



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

**TESIS DOCTORAL**

**DETERMINACIÓN DE HLA-G EN ALERGIAS  
ALIMENTARIAS Y VALORACIÓN DE LA MICROBIOTA  
INTESTINAL EN PACIENTES DE EDAD PEDIÁTRICA**

**Autora: LAURA ISABEL VELÁSQUEZ CASTRILLÓN**

**Directores: Dra. Esther Caparrós Cayuela**

**Dr. Francisco Javier Fernández Sánchez**

**Dr. Victor Soriano Gomis**

**Alicante, 2017**

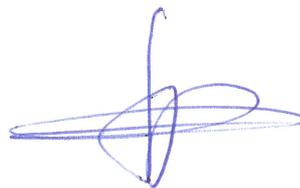


D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del  
Departamento de Medicina Clínica de la Universidad  
Miguel Hernández

## AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo  
“DETERMINACIÓN DE HLA-G EN ALERGIAS ALIMENTARIAS Y  
VALORACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES DE  
EDAD PEDIÁTRICA” presentado por Dña. LAURA ISABEL VELÁSQUEZ  
CASTRILLÓN bajo la dirección de la Dr. D. FRANCISCO JAVIER  
FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Dra. Dña. ESTHER CAPARRÓS  
CAYUELA y el Dr. D. VICTOR SORIANO GOMIS.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 7 de Septiembre  
de 2017 .



Prof. J. Fernández

Director

Dpto. Medicina Clínica



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante  
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450  
c.electrónico: med.psiqui@umh.es

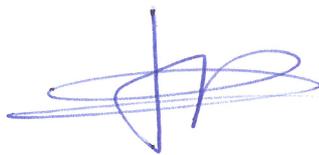


D. Francisco Javier Fernández Sánchez, Dña. Esther Caparrós Cayuela y D. Victor Soriano Gomis como Directores de Tesis Doctoral

## CERTIFICAN:

Que el trabajo "DETERMINACIÓN DE HLA-G EN ALERGIAS ALIMENTARIAS Y VALORACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES DE EDAD PEDIÁTRICA" realizado por Dña. Laura Isabel Velásquez Castrillón ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a 8 de Septiembre de 2017.



Fdo. Dr. D. Francisco Javier Fernández Sánchez  
Director  
Tesis Doctoral



Fdo. Dra. Dña. Esther Caparrós Cayuela  
Directora  
Tesis Doctoral

Fdo. Dr. D. Victor Soriano Gomis  
Director  
Tesis Doctoral



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante  
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450  
c.electrónico: med.psiqui@umh.es



## **AGRADECIMIENTOS**

La realización y ejecución de esta tesis fué en el Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, por lo tanto quisiera agradecerle a cada una de aquellas personas que han estado a mi lado brindándome su apoyo, y comprensión durante todos los años que ha durado éste camino.

Quisiera agradecer de primera mano al Dr. Javier Fernández por participar en mi formación profesional, permitirme formar parte del Departamento, y poder realizar aquí mi tesis doctoral.

A la Dra. Esther Caparrós, por su paciencia, dedicación, acompañamiento y conocimiento que me ha transmitido durante todos éste tiempo; aún recuerdo el día que toque a la puerta de su laboratorio para preguntarle si podría hacer parte de su equipo de trabajo. Siempre estaré muy agradecida y orgullosa de haber trabajado con tal excelente profesora.

Mis más sinceros agradecimientos para el Dr. Víctor Soriano quien con su guía fue una pieza clave para que pudiese desarrollar y afrontar una serie de eventos que fueron imprescindibles para cada etapa del desarrollo de éste trabajo.

Quisiera realizar una mención especial al Dr. Gonzalo Rubio, por su sabiduría y tutoría académica en el desarrollo de la parte experimental de la tesis y por permitirme realizar parte de ésta en su laboratorio.

A los facultativos, residentes, personal administrativo y de enfermería del Servicio de Alergia del Hospital General de Alicante por su disposición y asesoramiento a la hora de realizar y desempeñar ésta investigación.

A mis compañeros de laboratorio y departamento como Mariavi, Paula, Oriol, María, Dolores, María José, Verónica y Marisun, quienes a través del tiempo fuimos fortaleciendo una amistad y creando una familia, muchas gracias por toda su colaboración, por convivir todo éste tiempo conmigo, por compartir experiencias, alegrías, frustraciones, tristezas, celebraciones y por aportarme confianza y crecer juntos.

Por último y no menos importante quiero agradecerle a la base de todo, mi familia. A mis padres, hermano, y principalmente a mi esposo Juan Andrés con sus consejos, su paciencia, motivación, apoyo incondicional, y amor fueron mi motor de arranque para la realización de ésta tesis.



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HLA-G</b>	Antígeno de Histocompatibilidad, clase I, G
<b>sHLA-G</b>	Antígeno de Histocompatibilidad, clase I, G Soluble
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FPIES</b>	Enterocolitis inducida por proteínas de la dieta
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>NK</b>	Células Natural Killer o Asesinas Naturales
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>pg</b>	Picogramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>LTPs</b>	Proteínas de Transferencia de Lípidos
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>WB</b>	Western Blot
<b>SAO</b>	Síndrome de Alergia Oral
<b>bp</b>	Pares de Bases
<b>Kda</b>	Kilodalton
<b>Treg</b>	Linfocito T Regulador
<b>APC</b>	Célula Presentadora de Antígeno

<b>Tc</b>	Linfocito T Citotóxico
<b>TCR</b>	Receptor Antigénico del Linfocito T
<b>μl</b>	Microlitros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>xg</b>	Gravedades por Minuto
<b>ON</b>	Overnight (incubación toda la noche)
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>SGUM</b>	Sobrenadante Línea Celular JEG-3
<b>BSA</b>	Albúmina Bovina Sérica
<b>CM-10</b>	Medio de Cultivo
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>OTU</b>	Unidad Taxonómica Operacional
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena
<b>SAO</b>	Síndrome Alergia Oral
<b>INS/INS</b>	Inserción/Inserción
<b>INS/DEL</b>	Inserción/Delección
<b>DEL/DEL</b>	Delección/Delección
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>slgE</b>	Inmunoglobulina E soluble

# INDICE

## I. INTRODUCCIÓN

<b>1. PERSPECTIVA CLÍNICA</b>	<b>19</b>
1.1 Sistema inmune	19
1.2 Respuesta inmunitaria	19
1.3 Células del Sistema Inmune	20
1.4 Anticuerpos	20
1.5 Citocinas	21
1.6 Complejo Mayor de Histocompatibilidad	21
1.7 Respuesta Inmunitaria	22
1.8 Fase de Reconocimiento	22
1.9 Fase de Activación	23
<b>2. ALERGIAS ALIMENTARIAS</b>	<b>25</b>
2.1 Reacción Adversa a un alimento:	31
2.2 Alergia o hipersensibilidad Alimentaria:	31
2.3 Intolerancia alimentaria:	32
2.4 Anafilaxia alimentaria:	32
2.5 Anafilaxia alimentaria No IgE mediada:	32
2.6 Intoxicación alimentaria:	32
2.7 Intoxicación alimentaria por contaminación alimentaria:	32
2.8 Idiosincrasia alimentaria:	32
2.9 Reacción Alimentaria Farmacológica:	33
2.10 Reacción Alimentaria Metabólica:	33
2.11 Síntomas de la alergia alimentaria	33
2.11.1 Síntomas digestivos:	33
2.11.2 Síntomas Cutáneos:	33
2.11.3 Síntomas respiratorios:	34
2.13. Tipos de reacciones alérgicas alimentarias	34
2.14. Diagnóstico	35
2.15. Evolución de la alergia alimentaria	36
2.16. Tratamiento	37
<b>3. MICROBIOTA INTESTINAL</b>	<b>38</b>
3.1 Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (FPIES)	42
4.1 Polimorfismo del HLA-G	45
4.2 Isoformas de la molécula HLA-G	47
4.3 Proteína HLA-G1	48

4.4	<b>Proteínas HLA-G2, G3 y G4</b>	49
4.5	Proteínas HLA-G5, G6, y G7	49
4.6	<b>Funciones del HLA-G</b>	50
4.7	<b>HLA-G y su Asociación con Inflamación y Alergias</b>	50
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>		<b>53</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>		<b>57</b>
1.	<b>TIPO DE ESTUDIO</b>	59
2.	<b>SUJETOS DE ESTUDIO</b>	59
3.	<b>GRUPOS DE ESTUDIO</b>	59
4.	<b>RECOGIDA DE MUESTRAS DE SALIVA Y ANÁLISIS DE DATOS</b>	61
5.	<b>ASPECTOS ÉTICOS A TENER EN CUENTA</b>	62
6.	<b>ESTANDARIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECIÓN/INSERCIÓN EN DE LA SECUENCIA DE 14 BP EN EL EXÓN 8 DE HLA-G Y EL ALELO NULO 01:05N, EN MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES QUE PRESENTAN ALERGIA ALIMENTARIA.</b>	63
6.1	Protocolo recogida de saliva con tubos Salivette®	64
6.2	<b>Métodos de Extracción de DNA</b>	65
6.4	Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para determinar el polimorfismo HLA-G 14 pares de bases inserción/ delección del exón 8 y el alelo nulo 01:05N.	66
7.	<b>DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-G POR LA TÉCNICA WESTERN BLOT EN MUESTRAS DE SALIVA DE PACIENTES Y CONTROLES.</b>	67
7.1	Cuantificación de Proteínas:	68
7.2	Concentración de Proteínas:	68
7.3	Técnica Western Blot:	68
7.4	<b>ELISA</b>	71
<b>IV. RESULTADOS</b>		<b>77</b>
1.	<b>MUESTRA DEL ESTUDIO</b>	79
1.1	GRUPO DE ESTUDIO	80
1.2	DATOS DEMOGRÁFICOS	80
1.3	<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>	82
1.4	PRUEBAS CUTÁNEAS	83
1.5	<b>RELACIÓN DE ALÉRGENOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO</b>	84
2.	<b>DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECIÓN/INSERCIÓN DE 14 PARES DE BASES EN EL EXÓN 8 DE HLA-G.</b>	85
3.	<b>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE sHLA-G.</b>	94
4.	<b>DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-G POR LA TÉCNICA WESTERN BLOT EN PACIENTES CON ALERGIA ALIMENTARIA Y CONTROLES SANOS.</b>	100
5.	<b>MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON EDAD PEDIÁTRICA</b>	103

5.1 Ingesta de alimentos	105
5.2 Evaluación de la composición de la microbiota intestinal en Pacientes en Edad Pediátrica	106
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
DISCUSIÓN	113
1. PERFIL CLÍNICO DE LOS PACIENTES	113
2. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECIÓN/ INSERCIÓN DE 14 PARES DE BASES EN EL EXÓN 8 DE HLA-G.	114
3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE SHLA-G POR LA TÉCNICA ELISA Y LA DETECCIÓN POR WESTERN BLOT.	116
4. MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON EDAD PEDIÁTRICA	118
4.1 RELACIÓN CON LOS SINTOMAS y RECURRENCIA DE LA ALERGIA ALIMENTARIA: HLA-G Y LA MICROBIOTA	121
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>129</b>





## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Diferencias y similitudes entre reacciones alérgicas, reacciones de intolerancia y reacciones tóxicas a alimentos. AVPAP. 2008.	<b>26</b>
<b>Figura 1.</b> Clasificación de las Reacciones Adversas a Alimentos. Documento de posición de la Academia Europea de Inmunología Clínica y Alergia. 1995.	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b> Clasificación de las reacciones adversas a alimentos de la Comisión de Nomenclatura de la EAACI refrendada por la WAO.	<b>30</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las enfermedades por hipersensibilidad a los alimentos según el mecanismo inmunológico implicado.	<b>30</b>
<b>Figura 3.</b> Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Carosella et al., 2005.	<b>44</b>
<b>Figura 4.</b> Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) y su interacción con Linfocitos T y Células NK. Tomado de <i>J.M. Fernández, M. Frías, L. Castro, J. Peña</i> . HLA-G y sus funciones. Inmunología en línea. 2000 <sup>42</sup> .	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en la región cromosómica 6p21.3. Tomado de Rincón y Manrique. 2006. <sup>45</sup>	<b>46</b>
<b>Figura 6.</b> Isoformas de HLA-G. Tomado de <i>J.M. Fernández, M. Frías, L. Castro, J. Peña</i> . HLA-G y sus funciones. Inmunología en línea. 2000 <sup>42</sup> .	<b>49</b>
<b>Tabla 3.</b> Elaboración de los Geles Separador y Concentrador de Poliacrilamida	<b>69</b>
<b>Figura 7.</b> Clasificación de grupos de estudio utilizados para el estudio.	<b>78</b>
<b>Tabla 4.</b> Descripción de los grupos de pacientes	<b>79</b>
<b>Tabla 5.</b> Datos descriptivos de carácter demográfico para el grupo de pacientes de estudio.	<b>81</b>
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de pacientes por grupo de estudio según sintomatología clínica.	<b>82</b>
<b>Tabla 7.</b> Relación entre pruebas cutáneas y grupos de estudio.	<b>82</b>
<b>Tabla 8.</b> Relación tipo de alérgeno y grupos de estudio.	<b>83 -84</b>
<b>Figura 8.</b> Detección de polimorfismo inserción/delección de 14 bp de HLA-G y alelo nulo 01:05N por PCR.	<b>85</b>

<b>Figura 9.</b> Determinación del doble polimorfismo en un paciente con alergia alimentaria no mediada por IgE.	<b>85</b>
<b>Figura 10.</b> Asociación de la sintomatología y el polimorfismo de 14 bp HLA-G en cada una de las muestras de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.	<b>86</b>
<b>Figura 11.</b> Asociación de la sintomatología y alelo nulo 01:05N HLA-G en cada una de las muestras de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.	<b>87</b>
<b>Figura 12. A)</b> Frecuencia del polimorfismo de 14 bp de HLA-G en todas las muestras de los grupos de estudio. <b>B)</b> Frecuencia del alelo nulo 01:05N de HLA-G en todas las muestras de los grupos de estudio.	<b>88</b>
<b>Tabla 9.</b> Frecuencia y porcentaje total del polimorfismo 14 bp HLA-G analizado en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.	<b>89</b>
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia y porcentaje total del alelo nulo 01:05N HLA-G, analizado en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.	<b>89</b>
<b>Figura 13.</b> Porcentaje total del polimorfismo de 14 bp de HLA-G analizado en las muestras de cada uno de los grupos de estudio. P valor <0.001.	<b>90</b>
<b>Figura 14.</b> Porcentaje total del alelo nulo 01:05N HLA-G, analizado en las muestras de saliva de cada uno de los grupos de estudio.	<b>91</b>
<b>Figura 15. A)</b> Frecuencia del tipo de polimorfismo de 14 bp ins/del de HLA-G. <b>B)</b> Recuento del del tipo de polimorfismo de 14 bp ins/del de HLA-G.	<b>92</b>
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de detección de la proteína soluble sHLA-G a partir de muestras de saliva de los grupos de estudio. P valor <0,001.	<b>94</b>
<b>Figura 17.</b> Determinación de la concentración de sHLA-G en pg/ml en las muestras de saliva de los grupos de estudio donde se observan las distintas concentraciones detectadas.	<b>95</b>
<b>Tabla 11.</b> Determinación de la concentración de la proteína HLA-G soluble (sHLA-G) realizada en las muestras de saliva en los diferentes grupos de estudio.	<b>95-96</b>

<b>Tabla 12.</b> Recuento del número de muestras positivas y negativas para el polimorfismo 14 bp de HLA-G en comparación con la detección de la proteína soluble HLA-G (sHLA-G) en saliva de controles y pacientes de los diferentes grupos de estudio.	<b>97</b>
<b>Tabla 13.</b> Recuento del número de muestras positivas y negativas para el alelo nulo 01:05N de HLA-G con respecto a la detección de la proteína soluble HLA-G (sHLA-G) en los distintos grupos de estudio	<b>98</b>
<b>Figura 18.</b> Determinación de la proteína HLA-G de 37 kD por la técnica Western Blot.	<b>99</b>
<b>Figura 19.</b> Determinación de la proteína HLA-G de 37Kd por la técnica Western Blot en muestras de pacientes con alergia alimentaria y sus controles. Se empleó como anticuerpo primario MEM-G/1 a dilución 1:500 y un anticuerpo secundario anti-mouse HRP en una dilución 1:1000 en tampón PBS-T con 5% de leche desnatada. C1-C3: Controles sanos, P1-P3: pacientes con alergia No IgE Mediada.	<b>100</b>
<b>Figura 20.</b> Determinación de la proteína $\beta$ -Actina por Western Blot en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y sus controles. En ésta figura podemos observar la cantidad de proteína en cada carril de las muestras y por lo tanto evidenciar la presencia de proteínas totales en cada uno de los carriles de las muestras, por lo tanto ésta proteína puede establecerse como control en cada una de nuestras muestras.	<b>101</b>
<b>Figura 21.</b> Porcentaje total de muestras donde se detecta la proteína HLA-G por la técnica Western Blot, en cada uno de los grupos de estudio. P valor <0,001.	<b>101</b>
<b>Tabla 14.</b> Características clínicas y demográficas de los pacientes del grupo IgE No Mediado y los controles. *p valor (Chi-cuadrado).	<b>103</b>
<b>Tabla 15.</b> Medida y desviación estándar (DS) de energía, proteínas, carbohidratos y consumo de grasa en pacientes y controles incluidos en el presente estudio.	<b>104</b>
<b>Figura 22.</b> Diversidad microbiana en muestras de controles y pacientes con alergia alimentaria IgE No Mediada en edad pediátrica.	<b>106</b>
<b>Tabla 16.</b> Lista de las OTU asociadas al estado de salud.	<b>107</b>



## RESUMEN

La alergia alimentaria o la hipersensibilidad alérgica a los alimentos se define como una serie de reacciones adversas causadas por mecanismos inmunológicos, mediados o no por la inmunoglobulina E (IgE), diferentes de la intolerancia alimentaria o respuesta alérgica de hipersensibilidad alimentaria causada por características fisiológicas específicas del huésped. Los procesos inflamatorios en la expresión de antígenos HLA-G se caracterizan por un polimorfismo alélico bajo, una distribución limitada del tejido y la presencia de isoformas ligadas a la membrana. La presencia de moléculas de HLA-G se ha asociado con funciones tolerogénicas en la respuesta celular innata y adaptativa, ya que los antígenos HLA-G son capaces de afectar la citotoxicidad de células NK y células T CD8+, CD4+ y maduración de células dendríticas. Por otra parte, el polimorfismo alélico del gen HLA-G (delección/inserción del polimorfismo de una secuencia de 14 pb en el exón 8 en la región 3' no traducida) y el alelo nulo 01:05N, se ha asociado con la generación de un mRNA inestable y una proteína sHLA-G de producción más baja, sugiriendo una funcionalidad diferente para contrarrestar la inflamación presente en las enfermedades alérgicas alimentarias.

