., Vickery, B.P., Sampson, H.A. (2016). Consortium of Food Allergy Research. Component-resolved analysis of IgA, IgE, and IgG<sub>4</sub> during egg OIT identifies markers associated with sustained unresponsiveness. *Allergy.* 71, 1552-1560.
- Yagihashi, A., Sato, N., Takahashi, S., Ishikura, H., Kikuchi, K. (1990). A serodiagnostic assay by microenzyme-linked immunosorbent assay for human anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis* larvae antigen. *J. Infect. Dis.* 161, 995-998.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 296, 490-494.
- Yazdanbakhsh, M., Matricardi, P.M. (2004). Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 26, 15-24.
- Zuberbier, T., Chantraine-Hess, S., Hartmann, K., Czarnetzki, B.M. (1995). Pseudoallergen-free diet in the treatment of chronic urticaria. A prospective study. *Acta Derm. Venereol.* 75, 484-7.
- Zuberbier, T., Asero, R., Bindslev-Jensen, C., Walter Canonica G., Church, M.K., Giménez-Arnau, A.M., Grattan, C.E., Kapp, A., Maurer, M., Merk, H.F., Rogala, B., Saini, S., Sánchez-Borges, M., Schmid-Grendelmeier, P., Schünemann, H., Staubach, P., Vena, G.A., Wedi, B. (2009). EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO guideline: management of urticaria. *Allergy.* 64, 1417-26.
- Zuberbier, T., Balke, M., Worm, M., Edenharter, G., Maurer, M. (2010). Epidemiology of urticaria: a representative cross-sectional population survey. *Clin. Exp. Derm.* 35, 869-873.
- Zuberbier, T., Aberer, W., Asero, R., Bindslev-Jensen, C., Brzoza, Z., Canonica, G.W., Church, M.K., Ensina, L.F., Giménez-Arnau, A., Godse, K., Gonçalo, M., Grattan, C., Hebert, J., Hide, M., Kaplan, A., Kapp, A., Abdul Latiff, A.H., Mathelier-Fusade, P., Metz, M., Nast, A., Saini, S.S., Sánchez-Borges, M., Schmid-Grendelmeier, P., Simons, F.E., Staubach, P., Sussman, G., Toubi, E., Vena, G.A., Wedi, B., Zhu, X.J., Maurer, M. (2014). The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO. Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy.* 69, 868-87.



***ABREVIATURAS***

AGA	Anisakiosis gastroalérgica
ANOVA	Análisis de la varianza
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos
ASST	<i>Autologous Serum Skin Test</i>
Bet v 1	Alérgeno principal del polen del abedul
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C	Controles
FEIA	Fluoroenzimoinmunoensayo
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Con A	Concanavalina A
CU+	Chronic Urticaria with sensibilization to <i>A.simplex</i>
CU-	Chronic Urticaria without sensibilization to <i>A. simplex</i>
DO	Desviación óptica
DS	Desviación estándar
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	<i>Enzymed-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAA	<i>Gastro-allergic Anisakiosis</i>
H. ACCIDENTAL	Hospedador accidental
HD	Hospedador definitivo
HI	Hospedador intermediario
HP	Hospedador paraténico
IC	Intervalo de Confianza

IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IQR	Rangos intercuartiles
IT	Intervalo de Tiempo
L1, L2, L3	Larva de primer, segundo y tercer estadio
Min	Minuto
N.S.	No significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>P</i>	Coefficiente de correlación de Spearman
PBMC	<i>Periferic Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Phosphated buffer saline/Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PE	Ficoeritrina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Seg	Segundos
SPT	Skin Prick Test
TBS	Tris-buffered saline
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH	Linfocitos T Helper
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TREG	Linfocitos T reguladores
UAS	<i>Urticaria Activity Score</i>
UC+	Urticaria crónica con sensibilización a <i>A. simplex</i>
UC-	Urticaria crónica sin sensibilización a <i>A. simplex</i>
X	Media

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo biológico de los anisákidos.....14

Fig. 2. Distribución geográfica de los anisákidos (Mattiucci y Nascetti, 2008).....15

Fig. 3. Anisakiosis humana (Sakanari, 1990; Daschner *et al.*, 2000).....22

Fig. 4. Sensibilización en la anisakiosis gastroalérgica. (Modificado de Daschner *et al.*, 2012).....36

Fig. 5. Inducción de tolerancia en la anisakiosis gastroalérgica (Modificado de Daschner *et al.*, 2012). .....37

Fig. 6. Paradigma helmintos/inmunidad. Coadaptación parásito/hospedador (Modificado de Khan y Fallon, 2013). .....39

Fig. 7. Impacto del poliparasitismo sobre el sistema inmunológico (Supali *et al.*, 2010). .....43

Fig. 8. Representación esquemática del modelo de inducción de tolerancia inmunológica por *Helicobacter pylori* (Arnold *et al.*, 2012). .....47