## OBJETIVO

Determinar el polimorfismo inserción/delección de 14 pb de HLA-G en el exón 8, el alelo nulo 01:05N, la concentración de la proteína HLA-G soluble en cuatro grupos de estudio y a su vez determinar la microbiota intestinal en pacientes con alergia No IgE mediada en edad pediátrica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 157 muestras de saliva en 4 grupos de estudio: Controles Sanos, con alergia No IgE Mediada, IgE Mediada y grupo con otros procesos alérgicos. Se determinó el polimorfismo de delección/inserción de 14 pb y el alelo nulo 01:05N. Como control positivo se utilizó el gen GAPDH y la línea celular JEG-3. La extracción de ADN se llevó a cabo con el Kit QIAamp Mini Kit de Qiagen. La cuantificación de muestras de ADN se realizó en el equipo NanoDrop, y para la PCR se emplearon oligonucleótidos específicos que amplificaron los productos de PCR con un tamaño molecular de 226 bp y 240 bp o ambos, dependiendo de la inserción ó la delección de 14 pb en el exón 8 y de 223 bp para el alelo nulo. La valoración de la proteína se realizó con un ELISA empleando el Kit HLA-G ELISA de Exbio. El Western Blot se realizó con las muestras cuantificadas con el kit de medida de Proteínas BCA de Novagen. El gel de poliacrilamida usado fue al 10% de concentración de acrilamida/bisacrilamida. El anticuerpo primario de revelado de HLA-G fue el MEM-G/1 (1:500) de Exbio, y el anticuerpo secundario anti-IgG HRP anti-mouse (1:1000) de Merck Millipore. La secuenciación del DNA de las muestras fecales se realizó equipo Illumina MiSeq con configuración PE de 2x300. (Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Alemania).

## RESULTADOS

Se realizó la determinación de la delección/inserción polimórfica de 14 bp del exón 8 en 157 muestras de pacientes con alergia alimentaria No IgE mediada (n=35), IgE mediada (n=20), otros procesos alérgicos (n=45) y controles sanos (n=57). En el grupo No IgE mediado se encontró el polimorfismo INS/DEL de 14 bp de HLA-G en comparación con los demás grupos de estudio en cuales predominó el polimorfismo INS/INS. Además de la determinación de un doble polimorfismo. Por otra parte, se llevó a cabo la detección de sHLA-G soluble en muestras de saliva por ELISA y de la proteína HLA-G por Western Blot en cada uno de los grupos de estudio. Las isoformas completas son una glicoproteína de 37 kDa. La detección de la proteína HLA-G se

realizó en muestras representativas como controles positivos (línea celular JEG-3). En el grupo No IgE mediado, encontramos una disminución o ausencia de la proteína HLA-G y la concentración de ésta a nivel soluble en comparación con los demás grupos de estudio. Finalmente se realizó la evaluación de la microbiota intestinal en n=17 de pacientes con FPIES del grupo No IgE mediado, donde se determinaron varias especies pertenecientes a las *Ruminococcaceae* (*F. prausnitzii*, *R. champanellensis*, *L. butyric producens*), *Lactobacillaceae hominis*, y *Leuconostocaceae* (*W. confusa*) que se encontraron en mayor proporción en los individuos control, mientras que especies como *Eubacterium hallii* y *Blautia spp*, especies pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*, fueron más abundantes en pacientes con alergia alimentaria no mediada por IgE.

## CONCLUSIONES

La delección/inserción del polimorfismo de 14 bp en el exón 8 HLA-G y el alelo nulo 01:05N inducen la disminución de la expresión, y posiblemente la funcionalidad de la proteína soluble sHLA-G. La correlación entre la determinación a nivel genético del de HLA-G con la disminución en la detección de la proteína soluble sHLA-G se evidenció principalmente en el grupo de alergia No IgE mediado. El estudio de la microbiota intestinal y la concentración del sHLA-G en éste grupo de pacientes citados anteriormente nos permitió establecer el HLA-G como un posible biomarcador en la evolución de la enfermedad alérgica alimentaria.



# ***I.INTRODUCCIÓN***





## **1. PERSPECTIVA CLÍNICA**

### **1.1 Sistema inmune**

Históricamente, inmunidad significa protección frente a la enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune; constantemente, nuestro organismo está expuesto a microorganismos (bacterias, virus, hongos y parásitos) que se encuentran en la piel, boca, vías respiratorias, intestino, incluso en los ojos. Muchos de estos agentes son capaces de originar enfermedades graves si invaden los tejidos más profundos. Además, estamos expuestos en forma intermitente a otras bacterias y virus del ambiente (distintos de los que suelen encontrarse en nuestro organismo) que pueden causar enfermedades como neumonía, fiebre tifoidea, etc<sup>1</sup>.

Afortunadamente, nuestro organismo tiene un sistema especial para combatir los diferentes agentes infecciosos y tóxicos, el sistema inmune, constituido fundamentalmente por los leucocitos (o glóbulos blancos) y las células de los tejidos originalmente procedentes de ellos. Los leucocitos son las unidades móviles del sistema de defensa del organismo, y tienen una capacidad especial para buscar y destruir cualquier invasor extraño. Además de los leucocitos, el sistema inmunitario está constituido por otros elementos de defensa, tales como la piel y mucosas, sustancias antimicrobianas y otros mecanismos inmunes responsables de la respuesta inmune.

### **1.2 Respuesta inmunitaria**

Los mecanismos de la inmunidad humana pueden ser agrupados en dos grandes categorías: el sistema inmune innato o inespecífico, que provee una primera defensa y de carácter general contra cualquier elemento reconocido como extraño, y el sistema inmune adquirido o específico que reconoce agentes amenazantes específicos y genera una respuesta dirigida contra dichos esos elementos.

Los mecanismos de las respuestas inmunitarias innata y específica forman un sistema integrado de defensa en el huésped en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. Las respuestas inmunitarias

específicas se adquieren habitualmente tras la exposición de un individuo a un agente extraño. Los mecanismos que actúan en este tipo de respuestas son de dos tipos dependiendo del componente del sistema que participa en la respuesta. Cuando la respuesta inmunitaria específica actúa mediante moléculas (anticuerpos) que reconocen y eliminan los agentes extraños (antígenos), recibe el nombre de inmunidad humoral. Mientras que cuando participan los linfocitos T, la respuesta se denomina inmunidad celular. Todas las respuestas inmunitarias se inician con el reconocimiento de los antígenos extraños, lo que origina la activación de los linfocitos que reconocen específicamente al antígeno y termina en el desarrollo de mecanismos que median la función fisiológica de la respuesta, es decir la eliminación del antígeno. Así, la respuesta inmunitaria puede dividirse desde el punto de vista funcional en tres fases: la fase de reconocimiento del antígeno, la fase de activación de la respuesta, y la fase efectora.

### **1.3 Células del Sistema Inmune**

Las células del sistema inmune son los leucocitos o glóbulos blancos. A diferencia de los hematíes y las plaquetas, los leucocitos son células completas provistas de membrana, citoplasma y núcleo, en las que es posible distinguir al microscopio diversos tipos morfológicos, cada uno de los cuales posee una actividad concreta dentro de la función defensiva<sup>1</sup>. Los leucocitos que normalmente se encuentran en la sangre periférica son de tres tipos: Granulocitos o polimorfonucleares, linfocitos y monocitos.

### **1.4 Anticuerpos**

Los anticuerpos siempre inician sus efectos biológicos al unirse a los antígenos. Estas moléculas son producidas por los linfocitos B y actúan como receptores para el antígeno. La interacción del antígeno con los anticuerpos de membrana de las células B constituye la fase de reconocimiento de la inmunidad humoral. Los anticuerpos también se producen en una forma secretada por la progenie de células B que se diferencia en respuesta a la estimulación antigénica. Estos anticuerpos secretados se unen al antígeno y desencadenan varias de las funciones efectoras del sistema inmunitario. Aunque los anticuerpos se aislaron inicialmente a partir de la porción líquida de la sangre, se pueden encontrar en diferentes localizaciones anatómicas:

Los anticuerpos están presentes dentro de compartimentos unidos a la membrana citoplasmática (retículo endoplásmico y complejo de Golgi) y sobre la superficie de los linfocitos B. Están presentes en el plasma (porción líquida) de la sangre y, en menor proporción, en el líquido intersticial de los tejidos donde se acumulan los anticuerpos secretados por las células B y están unidos a la superficie de determinadas células inmunitarias efectoras, como los fagocitos mononucleares, células citotóxicas naturales y mastocitos, que no sintetizan anticuerpos, pero poseen receptores específicos para unir anticuerpos. A las clases de anticuerpos también se les denomina isotipos y en el hombre se llaman IgA, IgD, IgE, IgG e IgM<sup>1</sup>.

### **1.5 Citocinas**

Las citocinas son la defensa frente a organismos extraños de ambos tipos de inmunidad (inespecífica y específica) están mediadas en gran medida por una hormonas proteicas llamadas citocinas. En la inmunidad innata, las citocinas efectoras son producidas principalmente por los fagocitos mononucleares, y por eso se llaman habitualmente monocinas. Las monocinas provocan reacciones inflamatorias ricas en neutrófilos que sirven para contener y, si es posible, erradicar las infecciones microbianas. Aunque la secreción de monocinas puede ser desencadenada directamente por los microorganismos, también son secretadas por los fagocitos mononucleares en respuestas a las células T estimuladas por el antígeno, es decir, como parte de la inmunidad específica. La mayoría de las citocinas de la inmunidad específica son producidas por los linfocitos T activados, y tales moléculas se llaman generalmente citocinas. Debido a que muchas de estas citocinas son producidas por ciertas poblaciones de leucocitos sanguíneos y actúan sobre otras poblaciones de leucocitos, estas moléculas también reciben el nombre de interleucinas. Este término no debe emplearse para indicar que las citocinas son sintetizadas o actúan sobre los leucocitos<sup>1</sup>.

### **1.6 Complejo Mayor de Histocompatibilidad**

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es una región de genes muy polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de varias células. Los genes del MHC desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos, ya que los linfocitos T específicos para un

antígeno no lo reconocen en su forma libre ni en forma soluble, sino que reconocen porciones de los antígenos proteicos unidos a productos génicos del MHC. En otras palabras, las moléculas del MHC proporcionan un sistema para presentar péptidos antigénicos a las células T. Hay dos tipos diferentes de productos de los genes del MHC llamados moléculas de clase I y clase II<sup>1</sup>.

### **1.7 Respuesta Inmunitaria**

La generación de respuestas inmunitarias específicas se produce habitualmente tras la exposición de un individuo a un antígeno. El tipo de inmunidad inducida por este proceso de inmunización es denominada inmunidad activa porque el individuo inmunizado desempeña un papel activo en la respuesta al antígeno. La inmunidad específica también puede ser conferida a un individuo transfiriéndole células o suero de un individuo previamente inmunizado<sup>1</sup>. El receptor de esta transferencia se vuelve inmune frente a ese antígeno particular sin haber estado expuesto nunca a él, o sin haber respondido nunca a ese antígeno. Por lo tanto, esta forma de inmunidad se llamó inmunidad pasiva. La inmunización pasiva es un método útil para transmitir rápidamente resistencia sin tener que esperar a que se ponga en marcha una respuesta inmunitaria activa.

### **1.8 Fase de Reconocimiento**

La fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria consiste en la unión de antígenos extraños a receptores específicos de los linfocitos maduros, que están presentes antes de la exposición, al antígeno. Los linfocitos B, células de la inmunidad humoral, expresan en su superficie moléculas de anticuerpos que pueden unirse a proteínas extrañas, polisacáridos, lípidos, y otras sustancias extracelulares o unidas a células. Los linfocitos T, responsables de la inmunidad mediadas por células, expresan receptores que reconocen únicamente pequeñas secuencias peptídicas de antígenos proteicos. Además, los linfocitos T tienen la propiedad única de reconocer y responder sólo a antígenos peptídicos que se encuentran sobre la superficie de otras células.

### 1.9 Fase de Activación

La fase de activación de la respuesta inmunitaria es la secuencia de acontecimientos inducidos en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento de un antígeno específico. Todos los linfocitos sufren dos cambios principales como respuesta a los antígenos. Primero, proliferan, lo que provoca la expansión de clones específicos de linfocitos y la amplificación de la respuesta protectora. Segundo, la progenie de los linfocitos estimulados por el antígeno se diferencia bien en células efectoras que eliminan el antígeno, o bien en células de memoria que recirculan preparadas para responder a una nueva exposición al antígeno<sup>1</sup>. Los diversos tipos de linfocitos se diferencian en distintas células efectoras. Tras la estimulación por el antígeno específico, los linfocitos B se diferencian en células secretoras de anticuerpos, y el anticuerpo secretado se une al antígeno y dispara los mecanismos que lo eliminan. Algunos linfocitos T se diferencian en células que activan fagocitos para matar microorganismos intracelulares, y otros lisan directamente las células que están produciendo los antígenos extraños, por ejemplo, proteínas virales. La capacidad de las células T para reconocer antígenos asociados a células hace posible que la inmunidad mediada por células sea efectiva contra microorganismos intracelulares. Una característica general de la activación de linfocitos es que habitualmente requiere dos tipos de señales: la primera la proporciona el antígeno, y la segunda las células que pueden ser colaboradoras o células accesorias. La fase efectora de la respuesta inmunitaria es el estadio en el que los linfocitos que han sido activados por los antígenos desarrollan las funciones que conducen a la eliminación de éstos. Los linfocitos que actúan en la fase efectora de la respuesta inmunitaria reciben el nombre de células efectoras. Muchas de las funciones efectoras requieren la participación de otras células no linfoides y de mecanismos de defensa que son igualmente mediadores de la inmunidad innata<sup>1</sup>.

Los anticuerpos también activan un sistema de proteínas plasmáticas llamado complemento, que participa en la lisis y fagocitosis de microorganismo. Los linfocitos T activados secretan unas hormonas proteicas llamadas citocinas, que aumentan la actividad de los fagocitos y estimulan la respuesta inflamatoria. Los fagocitos, el complemento, los mastocitos, las citocinas y los

leucocitos que median la inflamación son todos componentes de la inmunidad innata, ya que no reconocen específicamente ni distinguen entre diferentes antígenos extraños y todos están implicados en la defensa contra microorganismos, incluso sin respuesta inmunitaria específica.

### **Regulación de la respuesta inmune.**

Una de las características primordiales de la respuesta inmunitaria es su autolimitación, debido a que estas respuestas declinan con el tiempo tras la inmunización<sup>1</sup>. La principal razón para esta autolimitación es que toda respuesta inmunitaria elimina el antígeno que ha iniciado la respuesta y así destruye la señal primaria necesaria para la activación linfocitaria. También se ha mencionado frecuentemente que las respuestas inmunitarias son cuantitativa y cualitativamente heterogéneas, es decir, diferentes tipos de microorganismos y otros antígenos tienden a estimular respuestas con distintas características, y algunas formas de exposición al antígeno pueden ser inhibitoras en lugar de estimuladoras. Se ha demostrado que la administración de antígenos extraños puede inhibir en lugar de estimular a los linfocitos específicos. La razón de ello es que el sistema inmunitario ha desarrollado mecanismos cuyo principal papel es inhibir las funciones de activación y las funciones efectoras de los linfocitos. Los dos mecanismos inhibitorios principales en el sistema inmunitario son la tolerancia inmunológica y la inducción de células reguladoras o supresoras<sup>2</sup>.

La tolerancia inmunológica es el fenómeno de la inactivación funcional inducida por el antígeno o la muerte de linfocitos específicos, dando lugar a la incapacidad de un organismo para responder frente a ese antígeno. Es decir, que la tolerancia es la falta de respuesta inmunológica.

La tolerancia frente a los antígenos propios (autotolerancia) es mantenida en parte mediante la eliminación de linfocitos que expresan receptores específicos para estos antígenos propios, y en parte, por inactivación de la función de los linfocitos que han sido estimulados después de contactar con antígenos propios<sup>2</sup>.

En la anafilaxia, la reacción se produce en áreas extensas del sistema vascular y en los tejidos cercanos con manifestaciones sistémicas, tras haberse inyectado un alérgeno específico en la circulación. La dosis del antígeno capaz de producir una reacción de este tipo puede ser sumamente pequeña, como por ejemplo, las dosis mínimas usadas en pruebas cutáneas para el diagnóstico de distintas formas de alergia. Al cabo de unos minutos de introducir en el torrente sanguíneo un antígeno, pueden aparecer manifestaciones leves como prurito, habones y eritema cutáneo; luego el cuadro se intensifica apareciendo una intensa contracción del músculo liso bronquial desarrollando insuficiencia respiratoria, que es agravado por el intenso edema laríngeo producto de vasodilatación y aumento de la permeabilidad local. La vasodilatación y aumento de la permeabilidad también ocurren en forma sistémica y pueden llevar a una pérdida severa de plasma sanguíneo conduciendo al shock circulatorio que puede originar la muerte del paciente en minutos.

## 2. ALERGIAS ALIMENTARIAS

La alergia alimentaria a los alimentos se define como una reacción adversa inmunológica que supone una respuesta anómala frente a la ingestión de alimentos. La alergia a los alimentos ocurre en individuos genéticamente predispuestos en los que la tolerancia oral no se desarrolla correctamente o se rompe una vez establecida<sup>2</sup>.

Se define como reacciones adversas a alimentos cualquier reacción anómala producida por la ingestión de un alimento. Tales reacciones pueden ser de naturaleza tóxica, considerándose así aquellas que puedan afectar a cualquier individuo cuando se administra una dosis suficiente y no tóxica, siendo estas últimas las que dependen de una susceptibilidad individual<sup>2</sup>.

En las reacciones de intolerancia y las tóxicas las manifestaciones clínicas que producen son más intensas cuanto mayor sea la cantidad de alimento ingerido, pudiendo ocurrir en cualquier individuo, siempre que ingiera el alimento en cantidad suficiente. Esta relación dosis-respuesta puede no existir en las reacciones alérgicas, de tal forma que, dosis muy pequeñas pueden dar lugar a

una respuesta clínica exagerada. De forma más clara podemos ver las diferencias y similitudes entre reacciones alérgicas, reacciones de intolerancia y reacciones tóxicas a alimentos en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Diferencias y similitudes entre reacciones alérgicas, reacciones de intolerancia y reacciones tóxicas a alimentos. AVPAP. 2008.

	<b>Alergia</b>	<b>Intolerancia</b>	<b>Reacción tóxica</b>
<b>Dependencia de factores del alimento</b>	-	-	+
<b>Dependencia de factores del individuo</b>	+	+	-
<b>Patogenia</b>	Inmunológica	No inmunológica	
<b>Ejemplos</b>	Urticaria Anafilaxia Enteropatía Colitis	Intolerancia a lactosa Favismo Galactosemia Fenilcetonuria	Escombroidosis Latirismo Botulismo Síndrome de aceite tóxico

Las reacciones adversas a alimentos en las que se sospecha o identifica mecanismo inmunológico implicado, se denominaban alergias alimentarias; mientras que las reacciones adversas a alimentos no mediadas por mecanismo inmunológico, se llaman intolerancias, y su mecanismo etiopatogénico puede ser muy diverso. Todos los alimentos pueden ser potencialmente sensibilizantes, es decir, que tras su ingestión, puede ocasionar una reacción adversa de tipo alérgico; sin embargo, un pequeño grupo de alimentos son los responsables de la mayoría de las mismas. Determinadas reacciones adversas a alimentos específicos puede depender de la edad de los pacientes y de los hábitos alimentarios de una población concreta. No debemos olvidar que los alimentos implicados en dichas reacciones son los más consumidos, y que las diferentes sensibilizaciones suelen aparecer en el mismo orden de

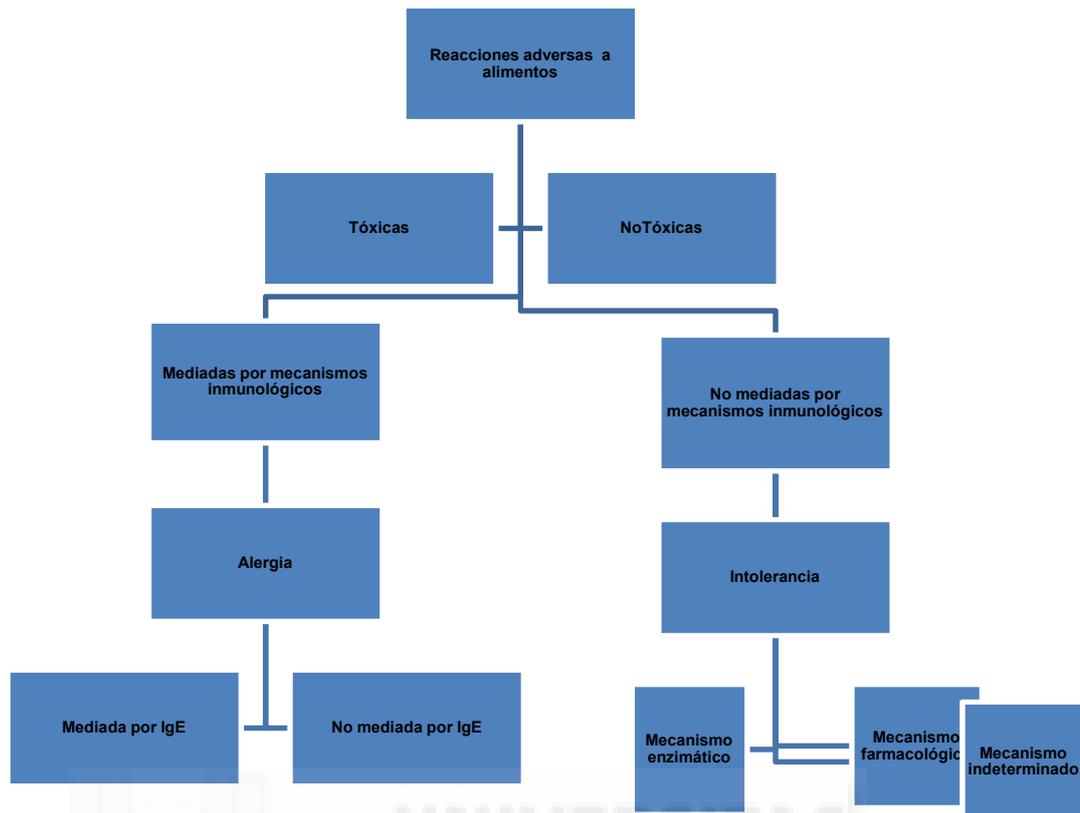
incorporación de los alimentos a la dieta del niño. Así, en nuestro entorno, el huevo (concretamente las proteínas de la clara), la leche, en forma de fórmulas adaptadas, y el pescado son los tres alimentos que, por ese orden, generan mayor número de reacciones de hipersensibilidad en los primeros años de vida<sup>2</sup>. Por el contrario, en el niño mayor predominan las sensibilizaciones a vegetales como frutos secos, frutas, leguminosas, y también a pescados y mariscos.

Se considera reacción adversa a un alimento cualquier respuesta clínicamente anormal que se pueda atribuir a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, de sus derivados o de un aditivo contenido en el mismo. Esta definición es tan amplia que, a su vez, engloba reacciones y situaciones clínicas muy diversas con diferentes mecanismos de producción. En estos conceptos no se incluye la que se ha dado en conocer como aversión alimentaria, que incluye aquellos casos de rechazo y de intolerancia psicológica en los que la reacción desagradable está provocada por emociones asociadas a un alimento, pero que no es reproducible cuando el alimento está enmascarado<sup>2</sup>.

Las reacciones adversas a alimentos (RAA) se clasifican en dos grandes grupos:

**Tóxicas:** En las que la respuesta clínica es independiente del propio individuo. Se producen como consecuencia de la ingesta de una sustancia tóxica, ya sea el propio alimento, generada por el mismo o añadida al alimento.

**No tóxicas:** En las que la respuesta clínica es dependiente del individuo. Las reacciones no tóxicas se subdividían a su vez según su patogenia, fuera o no inmunológica<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Clasificación de las Reacciones Adversas a Alimentos. Documento de posición de la Academia Europea de Inmunología Clínica y Alergia. 1995.

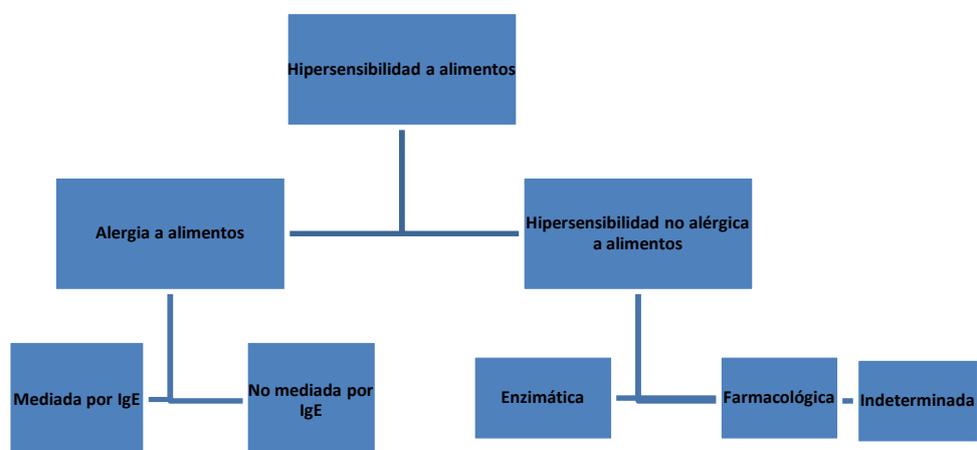
Los componentes de los alimentos causantes de las reacciones alérgicas son las proteínas<sup>2</sup>. En el caso de la leche de vaca, las proteínas que con más frecuencia producen alergia son la Caseína, la Alfa-lactoalbúmina y la Beta-lactoglobulina; y en el huevo, la ovoalbúmina y el ovomucoide, en los crustáceos o las tropomiosinas.

Algunas de estas proteínas pueden estar presentes en alimentos de diversas fuentes, de forma que podemos observar pacientes que son posiblemente alérgicos a múltiples alimentos, pero sin embargo sólo son alérgicos a una sola proteína presente en todos esos alimentos. En estos casos se habla de reactividad cruzada<sup>2</sup>. Algunos pacientes con alergia alimentaria pueden presentar alergia a alérgenos respiratorios que son similares a los alérgenos alimentarios como ocurre en el síndrome polen-frutas. Los alimentos vegetales

son la causa más frecuente de alergia a alimentos a partir de los 5 años de edad, donde los más frecuentemente implicados son las frutas y frutos secos, seguidos en nuestro país de las legumbres y hortalizas frescas. En los pacientes alérgicos a frutas y hortalizas es muy frecuente encontrar sensibilizaciones simultáneas a otros alimentos vegetales, de la misma familia o no relacionados, aunque no todas ellas tienen manifestación clínica<sup>2</sup>.

Los cuatro grupos mejor conocidos son los alérgenos homólogos de Bet v1, las profilinas, las proteínas transportadoras de lípidos (LTP) y las proteínas de almacenamiento (2S albúminas y 7S/11S globulinas). Los alérgenos homólogos de Bet v1 (alérgeno principal del polen de abedul) son un grupo de proteínas de defensa (PRP-10) de 17 kDa de peso molecular, que se comportan como alérgenos mayoritarios en los pacientes del norte y centro de Europa que presentan alergia a alimentos. Las profilinas son proteínas altamente conservadas en todos los organismos eucarióticos, presentes en pólenes y en una gran variedad de alimentos vegetales<sup>12</sup>. Tienen un peso molecular de 14 kDa, y presentan una alta homología en sus estructuras y una importante reactividad cruzada entre ellas. La presencia de IgE anti-profilina amplía el espectro de sensibilizaciones a alimentos vegetales detectadas mediante pruebas cutáneas y/o test *in vitro*<sup>2</sup> en pacientes. Las LTPs son una familia de polipéptidos de 9 kDa de peso molecular, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, e implicados en la formación de la cutícula y en la defensa frente a patógenos (PRP-14). Son termoestables y resistentes a la digestión con pepsina, lo que las convierte en potentes alérgenos alimentarios y explica la frecuente aparición de clínica sistémica como urticaria y anafilaxia. Se han identificado también LTPs en otros alimentos vegetales y en pólenes, y se ha demostrado un notable grado de reactividad cruzada entre ellas, lo que puede explicar (junto a la profilina) la frecuencia de personas sensibilizadas a alimentos vegetales en el área mediterránea<sup>2</sup>. En otras ocasiones las sensibilizaciones alimentarias y respiratorias son independientes y hablamos de co-sensibilización. Las proteínas de almacenamiento o de reserva son un importante grupo de proteínas de las plantas, principalmente de semillas, cuya función primordial es el suministro de nutrientes durante la germinación. Las fuentes alimentarias que contienen estas proteínas de reserva alergénicas son

los cereales, legumbres, frutos secos y especias. Las reacciones alérgicas es pacientes sensibilizados a estas proteínas pueden ser muy graves, incluyendo la anafilaxia<sup>12</sup>.



**Figura 2.** Clasificación de las reacciones adversas a alimentos de la Comisión de Nomenclatura de la EAACI refrendada por la WAO.

Afectación	Mediadas por IgE	Mediadas por IgE y células	Mediadas por células
Cutánea	Urticaria, Angioedema	Dermatitis atópica	Dermatitis de contacto, Dermatitis herpetiforme
Gastrointestinal	SAO, Síntomas gastrointestinales agudos	Esofagitis eosinofílica, Gastroenteritis eosinofílica	Enterocolitis, Proctitis, Enteropatía, Enfermedad celíaca
Respiratoria	Riniconjuntivitis, Broncoespasmo	Asma	Hemosiderosis pulmonar
Generalizada	Anafilaxia		

**Tabla 2.** Clasificación de las enfermedades por hipersensibilidad a los alimentos según el mecanismo inmunológico implicado.

En los últimos años se ha propuesto una clasificación de la alergia frente a los alimentos, según los mecanismos de la respuesta inmunitaria implicados, en alergia mediada por IgE y no mediada por IgE<sup>2</sup>. Esta división, nos permite definir los diferentes mecanismos patogénicos que se activan en la respuesta inmune frente a un alimento. Las reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos de clase IgE se tienen suficientes y validadas pruebas de diagnóstico que permiten reconocer el alimento implicado la reacción y el mecanismo inmunológico subyacente. En el caso de las reacciones no mediadas por IgE, el conocimiento actual sobre su patogénesis es incompleto. En algunas entidades, como las enteropatías inducidas por proteínas de alimentos, se describe un mecanismo celular, pero sólo se puede establecer la asociación etiológica con un alimento mediante el diagnóstico clínico. Por otra parte, en ciertas entidades, como la esofagitis eosinófilica, la dermatitis atópica o el asma parecen existir mecanismos patogénicos superpuestos en los que, en muchas ocasiones se pueden establecer una sensibilización mediada por IgE frente a determinados alimentos y un mecanismo celular, aunque, de nuevo, la implicación del alimento solo se puede realizar por la observación clínica. No se dispone de pruebas de diagnóstico en éstas enfermedades, en particular gastrointestinales, que pongan de manifiesto el alimento y el mecanismo implicado. En muchos casos el diagnóstico es exclusivamente clínico, y la relación con el alimento se sustenta por dietas de eliminación y provocación con los alimentos implicados. En algunas ocasiones es precisa la endoscopia o la biopsia intestinal para llegar al diagnóstico.

### **2.1 Reacción Adversa a un alimento:**

Consiste en la respuesta clínica anormal que se presentan determinados individuos, atribuida a la ingestión de un alimento (o aditivo), el cual es perfectamente tolerado por la gran mayoría de las personas. Se trata por tanto de un concepto amplio que abarca todo tipo de anomalía, sin dejar constancia de su mecanismo.

### **2.2 Alergia o hipersensibilidad Alimentaria:**

Es la reacción adversa que presenta un individuo tras la ingestión de un alimento de causa inmunológica comprobada. Se produce sólo en algunos

individuos previamente sensibilizados y puede ocurrir después de la exposición a muy pequeñas cantidades de alimento.

### **2.3 Intolerancia alimentaria:**

Es la respuesta clínica a un alimento en cuyo mecanismo de producción no interviene, o no ha podido demostrarse, un mecanismo inmunológico. Puede incluir respuestas de tipo farmacológico, metabólico o de idiosincrasia.

### **2.4 Anafilaxia alimentaria:**

Corresponde a la reacción inmunológica de hipersensibilidad ocasionada por un alimento y mediada por anticuerpos de la clase IgE y liberación de mediadores. Es sinónimo de hipersensibilidad o alergia inmediata. Se trata de una reacción muy grave y puede poner en peligro la vida.

### **2.5 Anafilaxia alimentaria No IgE mediada:**

Denominada anteriormente Reacción Anafiláctica Anafilactoide. Es la reacción ocasionada por el alimento, clínicamente similar a la anafilaxia y ocasionada por una liberación de mediadores químicos no inmunológicos (no IgE mediado).

### **2.6 Intoxicación alimentaria:**

Es el efecto indeseable causado por la acción de un alimento o aditivo, sin la intervención de mecanismo inmunitario alguno, que puede resultar tóxico cuando se consume en grandes cantidades. Las toxinas pueden encontrarse en los propios alimentos o ser liberadas por microorganismos contaminantes.

### **2.7 Intoxicación alimentaria por contaminación alimentaria:**

Es el efecto ocasionado por alimentos contaminados por agentes infecciosos y toxinas microbianas, por la polución ambiental o por el uso inadecuado de productos químicos agrícolas.

### **2.8 Idiosincrasia alimentaria:**

Es la respuesta cualitativa y cuantitativamente anormal a un alimento o a un aditivo, no relacionada con sus acciones fisiológicas o farmacológicas y cuya patogenia no es inmunológica. Aparece en determinados grupos de personas que pueden estar genéticamente predispuestas<sup>8</sup>.

**2.9 Reacción Alimentaria Farmacológica:**

Es la que se produce ante un alimento o aditivo y los productos químicos naturales o añadidos que producen un efecto farmacológico en el individuo. Suele desencadenarse por la acción de alimentos que contienen aminas.

**2.10 Reacción Alimentaria Metabólica:**

Es la reacción adversa ante un alimento o aditivo, ocasionada por su acción sobre el metabolismo del individuo. Suele presentarse por diversas causas no inmunológicas, como la administración simultánea de ciertos fármacos, errores innatos del metabolismo y deficiencias enzimáticas.

**2.11 Síntomas de la alergia alimentaria**

Hay que tener en cuenta que un mismo alérgeno alimentario no produce siempre la misma sintomatología y que la intensidad puede variar, por lo que aunque las reacciones sufridas con anterioridad fueran leves, se pueden producir reacciones más graves sin motivo aparente.

La cantidad de alimento que provoca una reacción también varía en cada paciente, desde trazas hasta cantidades bastante elevadas.

Los valores de IgE específica frente a los alimentos tampoco guardan relación con los síntomas, hay casos de reacciones graves con valores no muy altos y con esas mismas cifras otro paciente puede tolerar el alimento.

**2.11.1 Síntomas digestivos:**

- El Síndrome de Alergia Oral: picor de boca, lengua y garganta, que coincide con la ingestión de alimentos, sobre todo frutas y hortalizas frescas, marisco, etc.
- Vómitos, diarrea, dolor abdominal, de aparición e intensidad variable, dependiendo del alimento involucrado, y del grado de afectación del aparato digestivo.

**2.11.2 Síntomas Cutáneos:**

- Lesiones eritematosas, urticaria y habones en zona de contacto (bien sea por contacto directo con el alimento o indirecto por contacto con

personas que los hayan consumido) con afectación de párpados, manos, o afectación generalizada.

- La dermatitis atópica (DA) puede ser exacerbada por alimentos como en el caso de las proteínas de la leche de vaca, o de huevo. En estos casos el papel de los alimentos es difícil de evaluar.
- Existen dermatitis por contacto con alimentos. Se trata de dermatitis de contacto proteicas, que se producen habitualmente en el entorno laboral en manipuladores de alimentos<sup>2</sup>.

### 2.11.3 Síntomas respiratorios:

También se han descrito en relación con la alergia alimentaria casos de hiperreactividad bronquial, con reacciones asmáticas, rinoconjuntivales (estornudos, picor nasal y ocular, lagrimeo y congestión nasal). Estos síntomas se pueden producir de forma aislada o bien en el contexto de reacciones generalizadas.

### 2.12. Anafilaxia:

Es la reacción más grave, y que requiere una intervención inmediata. Habitualmente se producen síntomas cutáneos respiratorios, hipotensión ó generales además de la sintomatología digestiva. En ocasiones se requiere la presencia de otros factores, como la realización de ejercicio físico, o la toma previa de anti-inflamatorios no esteroideos además del alérgeno alimentario.

### 2.13. Tipos de reacciones alérgicas alimentarias

La cronología de las reacciones alérgicas a alimentos varía dependiendo del mecanismo implicado en la reacción inmune causante de la reacción<sup>2</sup>.

- **Inmediatas:** se producen al cabo de pocos minutos de ingerir el alimento (menos de 30 minutos), por lo que la relación causa-efecto suele estar muy clara. Es el caso, por ejemplo del Síndrome de Alergia Oral, inducido por la ingestión de melocotón. Se detecta la existencia de anticuerpos IgE específicos frente a los alimentos responsables y con cierta frecuencia las reacciones pueden ser

graves. También se pueden producir otros síntomas como urticaria, angioedema, vómitos o anafilaxia.

- **Diferidas:** suelen comenzar al menos 2 horas tras la ingestión del alimento y en ocasiones pueden aparecer al cabo de 24-48 horas. En general este tipo de reacciones únicamente producen síntomas digestivos (diarrea), y no suelen detectarse anticuerpos IgE específicos.
- **Tardías:** aparecen varios días después de la ingestión del alimento. El síntoma más frecuente en este caso es el empeoramiento de los cuadros de dermatitis atópica.

#### 2.14. Diagnóstico

Es necesario un apropiado diagnóstico alergológico, porque dependiendo de los alimentos implicados y del tipo de reacción (con o sin anticuerpos IgE específicos) es posible:

- Predecir la posibilidad de reacciones cruzadas con otros alimentos naturales o manufacturados.
- Prevenir la severidad de futuras reacciones.
- Hacer un pronóstico sobre la posibilidad de remisión
- Instaurar el tratamiento más adecuado, puesto que dependiendo del mecanismo el tratamiento dietético puede diferir notablemente
- La posibilidad de una reacción aguda grave puede requerir unas recomendaciones terapéuticas muy precisas.