Fig. 9. IgE específica e IgE total frente a *Anisakis simplex* expresadas en kU/l. AGA: anisakiosis gastroalérgica, UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *A. simplex*. n.s.: no significativo. ....77

Fig. 10. Porcentaje de sueros con IgE específica positiva y negativa frente al alérgeno recombinante Ani s 1. AGA: anisakiosis gastroalérgica; UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; UC-: urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex*; Control: sujetos sin historial de urticaria o síntomas asociados a la ingesta de pescado .....79

Fig. 11. Porcentaje de sueros con IgE específica positiva y negativa frente al antígeno recombinante Ani s 7. AGA: anisakiosis gastroalérgica; UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis simplex*; UC-: urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex*; Control: sujetos sin historial de urticaria o síntomas asociados a la ingesta de pescado. ....79

Fig. 12. Cocientes IgG<sub>4</sub>/IgE frente a los antígenos recombinantes Ani s 1, Ani s 7 y frente al antígeno total larvario de *Anisakis*. Este gráfico compara los cocientes de los isotipos de inmunoglobulinas presentes en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada con la sensibilización a *Anisakis* (UC+) frente a los antígenos principales, Ani s 1 y Ani s 7. ....82

**Fig. 13.** Frecuencia de la positividad (POS) o negatividad (NEG) a Ani s 1 y Ani s 7 en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y en la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis simplex* (UC+). Los valores de corte para la IgE y la IgG<sub>4</sub> fueron de 0,09/0,05 y 0,16/0,08 para Ani s 1 y Ani s 7, respectivamente. .... 83

**Fig. 14.** Positividad simultánea para IgE e IgG<sub>4</sub> frente a Ani s 1 y Ani s 7 en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y la urticaria crónica asociada a la sensibilización por *Anisakis* (UC+). En este análisis, sólo se incluyeron pacientes, en los cuales estaban disponibles tanto los valores de IgE, como los de IgG<sub>4</sub>. .... 84

**Fig. 15.** Variables predictoras independientes en un modelo de regresión logística acerca de la pertenencia a anisakiosis gastroalérgica (AGA) o a la urticaria crónica asociada a la sensibilización con *Anisakis* (UC+). La IgE y la IgG<sub>4</sub> frente al antígeno total, así como frente a Ani s 1 y Ani s 7, que inicialmente fueron incluidas en el análisis, fueron secuencialmente excluidas como variables no-significativas. .... 85

**Fig. 16.** Hábitos de ingesta de pescado en diferentes fenotipos de urticaria crónica. Resultados tras análisis de regresión logística, incluyendo todas las posibles variables de ingesta de pescado. La mediana de las porciones de pescado semanal (total, pescado graso, pescado enlatado) y mensual (boquerones en vinagre) en urticaria crónica sin (UC-) y con (UC+) sensibilización frente a *Anisakis simplex*. .... 93

**Fig. 17.** *Urticaria Activity Score* (UAS) y hábitos de ingesta de pescado. Gráfica de regresión parcial: se muestran aquellas variables que alcanzaron  $P \leq 0,05$  en un modelo de regresión. Todas las variables, incluyendo los datos de hábitos de ingesta de pescado, se incluyeron en este modelo con el fin de encontrar una explicación al resultado del UAS. .... 97

**Fig. 18.** Variables que explican la mejoría clínica de la urticaria crónica. La mejoría se define como una disminución mínima de la puntuación del *Urticaria Activity Score* (UAS) de 1, tras el estudio. Estas variables se incluyeron inicialmente en este modelo, que registró una  $P < 0,1$  en el análisis bivariable (hábitos de ingesta de pescado, dieta, estado atópico). A) Aquí se incluyó también la dieta como un posible factor explicativo y adquiere significación para un peor pronóstico. B) Análisis únicamente en aquellos pacientes que mantuvieron una dieta libre de pescado. .... 99

**Fig. 19.** Prevalencia (%) de la infección por *Toxoplasma gondii*, determinada por ELISA, en los individuos control, pacientes con urticaria crónica con sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+) y pacientes con urticaria crónica sin sensibilización a *A. simplex* (UC-). .... 101

**Fig. 20.** Prevalencia (%) de atopia relativa a la infección por *Toxoplasma gondii*, medida por ELISA, en pacientes con urticaria crónica, independientemente de la infección por *Anisakis simplex*; no infección por *T. gondii* (Tg-), seropositividad frente a *T. gondii* (Tg+). .... 102

**Fig. 21.** Porcentaje de inmigrantes procedentes de Sudamérica dentro de los grupos de pacientes con urticaria crónica seropositivos (Tg+) y seronegativos (Tg-) a *Toxoplasma gondii*. .... 103

**Fig. 22.** Valores de A) IgE (CAP-*FEIA*) anti-*Anisakis simplex* (kU/l), B) IgG anti-*Toxoplasma gondii* (UI/l) y C) IgG anti-*Helicobacter pylori* (NTU/ml) en pacientes con y sin urticaria crónica. ....108