También hay que señalar que con frecuencia la alergia alimentaria constituye el primer paso de la llamada *Marcha Alérgica*, de manera que es frecuente que pacientes que comienzan con alergia alimentaria terminen desarrollando otras enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, asma)<sup>8</sup>.

El diagnóstico de la alergia alimentaria incluye dos objetivos:

- Identificar el/o los alimentos responsables.

- Comprobar, si es posible, el mecanismo inmunológico responsable de la reacción.

### Etapas del diagnóstico de la alergia alimentaria

- En la primera se trata de identificar y relacionar la clínica del paciente con el/los alimentos. Se basa en la realización de la historia clínica del paciente y en una exploración física que orientarán sobre las pruebas a realizar. En la segunda etapa se trata de identificar sensibilización alérgica frente a alimentos. Para ello se realizan pruebas cutáneas con un extracto proteico realizado con la materia prima que se sospecha, o directamente mediante técnica prick-prick (que consiste en picar el alimento con la lanceta y seguidamente realizar la prueba en la piel). Estas pruebas se pueden complementar con la determinación en sangre de anticuerpos IgE específicos frente al alimento.
- En una tercera etapa, puede considerarse necesaria la realización de una prueba de provocación controlada con alimento con el fin de establecer un diagnóstico definitivo al establecer que la sensibilización frente a determinado alimento es la responsable de los síntomas del paciente. En ocasiones se trata de pruebas de tolerancia para comprobar que la toma de un alimento no desencadena problemas. En cualquier caso estas pruebas serán indicadas y realizadas por especialistas entrenados específicamente y siempre en un medio hospitalario.

### **2.15. Evolución de la alergia alimentaria**

Las alergias alimentarias con frecuencia terminan desapareciendo, pero esto depende en gran medida del alimento implicado, de la edad del paciente y de la severidad del problema<sup>8</sup>.

- Es más probable que desaparezca una alergia a la leche de vaca que una alergia al pescado o a los frutos secos.
- También es más probable que desaparezca una alergia alimentaria en niños pequeños que en adolescentes o adultos.

- Es más probable que desaparezcan alergias causantes de reacciones leves que los casos graves.

## 2.16. Tratamiento

- Identificar con precisión los alimentos responsables.
- El especialista deberá indicar con la mayor exactitud posible el tratamiento, el pronóstico, y el riesgo de eventuales reacciones agudas como consecuencia de una ingestión inadvertida del alimento en cuestión.
- El tratamiento eficaz para prevenir la alergia a alimentos es la estricta eliminación del alimento implicado de la dieta; en el caso de tener que hacer una dieta de eliminación muy amplia, habrá que buscar alimentos sustitutivos con el fin de confeccionar una dieta que cubra los requerimientos nutricionales de la persona afectada.
- En los casos graves hay que tener especial cuidado con la alimentación, pues muchos alimentos alergénicos pueden aparecer en numerosos productos de forma enmascarada o con denominaciones desconocidas y pueden ser ingeridos inadvertidamente.
- Igualmente se deben extremar las precauciones en la manipulación y cocción de los alimentos.
- En el caso de reacciones potencialmente graves el especialista debe proporcionar instrucciones precisas respecto a la manera de proceder, el tratamiento de urgencia y otras indicaciones sobre la necesidad de acudir a los servicios médicos de Urgencias.
- Es conveniente repetir periódicamente la exploración alergológica, con el fin de ir valorando la evolución del problema.

En ocasiones se recomienda la anotación diaria de los alimentos ingeridos y los síntomas experimentados con el fin de detectar los alimentos o el alimento que producen la intolerancia alimentaria

También es importante evidenciar factores desencadenantes (cofactores) que puedan facilitar o agravar las reacciones alérgicas alimentarias. Entre estos

cofactores está la realización de ejercicio físico, la toma de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y la ingesta concomitante de bebidas alcohólicas<sup>2</sup>.

La realización de dietas restrictivas, que sólo incluyen una serie limitada de alimentos muy poco alergénicos. Estas dietas se mantienen durante un periodo variable de tiempo hasta conseguir la estabilidad clínica del paciente y paulatinamente se van introduciendo los alimentos objetivando la respuesta. Estas dietas generalmente se conocen como dietas de exclusión y son útiles tanto para alergias como intolerancias alimentarias. Estas dietas necesitan una estrecha supervisión nutricional.

### **3. MICROBIOTA INTESTINAL**

En la hipersensibilidad, las no dependientes de IgE frente a alimentos se han atribuido a una alteración de la inmunidad celular en ausencia de IgE específica frente al alérgeno. Afectan al tracto gastrointestinal y han aumentado en incidencia en los últimos años, aunque hasta ahora su patogénesis es desconocida y los estudios endoscópicos en pacientes no han dado resultados concluyentes<sup>12</sup>. Tienen consecuencias clínicas graves, como ocurre en el síndrome de enterocolitis producida por alimentos (FPIES), una de las formas más severas de respuesta alérgica de tipo retardado a alimentos. Esta reacción se caracteriza por vómitos de repetición, dolor abdominal letargo, hipotensión y posible shock después de la ingestión del alérgeno<sup>6</sup>. La enterocolitis inducida por proteínas de la dieta aparece habitualmente durante los primeros meses de vida, generalmente inducida por leche de vaca y soja. La ingesta repetida del alimento origina un cuadro de vómitos de repetición, diarrea crónica, fallo de medro. Los síntomas remiten tras la evitación del alimento, pero la reintroducción del mismo produce recurrencia de síntomas. Se estima que afecta hasta el 0,34% de los lactantes durante el primer año de vida.

En los últimos años se ha detectado un aumento en el número de publicaciones que describen este tipo de reacciones por otros alimentos sólidos como el arroz, cereales, pollo, frutas, pescado, siendo en estos casos la edad de aparición de síntomas posterior a los 4-7 meses de vida o posteriormente<sup>7</sup>.

En el intestino, tanto macrófagos como células dendríticas locales captan el alérgeno ingerido, y comienzan su respuesta en ganglios mesentéricos. Las acciones que ocurran vendrán determinadas no sólo por el alérgeno, sino por el microambiente donde se encuentra la célula. La microbiota intestinal comensal participa en el desarrollo de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Durante el desarrollo vital hay una interacción entre la microbiota y el sistema inmune en mucosas. Alteraciones en esta flora comensal causan enfermedades intestinales, incluyendo intolerancia o alergia alimentaria<sup>7</sup>. Son distintos los factores que influyen en la constitución de la flora intestinal, y ésta, así como la activación inmunitaria varía en las diferentes etapas.

Los avances tecnológicos en biología molecular, han permitido un estudio preciso de la microbiota y han revelado que, además de otras implicaciones sistémicas, su papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, es mucho más importante de lo que se suponía.

El microbioma humano puede definirse como el conjunto de los genomas de todos los microorganismos presentes en el cuerpo humano. Es decir, se considera que un ser humano es en realidad un super-organismo compuesto por células humanas y microorganismos entre los cuales están las bacterias, las arqueas, los eucariotas y los virus<sup>6</sup>. En individuos sanos, la microbiota previene tanto la expresión de genes de virulencia como la colonización por bacterias patógenas mediante la competencia por los recursos nutritivos y por los sitios de unión a las células epiteliales. Pero ese equilibrio puede verse alterado por diversas situaciones.

Actualmente no existe ningún estudio sobre la microbiota en enfermos de FPIES<sup>7</sup>. Con un estudio del perfil microbiano, junto al conocimiento del funcionamiento de la respuesta inmune innata, podremos saber si en estos pacientes no hay un patrón microbiano normal y, por tanto no existe microbiota comensal que ejerza un papel beneficioso y tolerante frente a alimentos comunes. Son diversas las estrategias experimentales que están siendo utilizadas para estudiar los cambios en la microbiota intestinal en diversos procesos patológicos. El más intensivo y preciso, pero a la vez más complejo y caro, es la secuenciación completa del metagenoma bacteriano. Este método

permite conocer tanto la biodiversidad microbiana como las capacidades funcionales que pueda tener la microbiota. Existen otras alternativas experimentales, ya que diversos estudios muestran que no es necesario monitorizar toda la gran biodiversidad microbiana intestinal, sino sólo aquellas poblaciones más importantes<sup>8</sup>. Entre esos otros abordajes experimentales, se encuentra la amplificación mediante PCR de los genes que codifican para el 16S rRNA, seguido de su análisis en electroforesis de agarosa en gel desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en el estudio de ecosistemas bacterianos y, en el caso de la microbiota intestinal, se ha utilizado para valorar el impacto de los antibióticos en pacientes de UCI<sup>9</sup>, la translocación bacteriana después de una intervención quirúrgica<sup>15</sup>, o la evolución de la microbiota del recién nacido<sup>16</sup>.

Los microorganismos viven en el trecho intestinal; las bacterias intestinales desempeñan un papel en la determinación de la fuerza de reacciones anafilácticas a los alérgenos presentes en los alimentos. La flora intestinal y los diversos elementos del sistema inmune se entretajan de cerca y se influyen mutuamente<sup>10</sup>.

La densidad de colonización microbiana alcanza sus cotas máximas en el intestino, especialmente en el intestino grueso. El número de microorganismos que lo colonizan 10 veces mayor al de las células de todo el organismo, hay más de 1.000 especies diferentes, siendo las bacterias las más abundantes. Algunas especies, habitualmente presentes en escaso número pero que también cumplen importantes funciones, en situaciones de alteración de la microbiota (desequilibrio), pueden actuar también como patógenas (patógenos facultativos).

Se considera que la microbiota intestinal alcanza un estado próximo a la madurez y estabilidad entre el segundo y tercer año de vida, con cierta variabilidad individual en función de la dieta, estilo de vida, edad, que pueden hacer que se establezca un cierto predominio más o menos estable de algunos grupos microbianos.

La microbiota es decisiva para determinar estados de salud o enfermedad. Los microorganismos que constituyen el complejo ecosistema que supone la

microbiota intestinal, establecen con el organismo una estrecha relación de mutuo beneficio (simbiosis), y bien como microorganismos específicos, pero fundamentalmente como grupos determinados o actuando toda en conjunto, cumple importantes funciones:

- Resistencia y control de la colonización por gérmenes patógenos (patógenos facultativos endógenos o propiamente invasores externos). Digestión de los alimentos.
- Síntesis de vitaminas y absorción de oligoelementos.
- Estimulación, nutrición y estabilización de la integridad de la barrera epitelial y de su capa mucosa protectora.
- Estimulación, maduración y diferenciación de linfocitos y diferentes estructuras inmunitarias.
- Estimulación del peristaltismo con ayuda de ácidos grasos de cadena corta.

Para una función intestinal normal, es imprescindible que los diferentes géneros que constituyen la microbiota intestinal (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* etc.) se encuentren en una determinada cantidad, proporción y equilibrio (dinámico)<sup>11</sup>. Cada uno de ellos, tiene una función más o menos específica, por lo que tanto el déficit de alguno, como el exceso de otros, pueden dificultar el normal funcionamiento del sistema digestivo. Un desequilibrio cualitativo y/o cuantitativo de los microorganismos integrantes de la microbiota saprofita normal, genera una disbiosis intestinal que da lugar a disfunciones como la inflamación crónica de la pared intestinal, alteraciones de la permeabilidad (barrera selectiva entre el medio interno y externo), pudiendo ser el origen de "intolerancias alimentarias" (en realidad, alergia alimentaria tipo III), pero también de alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune de mucosas, con repercusiones como alergias, dermatitis, infecciones recurrentes de mucosas, etc. ya que como la investigación científica está poniendo en evidencia (cada vez de forma más relevante), el intestino juega un papel fundamental como

centro del sistema inmunológico y en el que los microorganismos actúan como auténticos entrenadores constantes del mismo<sup>17</sup>.

Dos estudios recientes de cohortes en humanos han identificado que una reducción de la microbiota gastrointestinal en una etapa precoz de la vida se asocia con alergia a alimentos o sensibilización a alimentos<sup>11</sup>. No está claro si la diversidad microbiológica es autoprotectora, quizás porque lleva a aumentar la diversidad del repertorio de células T reguladoras o si menos diversidad bacteriana deja a las especies con una ausencia de protección crítica. Hay evidencia que algunas especies bacterianas tienen un efecto protector en el contexto de alergia alimentaria<sup>11</sup>. Se identificaron especies de *Clostridium* que podrían conducir la expansión de células T reguladoras en el intestino grueso y encontraron que la administración de especies de *Clostridium*, bien de ratón o humana, pueden suprimir el desarrollo de síntomas intestinales en un modelo de alergia a alimentos.

### 3.1 Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (FPIES)

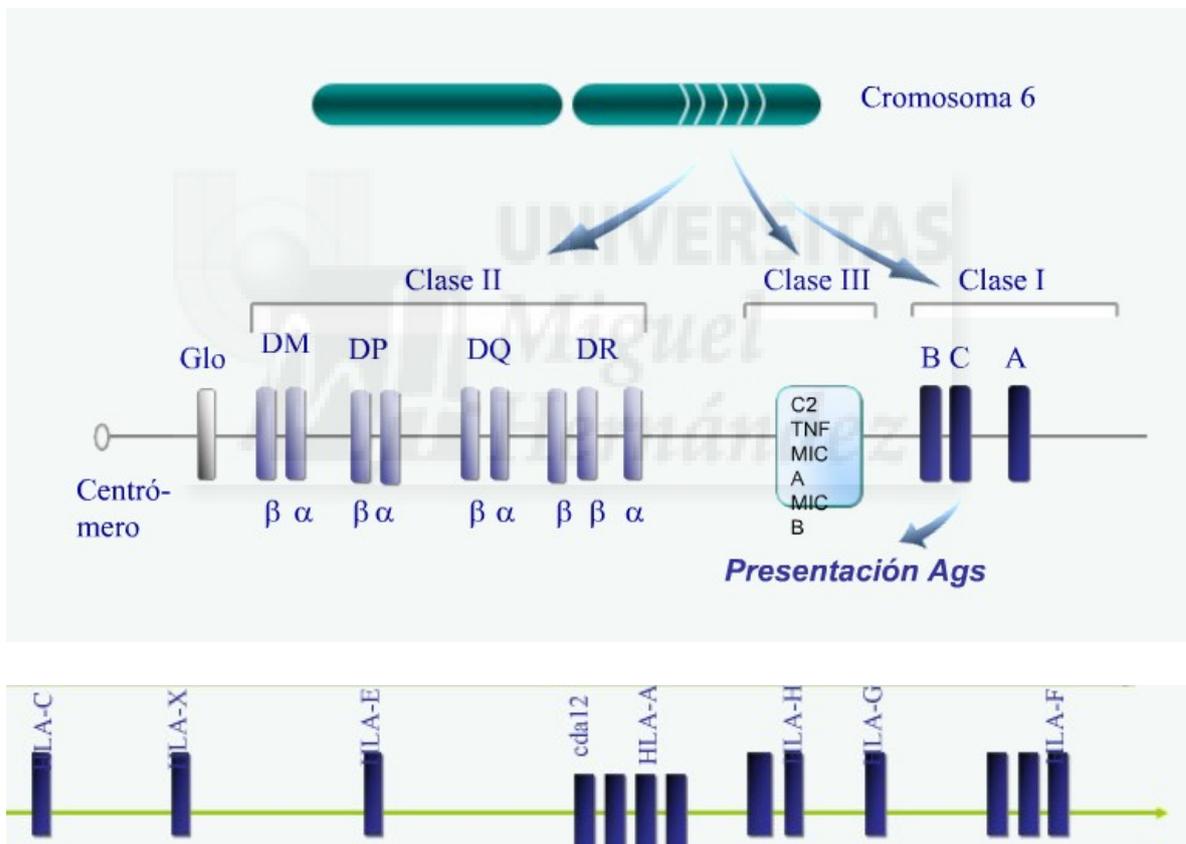
El Síndrome de Enterocolitis Inducida por Proteínas Alimentarias (Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome, FPIES), es una reacción de hipersensibilidad no IgE. En algunos casos, los síntomas pueden llegar a deshidratación y shock. Si bien cualquier alimento puede ser un desencadenante, los culpables suelen ser la leche, la soja y los cereales. El cuadro a menudo se desarrolla en el periodo de lactancia, normalmente, cuando al bebé se le agregan alimentos sólidos o leche artificial.

La mayoría de los niños que padecen de FPIES solamente tienen uno o dos alimentos desencadenantes, pero es posible que tengan reacciones a múltiples alimentos<sup>12</sup>. Existen diferencias entre el FPIES y la alergia alimentaria de tipo inmediato o IgE mediado. La mayoría de las reacciones alérgicas alimentarias ocurren en las horas tras la ingesta de un alérgeno. Las reacciones alérgicas no inmediatas se producen algunas horas tras la ingestión del alimento. En la mayoría de las alergias, la respuesta del sistema inmunológico se incrementa frente al alérgeno, alterando inmediatamente la respuesta inmune; aunque se

describe que en las reacciones del FPIES, se desencadena una respuesta más celular del sistema inmunológico en comparación con la respuesta humoral mediada por Inmunoglobulinas “tipo IgE”.

El FPIES generalmente tiende a la remisión espontanea en unos años. Se deben definir qué alimentos son seguros y el momento de determinar la introducción del aliento implicado para comprobar la resolución del mismo. Con la adecuada atención médica y un plan de dieta personalizado para asegurar la nutrición adecuada en los individuos que lo padecen.

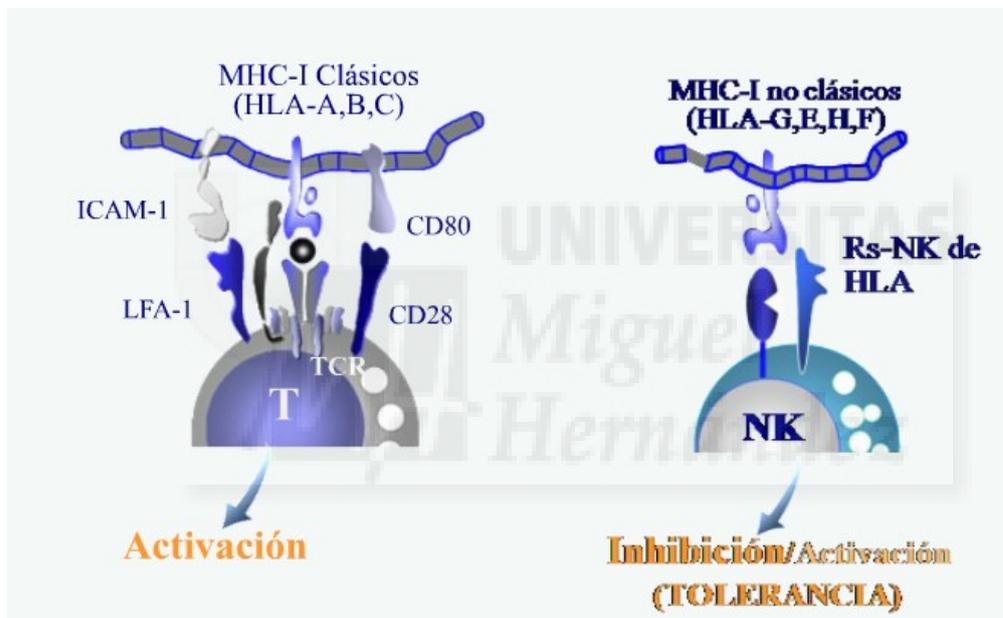
#### 4. EXPRESIÓN DE HLA-G Y MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD



**Figura 3.** Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Carosella et al., 2005.

La distribución de HLA-G es limitada, se expresa en el timo, el ojo y la placenta pero sobre todo en el citotrofoblasto extravascular que invade el tejido decidual, en el trofoblasto intersticial, en las células endoteliales de los vasos fetales y en las arterias espirales maternas<sup>43</sup>. El antígeno leucocitario humano G (HLA-G)

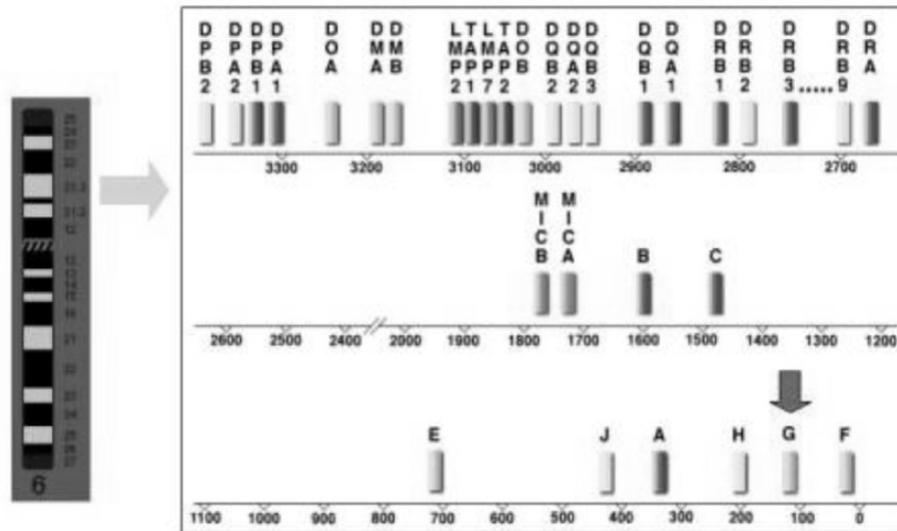
es una molécula tolerogénica que puede ser expresada unida a membrana como las isoformas insolubles (HLA-G1,-2,-3,-4) o como isoformas solubles (HLA-G 5, 6, 7). Éstas últimas inducen apoptosis de células CD8+ activadas, y modulan las respuestas citotóxica de los linfocitos T y las células NK. El HLA-G unido a membrana inhibe la citólisis mediada por células T y NK, e induce la producción de citocinas Th2. Existen evidencias de la expresión del HLA-G en endometriosis, tales como su ausencia o localización en el tejido endometriósico y en otros tejidos en los cuales puede ser inducida por alteraciones inflamatorias en la mucosa epitelial o cánceres epiteliales<sup>44</sup>.



**Figura 4.** Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) y su interacción con Linfocitos T y Células NK. Tomado de *J.M. Fernández, M. Frías, L. Castro, J. Peña.* HLA-G y sus funciones. *Inmunología en línea.* 2000 <sup>42</sup>.

El locus del HLA-G fue descrito por primera vez por Geraghty en 1987<sup>43-44</sup>, denominándolo inicialmente como HLA-6.0. Este se identificó durante una investigación de genes similares de la clase Ia. Para ello, clonaron el DNA genómico que codificaba para un gen clase I (que no codificaba para HLA-A, -B y -C) localizado en el fragmento de restricción de 6.0 kb, generado por la enzima Hind-III <sup>43</sup>. Este gen, tenía homología con el HLA-A y B, excepto en la ausencia del exón 7, con un codón de terminación en la región citoplasmática

en el exón 6. El HLA-G se localizó en la región telomérica 6p21.3, muy cerca al locus del HLA-A<sup>33</sup>.



**Figura 5.** Mapa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en la región cromosómica 6p21.3. Tomado de Rincón y Manrique. 2006.<sup>45</sup>

#### 4.1 Polimorfismo del HLA-G

En contraste con el extensivo polimorfismo de los genes clase I clásicos del HLA, se ha considerado bajo el grado de polimorfismo en el locus del HLA-G, presentando una limitada heterogeneidad de secuencias y con pocos alelos descritos. Se han descrito quince alelos del HLA-G<sup>44</sup>. El primer alelo descrito por Geraghty fue el G\*0101, es un alelo predominante en casi todas las poblaciones. El alelo HLA-G\*01011, no involucra sustituciones en la secuencia de aminoácidos en comparación a otros alelos, como el alelo G\*0103 (Thr31Ser), G\*0102 (Gln54Arg), G\*01013 (Phe241Ser), G\*0141, G\*0142 y G\*01043 (Leu110Iso)<sup>44</sup>. El G\*0105N es el primer alelo nulo del HLA-G descrito. Presenta una delección de una citosina (1597 del C) en la tercera base del codón 129 o en la primera base del codón 130, que causa un cambio estructural alterando la secuencia de aminoácidos en el exón 3 (dominio a2) y genera un codón de parada prematuro en el exón 4. Además, presenta un

polimorfismo alélico con una delección/ inserción de una secuencia de 14 (14bp) pares de base en el exón 8, en la región 3' no traducida.

El polimorfismo del HLA-G, en contraste con el extensivo polimorfismo de los genes clase I clásicos del HLA, se ha considerado bajo el grado de polimorfismo en el locus del HLA-G, presentando una limitada heterogeneidad de secuencias y con pocos alelos descritos<sup>44</sup>. Quince alelos del HLA-G se han descrito, 14 de los cuales se asignados por la nomenclatura del HLA<sup>73</sup>. El primer alelo descrito por Geraghty el G\*01011 (salvaje), es predominante en casi todas las poblaciones, con una frecuencia variable de un 32% en poblaciones alemanas/croatas en contraste a un 83% en poblaciones de Ghana. El alelo HLA-G\*01011, no involucra sustituciones en la secuencia de aminoácidos en comparación a otros alelos: como el alelo G\*0103 (Thr31Ser), G\*0102 (Gln54Arg), G\*01013 (Phe241Ser), G\*0141, G\*0142 y G\*01043 (Leu110Iso) (11). El G\*0105N es el primer alelo nulo del HLA-G descrito, presenta una delección de una citosina (1597 del C) en la tercera base del codón 129 o en la primera base del codón 130, esto causa un cambio estructural que altera la secuencia de aminoácidos en el exón 3 (dominio a2) y genera un codón de parada prematuro en el exón 4. El HLA-G\*0105N se encontró en una variedad de grupos étnicos con una frecuencia de 11,1% en poblaciones africanas a un 0,6% en poblaciones danesas<sup>47</sup>. No ha sido encontrado en poblaciones caucásicas, americanas o japonesas. La descripción de individuos sanos homocigotos para el alelo G\*0105N indica que el HLA-G1 no es necesario para la supervivencia fetal<sup>48-50</sup>. Sin embargo, por análisis de secuencias en el exón 2 y 3 un extensivo polimorfismo del locus HLA-G en mujeres africanas no emparentadas<sup>46</sup>. La frecuencia reportada en mujeres africanas es de un 39.3% para el alelo HLA-G\*01011 el más predominante en la población de estudio, seguido por el alelo G\*01041 (20,4%), con una frecuencias similar a la reportada en Japoneses (38%) y poblaciones Hutterite (20%), y se encontró el alelo nulo G\*0105N con una frecuencia relativamente alta de 11.1% en ésta población que históricamente posee una gran cantidad de patógenos, lo que hace especular que la reducción en la expresión del HLA-G.

#### 4.2 Isoformas de la molécula HLA-G

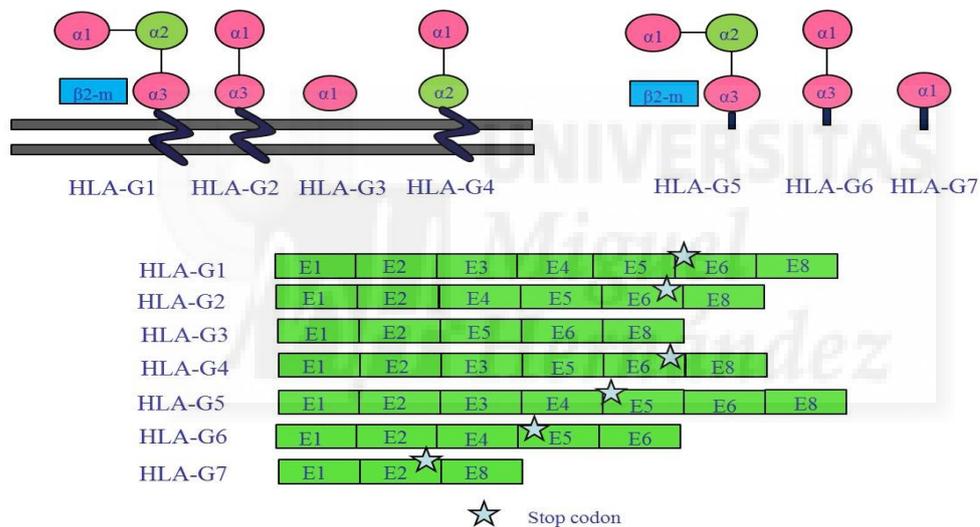
La secuencia y estructura del gen de HLA-G tiene gran homología con los genes HLA clase I clásicos, con ocho exones, siete intrones y la región 3'UTR. Los exones 6-8 (105 bp) codifican para el dominio a1, a2, a3, para la región transmembranal y para el dominio citoplasmático, respectivamente. Sin embargo, HLA-G presenta un codón de parada en el exón 6 que difiere con los genes HLA clase I clásicos<sup>48</sup>.

El gen del HLA-G codifica para siete formas proteicas o isoformas, resultado del empalme alternativo de un mismo RNA precursor, cuatro ligadas a la membrana (HLA-G1,-G2, -G3,-G4) y las otras tres son isoformas solubles (HLA-G5, -G6,-G7)<sup>48</sup>. El HLA-G1 presenta los dominios a1, a2, y a3 (asociado con la  $\beta$ 2 microglobulina) que codifican para el dominio extracelular, unidos al dominio transmembranal y un codón de parada en el exón 6, teniendo una estructura similar a los antígenos de clase I clásicos<sup>48</sup>. Los transcritos HLA-G2, -G3, -G4, no incluyen el exón 3, exón 3 y 4, o el exón 4, respectivamente generando las isoformas truncadas. La isoforma G3 sólo presenta el dominio a1, G2 el dominio a1 y a3, y G4 el dominio a1 y a2, y tienen en común la región transmembranal. Los mecanismos inusuales para generar las proteínas solubles alternas del HLA-G incluyen un codón de parada en el intrón 4 para las isoformas G5 y G6, mientras que G7 presenta un codón de parada en el intrón 2. La molécula soluble completa HLA-G5 contiene el péptido líder, los dominios a1, a2, a3 y excluye el dominio transmembranal. La isoforma truncada HLA-G6 no tiene el dominio a2 y excluye el dominio transmembranal, mientras que G7 sólo contiene el dominio a1. Todas las isoformas del HLA-G, ligadas a membrana y solubles, tienen en común el dominio a1 de la región extracelular, permitiéndoles mediar la protección de las células T y NK mediante citólisis. Los diferentes transcritos se encuentran en varios tipos celulares pero son más abundantes en tejidos placentarios, y en líneas celulares de coriocarcinoma derivadas de la placenta (JEG-3)<sup>48</sup>. Se ha encontrado expresión de HLA-G en leucocitos, especialmente en macrófagos, células epiteliales tímicas, en la cámara anterior del ojo, así como en varios tipos de tumores y células de estroma durante condiciones de inflamación y malignidad<sup>48</sup>. La presencia de moléculas solubles en plasma y líquido

amniótico, en biopsias de tumores y suero de pacientes trasplantados podría implicar que estas isoformas actúan como mediadores de la inducción de tolerancia inmune, o tengan un papel en la progresión de tumores y trasplantes.

### 4.3 Proteína HLA-G1

El ARNm HLA-G1 codifica una proteína de 39 kDa que contiene los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  unidos al dominio transmembrana codificado por el exón 5 y a una reducida cola citoplasmática, debido a la existencia de un prematuro codón de parada en el exón 6. Esta isoforma presenta estructura similar a otras moléculas de HLA de clase I en que esta cadena  $\alpha$  se encuentra asociada a la  $\beta 2$ -microglobulina.



**Figura 6.** Isoformas de HLA-G. Tomado de J.M. Fernández, M. Frías, L. Castro, J. Peña. HLA-G y sus funciones. Inmunología en línea. 2000 <sup>42</sup>.

Los estudios de esta isoforma indican que la función primaria de HLA-G1 es actuar como inhibidor para células inmunocompetentes, contribuyendo al establecimiento de una tolerancia periférica. HLA-G1 es reconocido por varios receptores como los receptores ILT2 (*Immunoglobulin-like transcript*) expresado en células mielomonocíticas, ILT4 expresado en monocitos-macrófagos y células dendríticas, y p49/KIR2DL4 (CD158d) expresado en células T. A través de estos receptores HLA-G1 puede interactuar directamente con las células NK, T, B y otras denominadas APC. También se ha descubierto

que HLA-G1 afecta a la producción general de citocinas en linfocitos granulares de la decidua de una forma no consistente en el paradigma Th1/Th2 (descenso de la producción de IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y GM-CSF).

#### **4.4 Proteínas HLA-G2, G3 y G4**

Los transcritos primarios de HLA-G2, G3 y G4 que excluyen el exón 3 (para G2), exón 3 y exón 4 (para G3), y exón 4 (para G4), generan isoformas truncadas que poseen sólo el dominio  $\alpha$ 1 en HLA-G3, los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 3 para HLA-G2 y los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 para HLA-G4, unidos a la región transmembrana (Figura 2). En relación a sus funciones no se ha hallado ninguna de especial relevancia.

#### **4.5 Proteínas HLA-G5, G6, y G7**

Las isoformas solubles de HLA-G están desprovistas de las porciones transmembrana y citoplasmática, debido a la presencia de un codón de parada en el intrón 4 (G5 y G6) o en el intrón 2 (G7) dejando una cola específica C-Terminal para estas formas solubles.

La isoforma completa HLA-G5 es una glicoproteína de 37 kDa que guarda idénticos dominios líder,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 pero incluyendo la secuencia del intrón 4 que produce una región de lectura abierta que codifica para 21 aminoácidos unidos al dominio  $\alpha$ 3 y excluye el dominio transmembrana. La isoforma HLA-G5 ha sido descrita en varios fluidos corporales, como el líquido amniótico y suero en mujeres embarazadas, pacientes con cáncer, pacientes trasplantados del corazón, etc. De igual manera la isoforma HLA-G6, mantiene la secuencia del intrón 4, dando lugar a una proteína soluble que carece del dominio  $\alpha$ 2. Se ha sugerido la presencia de esta isoforma en la sangre materna durante el embarazo.

El HLA-G7 es la isoforma que ha sido descrita más recientemente, es una proteína soluble de 17 kDa producida por una variante de splicing en la cual la secuencia de lectura abierta continúa en el intrón 2, el cual contiene un codón

de parada. HLA-G7 está formada por el dominio  $\alpha 1$  unido a dos aminoácidos codificados por el intrón 2.

#### 4.6 Funciones del HLA-G

**Interacciones del HLA-G con las NK:** La actividad de las NK pueden regularse por antígenos HLA clase I: algunos alelos HLA-C y -B presentes en células blanco actuando como moléculas protectoras contra la lisis de las NK y constituyen ligandos específicos para los receptores de las células NK <sup>43</sup>. El HLA-G inhibe la citólisis de las NK por dos vías principalmente liberando señales inhibitorias a las NK. La primera, una vía directa, a través de la interacción con los receptores inhibitorios de las Natural Killer (KIRs), incluyendo ILT2/LIR1 (presente en células NK, células mielomonocíticas, linfocitos T y B), ILT4/LIR2 (selectivamente expresado en monocitos, macrófagos y células dendríticas), p49 (presente en células NK deciduales) y KIR2DL4 (expresado en NK y linfocitos T) actuando directamente con el HLA-G. Sin embargo, ILT2, ILT4, p49 pueden interactuar con otras moléculas clase I del HLA <sup>48-56</sup>.

El segundo mecanismo, una vía indirecta, consiste en la interacción con el receptor CD94/NKG2 (miembro de la superfamilia de las lectina C) del HLA-E (expresado en la superficie de las NK) que contiene un péptido líder derivado del HLA-G inhibiendo así las funciones del HLA-G y las Interacciones del HLA-G con las NK <sup>65</sup>.

#### 4.7 HLA-G y su Asociación con Inflamación y Alergias

En los procesos inflamatorios la expresión de los antígenos del HLA-G antígenos son caracterizados por un bajo polimorfismo alélico, una distribución tisular limitada y la presencia de isoformas unidas a la membrana y solubles. La presencia de moléculas de HLA-G en las dos formas se ha asociado con funciones tolerogénicas contra la respuesta celular innata y adaptativa, ya que los antígenos HLA-G son capaces de afectar a la citotoxicidad de células asesinas naturales y linfocitos T CD8+, funciones de los linfocitos T CD4+ y la maduración de células dendríticas. Además, el polimorfismo alélico del gen

HLA-G (polimorfismo de delección/inserción de una secuencia de 14 bp en el exón 8, en la región 3' no traducida) se ha asociado a la generación de un mRNA inestable y una menor producción de proteínas sHLA-G, lo que sugiere una diferente capacidad para contrarrestar la inflamación<sup>65</sup>.





## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





### HIPÓTESIS

La alteración genética de la molécula HLA-G puede suponer una modificación de la respuesta tolerogénica a alimentos. Las variantes del polimorfismo deleción/inserción de una secuencia de 14 bp en el exón 8 y el alelo nulo 01:05N entre los pacientes alérgicos y los no alérgicos crean una predisposición a sufrir alergia y enteropatías como el FPIES. La composición de la microbiota intestinal puede tener un papel en la determinación de la respuesta a estos alérgenos.

### OBJETIVOS

- Evaluar las características clínicas de pacientes con alergia alimentaria mediada y no mediada por IgE.
- Determinación del polimorfismo deleción/ inserción de 14 bp en el exón 8 de HLA-G en pacientes que presentan alergia alimentaria y sus controles.
- Valorar los niveles de la proteína soluble sHLA-G en pacientes que presentan alergia alimentaria y relacionar estos niveles con su perfil genético para HLA-G.
- Correlacionar los resultados obtenidos del análisis de la microbiota intestinal en pacientes con FPIES en edad pediátrica y su relación con los resultados obtenidos a nivel soluble de la proteína sHLA-G.
- Evaluar la prevalencia, características clínicas y severidad de la patología alérgica. Establecer su relación con los síntomas y recurrencia de la alergia alimentaria.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio unilateral, observacional prospectivo, para determinación de marcadores de polimorfismo genético de HLA-G y sus niveles, detección de proteína soluble sHLA-G en muestras de saliva y comparación de los resultados de los pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.