**Fig. 23.** Porcentaje de positivos y negativos a IgE (kU/l) anti-*Anisakis simplex* del grupo control y del grupo de pacientes con urticaria crónica. ....109

**Fig. 24.** Porcentaje de positivos y negativos a IgG (UI/l) anti-*Toxoplasma gondii* en el grupo control y en el grupo de pacientes con urticaria crónica. ....110

**Fig. 25.** Porcentaje de positivos y negativos a IgG (NTU/ml) anti-*Helicobacter pylori* en el grupo control y en el grupo de pacientes con urticaria crónica. ....111

**Fig. 26.** Determinación del porcentaje de positivos y negativos a *Anisakis simplex* y *Helicobacter pylori* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica.....112

**Fig. 27.** Determinación del porcentaje de positivos y negativos a *Anisakis simplex*, *Helicobacter pylori* y *Toxoplasma gondii* de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica. ....113

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Subfamilia Anisakidae (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009). ..... 13

**Tabla 2.** Prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en pescados de diferentes áreas (EFSA, 2010).  
..... 16

**Tabla 3.** Efecto de diferentes tratamientos sobre las larvas de *Anisakis* en los pescados (EFSA, 2010). ..... 17

**Tabla 4.** Alérgenos caracterizados de *Anisakis simplex*. ..... 20

**Tabla 5.** Cuestionario estandarizado: Hábitos de ingesta de pescado ..... 64

**Tabla 6.** Datos generales de los grupos de estudio. .... 76

**Tabla 7.** Medias de IgE sérica específica expresada en D.O. frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7, obtenidas por *ELISA*. ..... 78

**Tabla 8.** Mediana y rangos intercuartiles (*IQR*) de los niveles de inmunoglobulinas estudiados en la anisakiosis gastroalérgica (AGA) y en la urticaria crónica asociada con sensibilización a *Anisakis simplex* (UC+). ..... 81

**Tabla 9.** Producción de citoquinas (pg/ml sobrenadante) tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* o Concanavalina A. Los valores de *P1* corresponden a la comparación de los niveles de citoquinas en UC+ vs UC-. *P2* corresponden a AGA vs UC-. Los valores de *P3* corresponden a UC+ vs AGA. (Mediana y rangos intercuartiles). ..... 88

**Tabla 10.** Comparación de los niveles de citoquinas (pg/ml sobrenadante) en UC-, UC+ y AGA, tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* y con Concanavalina A. .... 89

**Tabla 11.** Producción de citoquinas (pg/ml suero) en suero de pacientes UC-, UC+ y AGA. Los valores de *P1* corresponden a la comparación de los niveles de citoquinas en UC+ vs UC-. *P2* corresponden a AGA vs UC-. Los valores de *P3* corresponden a UC+ vs AGA. (Mediana y rangos intercuartiles). ..... 90

**Tabla 12.** Producción de citoquinas (pg/ml) en sobrenadantes tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con extracto de *Anisakis simplex* o Concanavalina A. .... 94

**Tabla 13.** Estudios de correlación. .... 95

<b>Tabla 14.</b> Variables explicativas de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en un modelo de regresión logística.....	104
<b>Tabla 15.</b> Determinación de los niveles de IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> en función del sexo (Medianas y rangos intercuartiles) (en este caso, se utilizó n = 89).....	106
<b>Tabla 16.</b> Determinación de los niveles de IgG anti- <i>H. pylori</i> en función de la edad (Medianas y rangos intercuartiles). .....	106
<b>Tabla 17.</b> Comparación por análisis bivariable de IgE anti- <i>A. simplex</i> (kU/l), IgG anti- <i>T. gondii</i> (UI/l) e IgG anti- <i>H. pylori</i> (NTU/ml) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (Medianas y rangos intercuartiles). .....	107
<b>Tabla 18.</b> Determinación del porcentaje de positividad a IgE anti- <i>Anisakis simplex</i> (kU/l) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (n = 90). .....	109
<b>Tabla 19.</b> Determinación del porcentaje de positividad a IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (UI/l) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control (n = 89). .....	110
<b>Tabla 20.</b> Determinación del porcentaje de positividad a IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> (NTU/ml) en pacientes con urticaria crónica y en el grupo control. (n = 88). .....	111
<b>Tabla 21.</b> Determinación del porcentaje de coinfección por <i>Anisakis simplex</i> y <i>Helicobacter pylori</i> de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica. (n = 88).....	112
<b>Tabla 22.</b> Determinación del porcentaje de coinfección por <i>Anisakis simplex</i> , <i>Helicobacter pylori</i> y <i>Toxoplasma gondii</i> de los sujetos del grupo control y de los pacientes con urticaria crónica. (n = 88). .....	113