## 2. SUJETOS DE ESTUDIO

La selección de pacientes se realizó en el Servicio de Alergia del Hospital de Alicante, donde se realizó la toma de muestras de saliva de cada uno de los pacientes y controles. Se evaluó la respuesta alérgica por medio de un cuestionario de síntomas, *prick* test cutáneo y determinación de IgE específica sérica. El resultado positivo en las pruebas cutáneas y la determinación de IgE sérica a alérgenos alimentarios fueron cruciales para la distribución y separación de las muestras en los distintos grupos de estudio. Los sujetos/representantes legales entraron en el estudio sólo si habían firmado el consentimiento informado y el correspondiente a la donación de muestras biológicas al biobanco para investigación biomédica.

## 3. GRUPOS DE ESTUDIO

Se establecieron 4 grupos de Estudio:

- **IgE Mediada:** Pacientes con síntomas en los primeros minutos y las pocas horas tras haber entrado en contacto con el alérgeno, y que presenten síntomas de alergia alimentaria.
- **No IgE Mediada:** Tiene una base inmunitaria pero no es una enfermedad mediada por IgE. Tiene unas características específicas, presentan sintomatología alérgica y enteropatías como "FPIES".

- 
- **Controles Sanos:** Pacientes sanos, sin sintomatología alérgica.
- **Otros Procesos Alérgicos:** Pacientes con sintomatología a otro tipo de alérgenos no alimentarios.

**Tamaño muestral:** Dado que se trata de un estudio unilateral, se calcula un tamaño muestral para contrastar un área bajo la curva ROC diferente de 0.50. Asumiendo un valor de 0.80, una confianza del 95%, una potencia del 80%, una proporción esperada de pérdidas del 15%, se obtiene un tamaño muestral total de 157 pacientes.

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes entre 0-75 años con sintomatología de alergia alimentaria (prurito, entumecimiento, edemas, habones y lesiones dermatológicas) y sIgE sérica a alérgenos alimentarios tanto negativa como positiva.
- Conocimiento de la hoja de información del estudio y que aporten su consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión:**

- Embarazo o lactancia.
- Otras enfermedades inmunológicas.
- Pacientes que hayan tomado corticoides en los 3 meses anteriores a la toma de muestras.
- Pacientes que hayan tomado antihistamínicos en las 2 semanas anteriores a la toma de muestras.

### **Variabes:**

#### **Demográficas y clínicas**

- Sexo
- Edad

- 
- Años de evolución de la patología alérgica
- Edad de inicio del cuadro alérgico
- Antecedentes familiares de atopia
- Tabaquismo

### **Biológicas**

- Resultado del prick test a alérgenos alimentarios
- IgE total y sIgE sérica

## **4. RECOGIDA DE MUESTRAS DE SALIVA Y ANÁLISIS DE DATOS**

Previo consentimiento informado para la realización de la prueba y el correspondiente a la donación de muestras al Biobanco, de todos los sujetos se obtuvieron muestras de saliva, y se conservó una muestra en el laboratorio de Inmunología, del Departamento de Medicina Clínica, de la Universidad Miguel Hernández.

Todos los datos demográficos, clínicos e inmunológicos fueron recogidos en una base de datos y analizados con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 22.0.

El estudio descriptivo de las variables cuantitativas de los sujetos en cada grupo (edad, años de evolución, edad de inicio de los síntomas, niveles de IgE) se realizó mediante estimación puntual e intervalo de confianza para el 95% de seguridad, tratando las variables como medias, desviaciones estándar y medianas según la distribución de cada una de ellas.

## 5. ASPECTOS ÉTICOS A TENER EN CUENTA

El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, la Declaración de Helsinki (versión octubre 2013), las normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente en esta materia. Todos los pacientes incluidos en el estudio han leído la Hoja de Información al Paciente y firmado el Consentimiento Informado (ANEXO I). Todos los datos de los pacientes se han mantenido anónimos mediante la asignación de un doble código tanto a la muestra como al archivo de datos, y sólo personal debidamente autorizado ha tenido acceso a los datos personales identificables. Siempre se han mantenido los niveles más altos de conducta profesional y confidencialidad, cumpliendo con el artículo 7 de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos de los pacientes participantes, sólo ha tenido acceso a los mismos el investigador responsable y su equipo de investigadores colaboradores, la persona encargada de realizar las tareas de monitorización, el auditor en caso de que el estudio se sometiese a una auditoría, el Comité Ético del Hospital de Alicante y las autoridades sanitarias.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de datos de carácter personal de los participantes en el estudio se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002, de Autonomía del Paciente.

Los proyectos de este tipo de estudios deben someterse a revisión por un comité independiente. Por ello, el presente estudio ha sido sometido para su evaluación al Comité Ético del Hospital de Alicante.

**Tipo de Muestra: Saliva**

Este es un estudio de casos y controles, donde se ha determinado el polimorfismo de inserción/delección de 14 bp del exón 8 de HLA-G, y la detección de su forma proteica, además de su correlación con alergias alimentarias en los grupos de pacientes indicados.

**Tipo de Muestra: Materia Fecal**

En éste caso se obtuvo ésta muestra de 17 pacientes en edad pediátrica y 12 controles de la misma edad los cuales presentaron síntomas compatibles con FPIES, en los cuales se observó un desarrollo de un cuadro clínico más severo y por lo tanto se realizó en éste grupo de pacientes la determinación de un perfil de la microbiota intestinal.

**6. ESTANDARIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECIÓN/ INSERCIÓN EN DE LA SECUENCIA DE 14 BP EN EL EXÓN 8 DE HLA-G Y EL ALELO NULO 01:05N, EN MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES QUE PRESENTAN ALERGIA ALIMENTARIA.**

**Control Positivo de las Técnicas**

**GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa):** enzima implicada en una de las reacciones más importantes de la glucólisis. A nivel genético hay una expresión constitutiva del gen que codifica la enzima.

**Línea Celular JEG-3:** Línea celular de coriocarcinoma ovárico y placentario que expresa de forma basal las isoformas G1 y G5 de HLA-G.

### 6.1 Protocolo recogida de saliva con tubos Salivette®

**Muestra:** Saliva.

Los tubos deben mantenerse siempre verticales. Son estables 8 meses a 4°C. El paciente deber haber estado un mínimo de 30 minutos SIN: comer, beber líquidos distintos del agua, lavarse los dientes o fumar.

- Extraer el tubo interior con la tapa y dárselo al paciente.
- El paciente sacará la torunda y la masticará muy suavemente 1 minuto.
- Finalmente la retornará a su tubo y lo tatará.



- Insertar el tubo con la torunda en el tubo grande.



- Centrifugar 3 minutos a 1000xg (3000 rpm en una centrifuga con rotor de 9 cm de radio, alternativamente 3 minutos a máxima velocidad).
- Tapar el recipiente, rotularlo y congelarlo a -20°C.

## 6.2 Métodos de Extracción de DNA

### Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

- Tomar 1,5 ml de saliva del recipiente donde se obtuvo la muestra. Si las muestras de saliva no se procesan inmediatamente, se deben congelar a -20°C hasta su procesamiento.
- Mezclar la saliva con 4 ml de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.1, y centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a 3000xg. Resuspender el sedimento en 180 µl de PBS y RNasa A.
- Añadir 20 µl de la solución de proteasa (proteínasa K) y 400 µl de Buffer AL a la muestra. Mezclar inmediatamente por agitación durante 15 s.
- Incubar a 56 °C durante 10 min. Centrifugar brevemente para quitar las gotas del interior de la tapa.
- Añadir 400 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar de nuevo mediante agitación en vórtex. Centrifugar brevemente para recuperar todo el líquido.
- Aplicar cuidadosamente 700 µl de la mezcla a la columna de centrifugación QIAamp Mini (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Colocar la columna de centrifugación QIAamp mini en un tubo de recogida nuevo de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.
- Cerrar cada columna de centrifugación con el fin de evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación.
- Abrir con cuidado la columna y añadir 500 µl de tampón AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000xg (8000 rpm) durante 1 min.
- Colocar la columna en un tubo de recogida limpio de 2 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.

- Abrir con cuidado la columna y añadir 500 µl de Buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a toda velocidad a 20.000 xg, 14.000 rpm durante 3 min.
- Recomendaciones: Colocar la columna QIAamp mini en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y desechar el tubo de recogida con el filtrado. Centrifugar a alta velocidad durante 1 min. Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de tampón AW2.
- Colocar la columna de centrifugación QIAamp mini en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna de centrifugación y añadir 150 µl Buffer AE o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min, y luego centrifugar a 8000 rpm por 1 min.

**6.3 Cuantificación de DNA:** La muestra de DNA se cuantificará en el equipo NanoDrop™ y se realizará la medición en las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Tras la detección de las absorbancias, se determinará la concentración y la cantidad de muestra necesaria para realizar el procedimiento de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

**6.4 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para determinar el polimorfismo HLA-G 14 pares de bases inserción/ deleción del exón 8 y el alelo nulo 01:05N.**

Se extraerá ADN genómico a partir de las muestras de saliva de pacientes y controles.

El polimorfismo en el exón 8 (3'-UTR) del gen HLA-G fue identificado por PCR.

Los primers empleados fueron (SIGMA):

#### **GAPDH**

Forward 5'- TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G-3'

Reverse 5'- TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT-3'

### **HLA-G**

Forward 5'- ATG GTG GGC TGT TTA TGT AAG CAC C-3'

Reverse 5'-GGA AGG AAT GCA GTT CAG CAT GA-3'

### **Alelo Nulo 01:05N**

Forward 5'- CAC CCT CCA GTG GAT GAT TG-3'

Reverse 5'- CAG CAT CTC CTT CCC GTT CT-3'

Las muestras de DNA se amplificaron en 50 µl de una mezcla de reacción que contiene 0,5 unidades de Taq Polimerasa (Qiagen), dNTPs (2,5 mM cada uno) (Qiagen), utilizando un sistema automatizado de PCR (termociclador Mastercycler, Eppendorf). Se realizaron los siguientes ciclos: inicial 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30s, hibridación a 60 °C durante 30 s y extensión a 72°C, con una fase adicional de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, que contenía bromuro de etidio (10 mg/ml). Los productos de PCR tienen un tamaño de 210 y 226pb, o ambos, dependiendo de la inserción/ deleción del 14bp en el exón 8.

## **7. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-G POR LA TÉCNICA WESTERN BLOT EN MUESTRAS DE SALIVA DE PACIENTES Y CONTROLES.**

### **Muestras:**

Se obtendrán muestras de pacientes a alergias alimentarias y sus respectivos controles procedentes del Servicio de Alergia del Hospital de Alicante. Posteriormente serán tomadas y congeladas a -20 °C hasta su análisis.

### 7.1 Cuantificación de Proteínas:

Las muestras se cuantificaron utilizando el kit BCA Protein Assay de Novagen. Este kit está basado en la reacción de Biuret en la cual una molécula formada a partir de dos de urea ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), la cual da una reacción positiva a la presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del Biuret. El reactivo de Biuret contiene  $\text{CuSO}_4$  en solución acuosa alcalina (de  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$ ). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 540 nm. El resultado de ésta reacción es que, al agregar el reactivo de sulfato de cobre junto a la solución de proteína, se observa una coloración violeta, quedando en el fondo del tubo una tonalidad azul para reacción positiva. Pero en el caso de que se observe una coloración amarilla, la reacción se torna negativa al no haber presencia de proteínas. Se cuantificaron las proteínas y partíamos de una concentración de 50  $\mu\text{g}$ .

### 7.2 Concentración de Proteínas:

Las muestras de de saliva se concentraron utilizando tubos Amicon Ultra de 0,5 ml de Millipore.

- Adicionar 500  $\mu\text{l}$  de la muestra de saliva.
- Centrifugación de las muestras a 14000xg por 30 minutos.
- Recoger el la muestra del fondo el tubo colector.

### 7.3 Técnica Western Blot:

#### Muestra

- Se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de la solución de proteínas y se adicionó la tercera parte del buffer de carga 3X Red Loading (New England)+ DTT como agente reductor. Se calentaron las muestras 5 minutos a 95°C.
- Se realizó una centrifugación 5 minutos a 13000 rpm.

- Finalmente se cargaron las muestras en el gel y junto con un marcador de peso molecular conocido.

### Geles de Poliacrilamida

Preparación de los geles: Separador y Concentrador.

Los geles se preparan mezclando, en un recipiente, los componentes indicados en la Tabla 1. El persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar y rápidamente proceder al llenado con la mezcla (las cantidades indicadas dan para dos geles). La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes y pipetear. Primero se polimeriza el gel separador en el soporte para Mini geles de Bio-Rad.

### Elaboración del Geles

Reactivos	Porcentaje Gel		Concentrador	
	10 %	15 %		
Agua Desionizada (ml)	4.02	2.34	Agua Desionizada (ml)	3.05
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (ml)	2.5	2.50	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (ml)	1.25
SDS 10 % (ml)	0.1	0.1	SDS 10 % (ul)	50
Acrilamida-Bis (ml)	3.33	5	Acrilamida-Bis (ul)	650
TEMED ul	10	10	TEMED (ul)	10
Persulfato de Amonio (ul)	50	50	Persulfato de amonio (ul)	25
Volumen total (ml)	10	10	Volumen total (ml)	5

**Tabla 3.** Elaboración de los Geles Separador y Concentrador de Poliacrilamida.

### **Electroforesis y Transferencia**

- Se cargaron en el gel con las diferentes muestras.
- Realizamos la electroforesis en gel con un buffer de tris-glicina (TGS1X) a un voltaje de 100-130 V durante 2 horas.
- Transferimos el gel a la membrana de nylon (SERVA) a la medida del gel, aprox. 8.5x5.5 cm, verificando que no queden burbujas entre gel y membrana. La transferencia se realiza durante 1h a 100V, o a 30V toda la noche a 4°C.
- Verificamos que la transferencia si hubiese sido efectiva observando el marcador de peso molecular en la membrana y no en el gel.
- Extrajimos y lavamos suavemente la membrana de nylon en PBS1X-0,1% de Tween-20 por unos segundos.

### **Bloqueo de la Membrana**

Previene la unión no específica al anticuerpo primario y secundario de la membrana.

- Incubamos la membrana en solución de bloqueo, PBS 1X + 0,1% de Tween- 20+3 % de leche desnatada.
- Lavamos la membrana con PBS 1X-Tween-20 al 0,1%, 10 min, 3 veces.

### **Incubación con anticuerpos**

- Incubamos la membrana con el anticuerpo primario (clon MEM-G/1 y clon MEM-G/4, Exbio). Realizamos una dilución de éste (1:500) en PBS1X-Tween 0,1% + 3% de leche desnatada, durante 2 horas toda la noche a 4°C en agitación.
- Lavamos la membrana 3 veces con PBS 1X- 0,1% de Tween-20, 10 min en agitación.
- Incubamos la membrana con el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate, Merck Millipore). Realizamos una dilución de éste (1:1000) en PBS 1X-0,1% de Tween 20

- y 3% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- Lavamos la membrana con PBS1X-0,1% Tween 20, 10 min, 3 veces antes de revelar.

### Revelado

- Mezclamos el reactivo de quimioluminiscencia y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% 1:1000 para obtener la solución de detección.
- Removimos el exceso de tampón y añadimos la solución de detección directamente e incubamos durante 1-2 minutos a temperatura ambiente.
- Retiramos el exceso de solución de detección y envolver en papel film para revelar en el equipo *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System* (Bio-Rad).

### 7.4 ELISA

Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático sándwich. Se emplea un anticuerpo específico para HLA-G para revestir una microplaca. Se utilizó un Kit de ELISA desarrollado por el laboratorio del Profesor Gonzalo Rubio, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Inmunología, Universidad de Murcia. Se utilizó de manera complementaria el Kit comercial de ELISA para detección de HLA-G de la casa comercial EXBIO.

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

#### ELISA sHLA:

- Las tiras de 8 pocillos Nunc-Immuno Plate MaxiSorp se recubrieron con 50µL/pocillo de AcMo MEM-G/9 a 5µg/mL en PBS 0.15M pH7.2 o preferentemente en tampón bicarbonato 0.05M pH9.6. Se agitó e incubó 1h a 37°C y ON a 4°C. Se dejó la periferia sin mAb y con abundante líquido.
- Lavamos 3 veces con 300µL de PBS-0.05% Tween-20.

- 
- Saturamos con 200µL de PBS-2% BSA incubando 1 h a 37°C. Mientras tanto, se descongelaron las muestras, el estándar SGUM o equivalente y el ctr. G25. Agitamos con el vortex y centrifugamos 1 minuto en minifuga. Preparamos una dilución seriada ½ del estándar en tubos eppendorf, diluyendo con su medio de cultivo: las muestra se diluyeron mínimo hasta 0.5 U/mL).
- Lavamos 3 veces con 300µL de PBS-0.05% Tween 20.
- Pipeteamos en todos los pocillos 25 µL de PBS al 1% en BSA.
- Pipeteamos 25µL de los estándares, controles muestras y blancos (CM-10 o su medio para estándares y controles, y PBS al 1% en BSA para muestras). Incubamos 1h en agitación a temperatura ambiente y otra hora a 37°C sin agitación.
- Invertimos la placa y golpeamos sobre secante, y lavamos 6 veces con 300µL de PBS-0.05% Tween 20.
- Añadimos 50µl del AcMo secundario biotinilado W6/32 diluido a 1/2000 (entre 1/1000 (0.1µg/mL) – 1/4000) en PBS al 1% en BSA. Agitar 5 minutos e incubamos ON a 4°C, y al día siguiente 30 min en agitación a temperatura ambiente y 30 minutos a 37°C. Opcionalmente: 2h a temperatura ambiente.
- Lavamos 4 veces con 300µL de PBS-0.05% Tween 20.
- Adicionamos 50µL de Estreptavidina-Peroxidasa diluida a 1/20000 (0.05µg/mL) en PBS-1% BSA (opcionalmente+0.05% Tween-20) e incubamos 15 minutos en agitación a TA y otros 15 minutos a 37°C.
- Lavamos 5 veces con 300µL de PBS-0.05% Tween-20, con 1 minuto de reposo con la solución de lavado entre cada ciclo.
- Añadimos 50µL del sustrato TMB (Sigma) e incubar 30 minutos en oscuridad. Si se emplea OPD, 0.5mg/ml, 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 comprimido de 20 mg en 39.33 mL de tampón citrato+0.667 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (final 0.05%).
- Paramos la reacción con 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y agitar suavemente 5 minutos.

- Se leyó la absorbancia a: si TMB 450nm / si OPD 490nm con filtro de referencia a 690nm.
- Calculamos las concentraciones mediante una gráfica estándar U/mL sHLA-G vs ABS ajustada obtenida de la dilución seriada del estándar. Se debe tener en cuenta la dilución 1/2 de las muestras.

### **8. Secuenciación y selección OTU**

#### **Recolección de muestras y aislamiento de ADN**

Tipo de Muestra: Materia Fecal

Las muestras fecales se recogieron y almacenaron inmediatamente a -20°C. Posteriormente, las muestras se enviaron al laboratorio de la Dra. Yolanda Sanz en IATA, Valencia. Allí se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se utilizó una alícuota de 150 mg de heces para aislar el ADN utilizando el Kit de Aislamiento de ADN PowerFecal® (Mo Bio Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se cuantificó el ADN genómico fecal por métodos UV y se obtuvo una alícuota de ADN de 20 ng/al para estudiar las comunidades microbianas intestinales a través de la secuenciación con amplicón 16S. Las regiones hipervariables V4-V5 del gen rRNA 16S bacteriano se amplificaron utilizando 20 ng de ADN (1 µl de alícuota diluida) y 25 ciclos de PCR a 95°C durante 20 s, 40°C durante 30 s y 72°C durante 20 s. Phusion High-Fidelity Taq Polymerase (Thermo Scientific) y los cebadores de código de barras 6-mer SD-Bact-0563-aS-15 (AYTGGGYDTAAAGNG) y SD-Bact-0907-aA-20 (CCGTCAATTYMTTTRAGTTT), que se dirigen a una amplia gama de bacterias 16S rRNA genes se utilizaron durante la PCR.

Se purificaron a partir de reacciones triplicadas productos de PCR de doble código de barras, que constaban de ~360 pb, utilizando el kit de ensayo de ADN de Illustra GFX y gel de banda y se cuantificaron a través de Qubit 3.0 y el kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se multiplexaron combinando cantidades equimolares de ADN de

amplicón (100 ng por muestra) y se enviaron a Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Alemania) para realizar la secuenciación de alto rendimiento de Illumina MiSeq con configuración PE de 2x300. Los datos crudos fueron entregados en archivos fastq y los extremos de pareja con filtrado de calidad se ensamblaron usando el software Flash<sup>22</sup>. La desmultiplexación de la muestra se llevó a cabo utilizando la información de secuencia de los respectivos códigos de barras de ADN y Mothur v1.36.1 suite de análisis<sup>23</sup>. Después del ensamblaje y la separación de los códigos de barras/cebadores, las secuencias se procesaron para la eliminación de la quimera utilizando el algoritmo Uchime<sup>27</sup> y el conjunto de referencia SILVA de secuencias 16S<sup>25</sup>. La diversidad alfa se calculó con Mothurv1.36.1 usando los parámetros de defecto y método promedio en el paso de agrupamiento. Por consiguiente, la riqueza del Chao, la uniformidad de Shannon y el índice recíproco de Simpson se calcularon utilizando un subconjunto de 10.000 secuencias de alta calidad y una muestra normalizada, seleccionada al azar después de barajar (10,000X) del conjunto de datos original. La evaluación taxonómica se realizó utilizando el clasificador RDP (Wang et al., 2007). El enfoque de la Unidad Taxonómica Operacional (OTU) -picking se realizó con el subconjunto normalizado de 10.000 secuencias y el algoritmo uclust implementado en USEARCH v8.0.1623<sup>24</sup>. Se realizó un análisis no paramétrico lineal discriminante (LDA)<sup>28</sup> (entre los controles y los individuos con alergia a las proteínas alimentarias (FPA) no mediada por IgE para medir las diferencias entre las comunidades microbianas fecales a diferentes niveles de taxonomía usando Lefse. Además, se utilizaron como variables covariables en los enfoques de diversidad beta basados en las distancias ponderadas Unifrac<sup>29</sup> y en el análisis de Permanova a través de la serie de análisis qiime<sup>30</sup>

**Evaluación dietética:** Todos los participantes fueron instruidos sobre cómo mantener un registro de comida de tres días (ANEXO II, III). Se proporcionó información detallada sobre cómo registrar los alimentos y bebidas consumidos usando las medidas comunes de los hogares. Los registros de alimentos se verificaron para su completitud y tres fueron excluidos del análisis de la ingesta de alimentos debido a los registros de alimentos incompletos. Tres días de

registro de alimentos y se calculó para ellos la ingesta de macronutrientes. Los nutrientes se estimaron utilizando el software open-source DIAL que incorpora una amplia base de datos de composición de alimentos española (<http://www.alceingenieria.net/nutricion/descarga.htm>). Se calcularon las medias y la desviación estándar de las ingestas diarias de energía (kcal), proteína (g), carbohidrato (g), grasa (g), colesterol (mg) y fibra (g). El t-test no pareado se utilizó para comparar medias de grupo entre FPA y los controles.





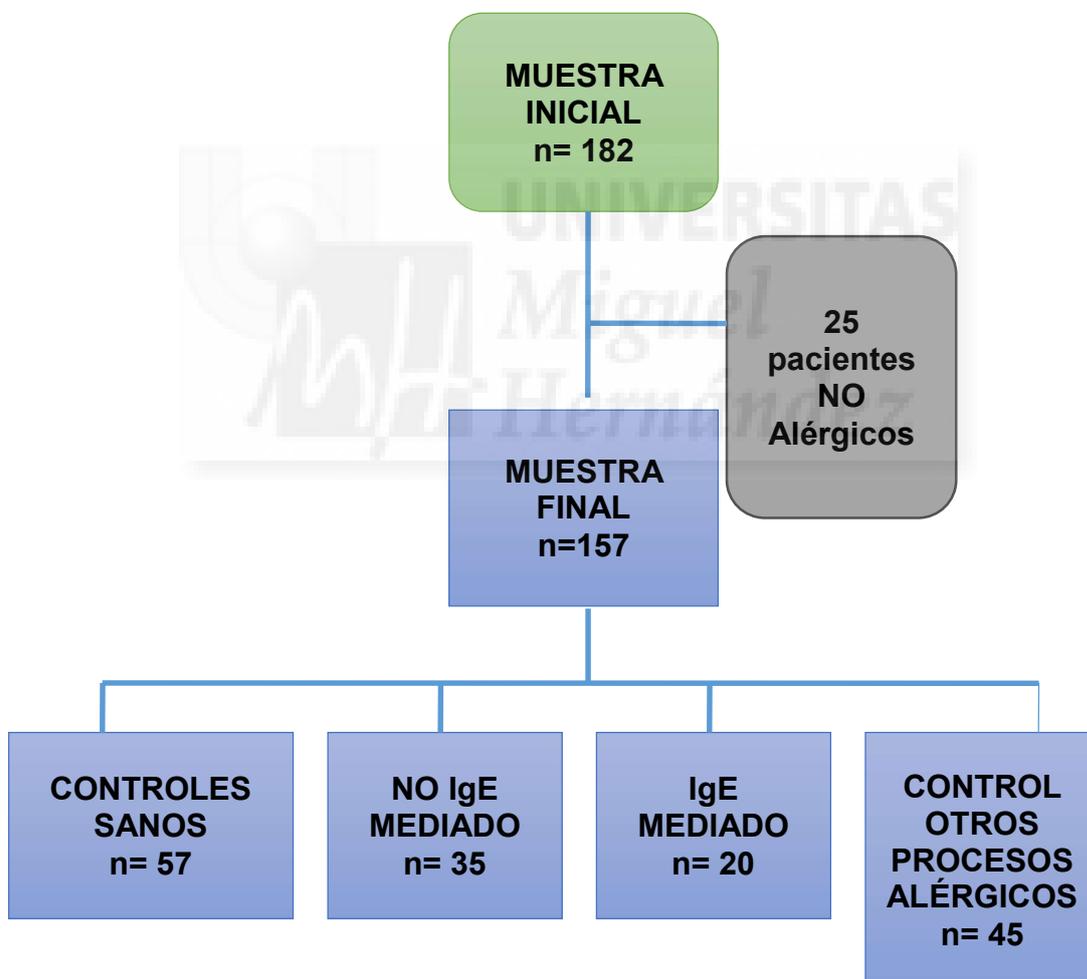
## **IV. RESULTADOS**





## 1. MUESTRA DEL ESTUDIO

La muestra estudiada se compuso de un total de 182 individuos, de los cuales 25 pacientes fueron excluidos debido a que no cumplieron los criterios de inclusión. Finalmente la muestra fue de 157 pacientes con sospecha de alergia alimentaria, que acudieron a la consulta del Servicio de Alergia del Hospital General de Alicante. Tras el proceso de realización del prick test y de diagnóstico se distribuyeron en cuatro grupos:



**Figura 7.** Clasificación de grupos de estudio utilizados para el estudio.

## 1.1 GRUPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio que fue planteado nos permite observar de forma unilateral el posible impacto del polimorfismo de 14 pb del exón 8, el alelo nulo 01:05N de HLA-G, la detección de la proteína soluble sHLA-G en la mediación de la tolerancia en las alergias alimentarias, y su relación con la microbiota intestinal en pacientes con edad pediátrica. Este estudio se realizó en pacientes que se capturaron en la consulta del Servicio de Alergia del Hospital General de Alicante.

GRUPO	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
CONTROL SANO	57	36,3 %	36,3 %	36,3
NO IgE MEDIADO	35	22,3 %	22,3 %	58,6
IgE MEDIADO	20	12,7 %	12,7 %	71,3
CONTROL OTROS PROCESOS ALERGICOS	45	28,7 %	28,7 %	100,0
Total	157	100,0 %	100,0 %	

**Tabla 4.** Descripción de los grupos de pacientes

## 1.2 DATOS DEMOGRÁFICOS

Este estudio se realizó con pacientes que fueron seleccionados en la consulta del Servicio de Alergia del Hospital General de Alicante, con sintomatología compatible con alergia alimentaria, y a otro tipo de alérgenos. La muestra se clasificó en cuatro grupos: Controles Sanos, y pacientes No IgE mediados, IgE Meditados y o con otros procesos alérgicos.

El procedimiento para obtener la mayor información de los pacientes en la consulta de alergia permitió disminuir la pérdida de información de los pacientes y de ésta forma poder realizar un correcto diagnóstico.

Fueron cruciales para la selección de los pacientes las siguientes herramientas:

**La anamnesis:** en la consulta ya que ésta aborda la realización de la historia clínica y establece un correcto diagnóstico de cada uno de los pacientes y controles.

**Las Pruebas Cutáneas:** éstas fueron realizadas por el personal de experimentado de enfermería del Servicio de Alergia del Hospital General de Alicante, en las cuales de manera protocolizada y con extractos estandarizados se pudo establecer el perfil alérgico alimentario en cada uno de los pacientes y controles. La única limitación de ésta prueba es la ingesta de antihistamínicos por parte de los pacientes, a los cuales se les informa de una manera previa el no uso de éstos una semana antes de realizarse la prueba.

**IgE Total y Específica:** La determinación de la IgE total se realizó de manera cuantitativa con InmunoCAP Total IgE en muestras de suero de cada uno de los pacientes y controles. La determinación de la IgE específica presenta la limitación de no utilizar alérgenos específicos, sino que se utilizan extractos alergénicos de alimentos.

**InmunoCAP ISAC (Phadia):** Ésta técnica es un inmunoensayo de fase sólida donde los componentes alergénicos están inmovilizados de manera covalente al sustrato sólido, en un formato de microarray. La fluorescencia se mide con un escáner láser y los resultados se evalúan utilizando el software de Microarray Image Analysis. Los valores superiores a 0.34 kU/l se consideraron positivos.

### **Edad y Sexo**

**Edad:** La edad de los pacientes y controles se encontró una media de 30 años en el grupo Control Sano; 19 años en el grupo No IgE Mediado; 32 años en el grupo IgE mediado y de 38 años en el grupo Otros Procesos Alérgicos. Abarcando una diversidad de edades desde una niño de

tres años hasta un adulto de 70 años, y en el grupo donde se observaron pacientes con edad pediátrica corresponde a el grupo No IgE Mediado, debido a que la mayoría de éstos presentaban un cuadro clínico de FPIES y por lo tanto fueron nuestro principal objeto de estudio.

Sexo: En cuanto a la distribución por sexos, se encontraron en mayor proporción el porcentaje del género femenino en los grupos control sano, No IgE mediado y otros procesos alérgicos, a diferencia del grupo IgE mediado, donde fue similar el porcentaje tanto del género femenino como masculino.

Los pacientes seleccionados para el estudio se muestran reflejados en la siguiente tabla. Encontramos una mayor proporción de pacientes de género femenino en los grupos control sano, No IgE mediado y otros procesos alérgicos, a diferencia del grupo IgE mediado, donde fue similar el porcentaje tanto del género femenino como masculino.

		CONTROL SANO	NO IgE MEDIADO	IgE MEDIADO	OTROS PROCESOS ALÉRGICOS	TOTAL
	<b>EDAD</b>	30,82 $\pm$ 12	19,59 $\pm$ 14	32,80 $\pm$ 13	38,76 $\pm$ 17	30,52 $\pm$ 16
	<b>FEMENINO</b>	35 (61,4%)	24 (68,6%)	10 (50,0%)	35 (77,8%)	104 (66,2%)
	<b>MASCULINO</b>	22 (38,6%)	11 (31,4%)	10 (50,0%)	10 (22,2%)	53 (33,8%)
	<b>TOTAL</b>	57 (100,0%)	35 (100,0%)	20 (100,0%)	45 (100,0%)	157 (100,0%)

**Tabla 5.** Datos descriptivos de carácter demográfico para el grupo de pacientes de estudio.

### 1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Según los resultados obtenidos, podemos observar en la siguiente tabla que la sintomatología clínica referida por los pacientes varía según el grupo de

estudio. Los síntomas predominantes fueron vómito en 35 pacientes del grupo No IgE Mediado; angioedema, urticaria y asma en 20 pacientes del grupo IgE Mediado y Rinitis en 38 pacientes del grupo Otros Procesos Alérgicos.

SINTOMATOLOGIA	GRUPO				
	CONTROL SANO	NO IgE MEDIADO	IgE MEDIADO	OTROS PROCESOS ALÉRGICOS	TOTAL
NINGUNA	57 (100,0%)	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
VOMITO	0,0%	35 (100,0%)	0,0%	0,0%	100,0%
ANGIOEDEMA, URTICARIA, ASMA	0,0%	0,0%	20 (100,0%)	0,0%	100,0%
RINITIS	0,0%	0,0%	0,0%	38 (100,0%)	100,0%
RINITIS, EFECTO ADVERSO A MEDICAMENTO	0,0%	0,0%	0,0%	6 (100,0%)	100,0%
RINITIS, URTICARIA A INSECTOS	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
<b>Total</b>	57 (36,3%)	35 (22,3%)	20 (12,7%)	45 (28,7%)	100,0%

Tabla 6. Porcentaje de pacientes por grupo de estudio según sintomatología clínica.

#### 1.4 PRUEBAS CUTÁNEAS

Se realizaron pruebas cutáneas a cada paciente de los diferentes grupos de estudio reflejándose el resultado en la siguiente tabla (Tabla 9). En los 35 pacientes del grupo No IgE mediado las pruebas de prick test fueron negativas.

RESULTADO PRUEBAS CUTÁNEAS (PRICK-Test)/ALÉRGENO	GRUPO				
	CONTROL SANO	NO IgE MEDIADO	IgE MEDIADO	OTROS PROCESOS ALÉRGICOS	TOTAL
NEGATIVO	57 (62,0%)	35 (38,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	92 (58,6%)
POSITIVO	0 (0,0%)	0 (0,0%)	20 (30,8%)	45 (69,2%)	65 (41,4%)
<b>Total</b>	57 (36,3%)	35 (22,3%)	20 (12,7%)	45 (28,7%)	157 (100,0%)

Tabla 7. Relación entre pruebas cutáneas y grupos de estudio.

### 1.5 RELACIÓN DE ALÉRGENOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Respecto a los alérgenos a los que estaban sensibilizados los distintos pacientes del grupo de estudio, se encontró un mayor número de casos positivos al pescado como alérgeno en el grupo No IgE Mediado en comparación con los otros grupos de estudio. En el caso del grupo IgE Mediado se disponía de un mayor número de casos positivos al alérgeno LTP, y en el caso del grupo “Otros procesos alérgicos” se encontró un mayor número de casos positivos a los alérgenos ácaros y polen respectivamente. En la siguiente tabla (Tabla 10), se refleja qué alérgenos han sido predominantemente encontrados en relación a los grupos de estudio por lo cual podemos establecer diferencias entre el número de casos positivos a los diferentes alérgenos entre los diferentes grupos.

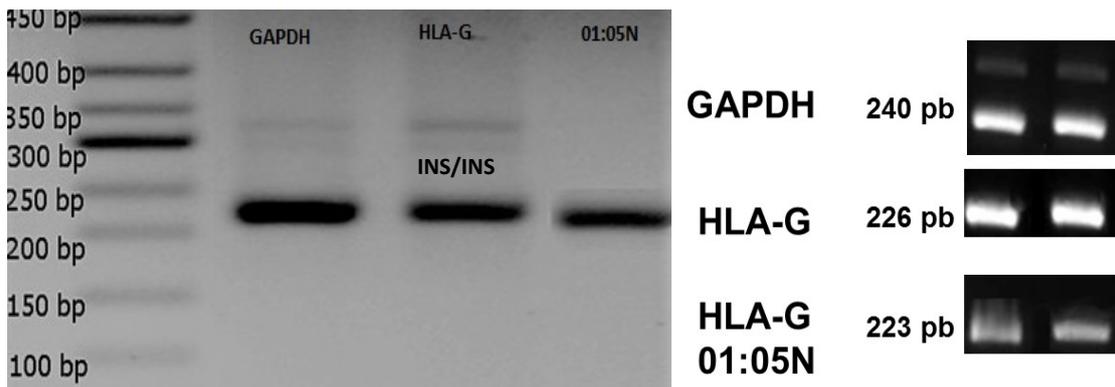
ALÉRGENO	RESULTADO	GRUPO			
		CONTROL SANO	No IgE MEDIADO	IgE MEDIADO	OTROS PROCESOS ALÉRGICOS
		Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
PESCADO	POSITIVO	0	<b>30</b>	4	0
	NEGATIVO	57	5	16	45
MARISCO	POSITIVO	0	0	2	0
	NEGATIVO	57	35	18	45
LTP	POSITIVO	0	5	<b>16</b>	0
	NEGATIVO	57	30	4	45
ÁCAROS	POSITIVO	0	0	6	<b>27</b>
	NEGATIVO	57	35	14	18
HONGOS	POSITIVO	0	0	0	1
	NEGATIVO	57	35	20	44
MEDICAMENTOS	POSITIVO	0	0	0	7
	NEGATIVO	57	35	20	38
POLEN	POSITIVO	0	0	10	<b>18</b>
	NEGATIVO	57	35	10	27
PROTEINA DE LA LECHE	POSITIVO	0	1	0	0
	NEGATIVO	57	34	20	45

EPITELIO PERRO	POSITIVO	0	0	0	8
	NEGATIVO	57	35	20	37
EPITELIO GATO	POSITIVO	0	0	3	11
	NEGATIVO	57	35	17	34
EPITELIO CONEJO	POSITIVO	0	0	1	4
	NEGATIVO	57	35	19	41
EPITELIO CABALLO	POSITIVO	0	0	1	1
	NEGATIVO	57	35	19	44
VÉSPULA	POSITIVO	0	0	0	1
	NEGATIVO	57	34	20	44

**Tabla 8.** Relación tipo de alérgeno y grupos de estudio.

## 2. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECCIÓN/INSERCIÓN DE 14 PARES DE BASES EN EL EXÓN 8 DE HLA-G.

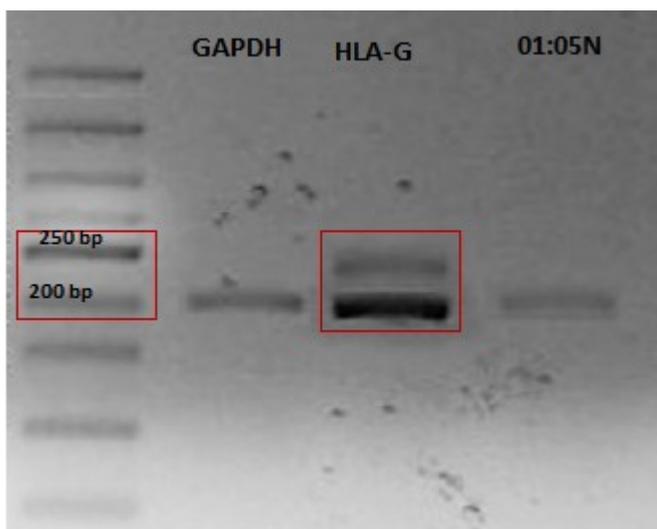
Utilizando la técnica de PCR descrita anteriormente para la detección de productos genómicos, se analizaron las muestras de DNA procedentes de saliva de los 157 pacientes incluidos en el estudio. En contraste con el extensivo polimorfismo de los genes clase I clásicos del HLA, se ha considerado bajo el grado de polimorfismo en el locus del HLA-G, presentando una limitada heterogeneidad de secuencias y con pocos alelos descritos. El \*0105N es el primer alelo nulo del HLA-G descrito, presenta una delección de una citosina (1597 del C) en la tercera base del codón 129 o en la primera base del codón 130, esto causa un cambio estructural que altera la secuencia de aminoácidos en el exón 3 (dominio a2) y genera un codón de parada prematuro en el exón 4. Por lo tanto es altamente probable la alteración en la proteína soluble sHLA-G y por tanto la no detección de ésta por los métodos tradicionales de determinación. Se realizó la determinación del polimorfismo delección/inserción 14 bp del exón 8 de HLA-G y el alelo nulo 01:05N en cada una de las muestras de ADN extraído a partir de saliva (Figura 6).



**Figura 8.** Detección de polimorfismo ins/ins de 14 pb de HLA-G y alelo nulo 01:05N por PCR.

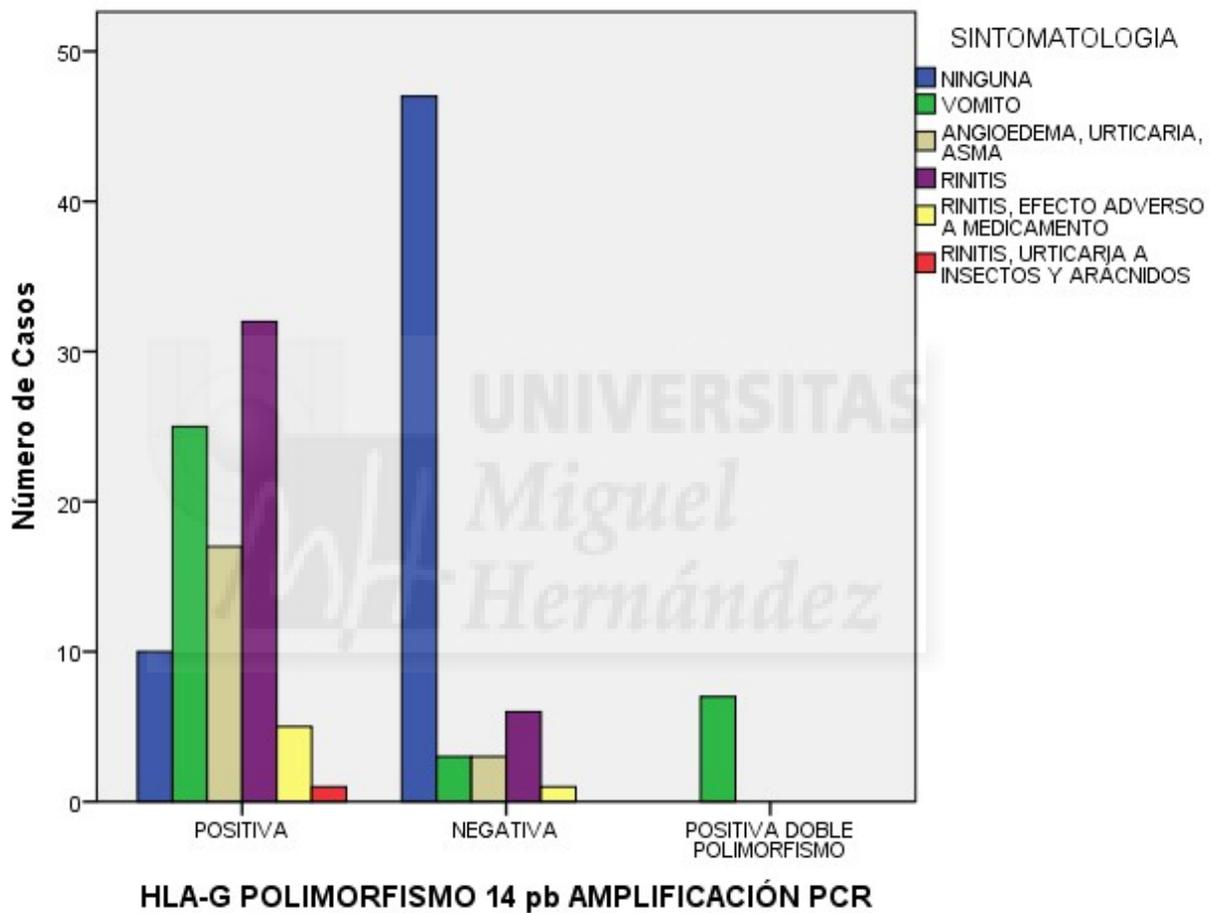
En la figura 8 se muestra un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa al 2% de muestras de ADN de los pacientes con alergia alimentaria los controles sanos, donde podemos observar la amplificación del control positivo GAPDH, el polimorfismo de 14 pb de HLA-G con 226 pb y la amplificación del alelo nulo 01:05N. La interpretación que se denomina en éste tipo de ensayos a una muestra es “amplificación positiva” o “amplificación negativa”. Con este ensayo determinamos el perfil genético polimórfico de HLA-G en cada una de las muestras de pacientes con alergia alimentaria y sus respectivos controles.

En algunas ocasiones hemos podido detectar en 7 muestras un perfil polimórfico donde se puede observar una amplificación de “Doble Polimorfismo” en algunas muestras en las cuales se puede establecer un perfil heterocigótico.

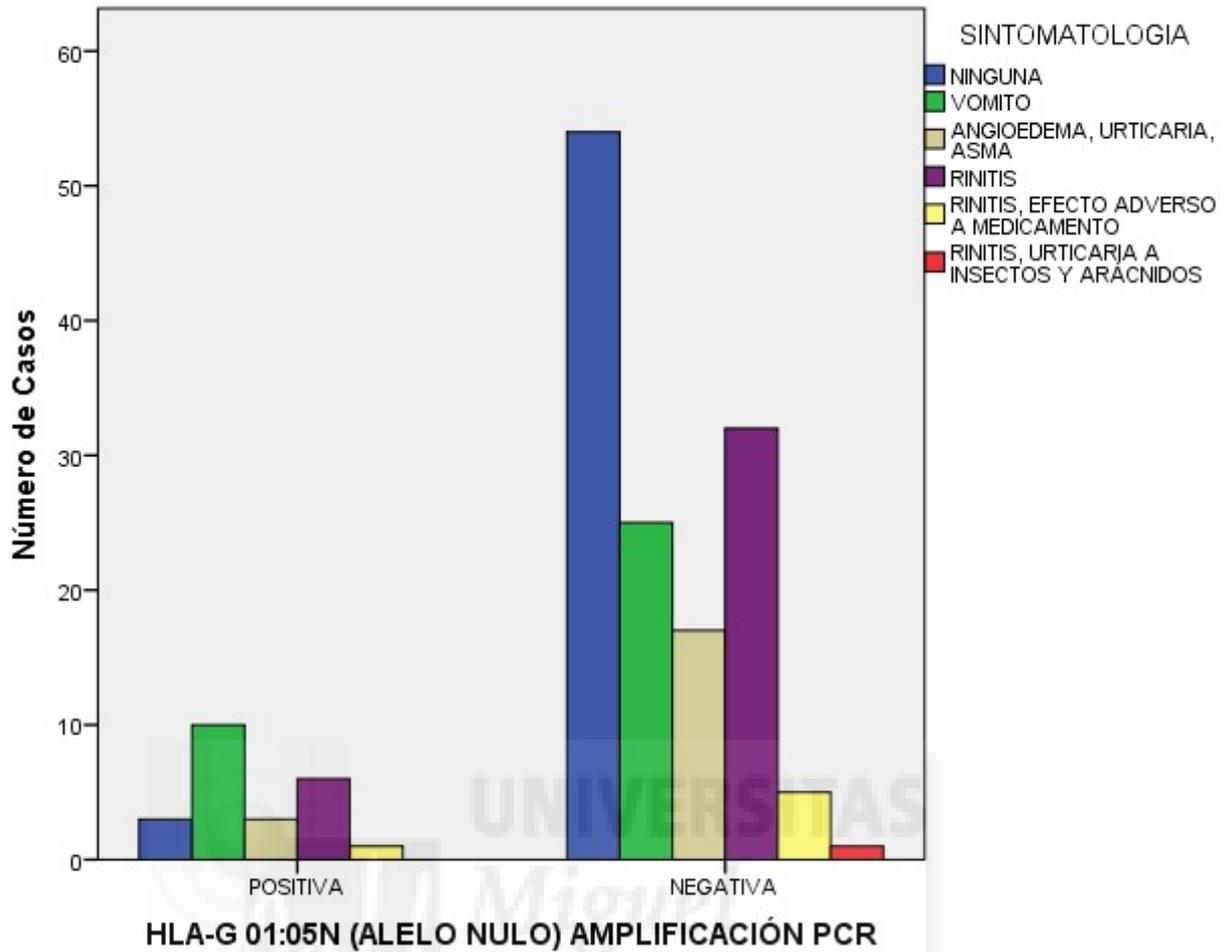


**Figura 9.** Determinación del doble polimorfismo (ins/del) en un paciente con alergia alimentaria no mediada por IgE.

Posteriormente procedimos a realizar un análisis de los síntomas clínicos y su correlación con la detección de éste polimorfismo de 14 bp y el alelo nulo 01:05N en las muestras de cada uno de los pacientes con alergia alimentaria y los controles sanos, para establecer una asociación con la sintomatología y su respectivo cuadro clínico.

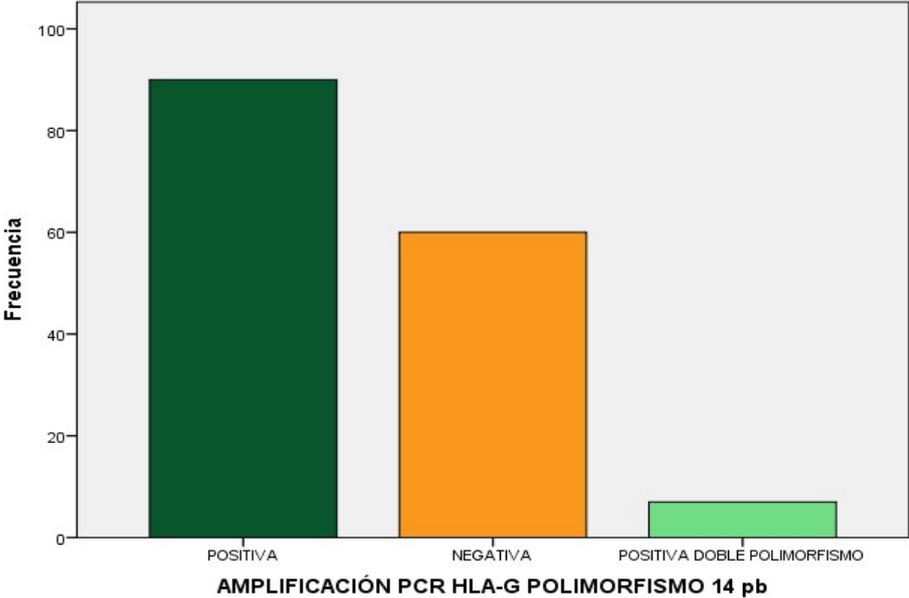


**Figura 10.** Asociación de la sintomatología y el polimorfismo de 14 bp HLA-G en cada una de las muestras de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.

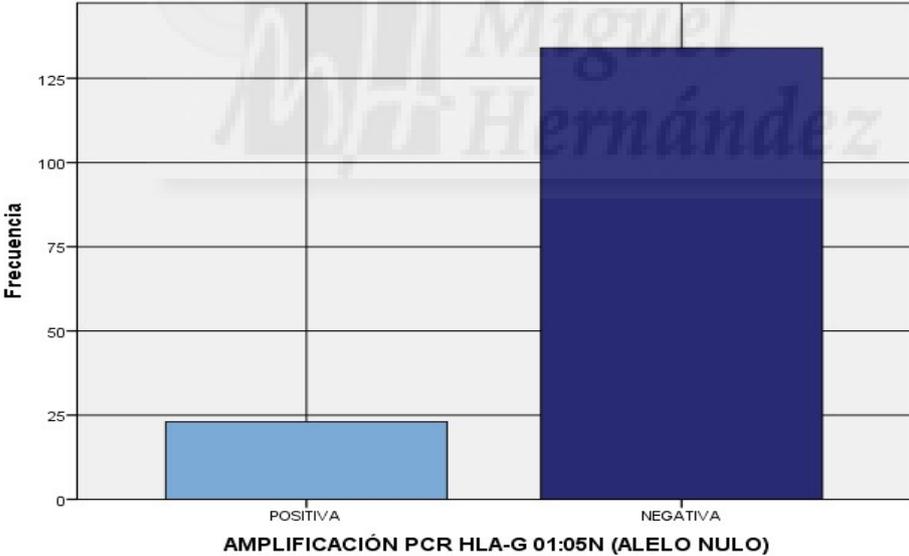


**Figura 11.** Asociación de la sintomatología y alelo nulo 01:05N HLA-G en cada una de las muestras de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.

A)



B)



**Figura 12. A)** Frecuencia del polimorfismo de 14 bp de HLA-G en todas las muestras de los grupos de estudio. **B)** Frecuencia del alelo nulo 01:05N de HLA-G en todas las muestras de los grupos de estudio.

HLA-G POLIMORFISMO 14 bp AMPLIFICACIÓN PCR					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	POSITIVA	90	57,3	57,3	57,3
	NEGATIVA	60	38,2	38,2	95,5
	POSITIVA DOBLE POLIMORFISMO	7	4,5	4,5	100,0
	Total	157	100,0	100,0	

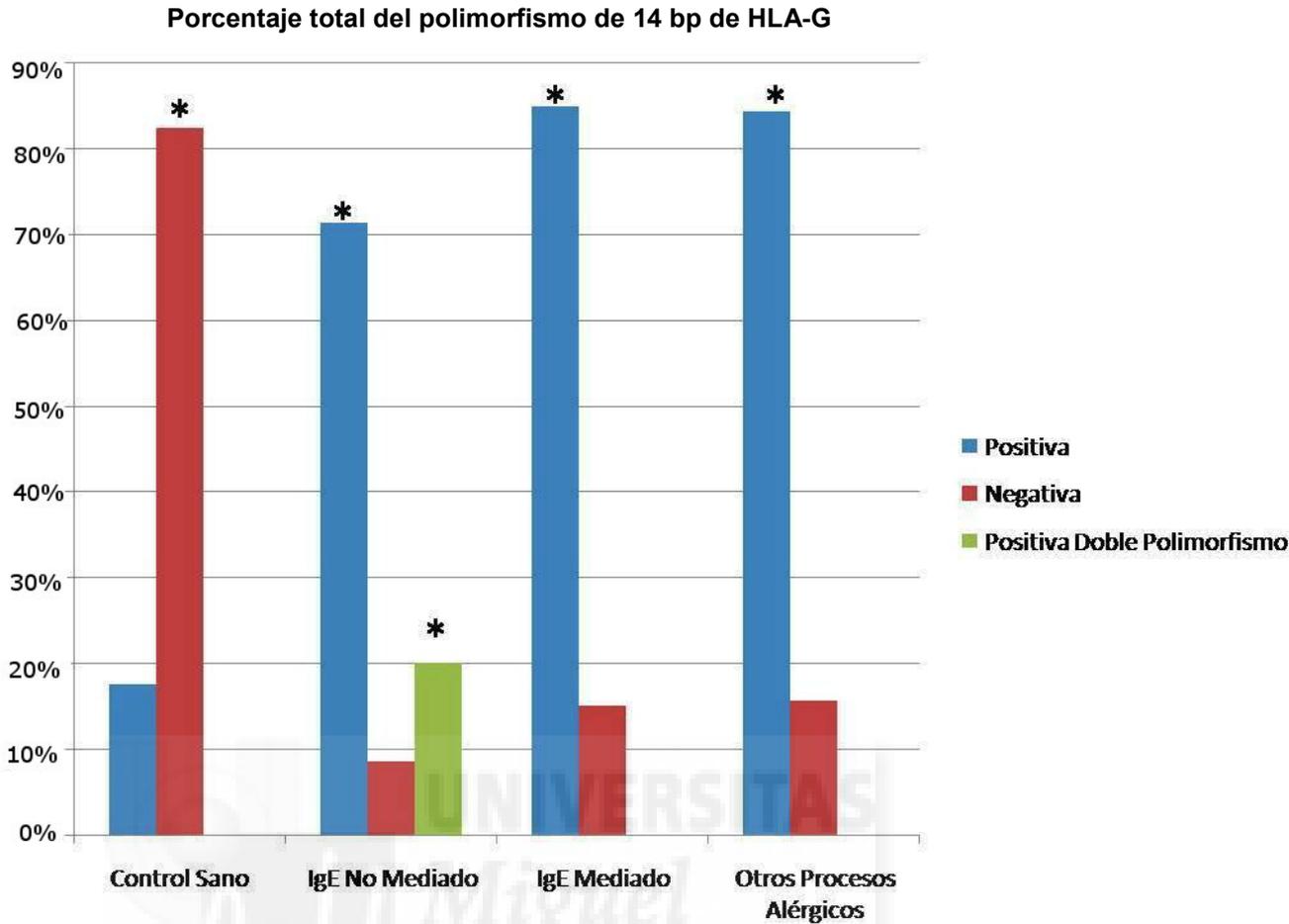
**Tabla 9.** Frecuencia y porcentaje total del polimorfismo 14 bp HLA-G analizado en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.

En el 57,3% de las muestras analizadas se encontró una amplificación POSITIVA del polimorfismo de 14 pb HLA-G.

El 38,2% de las muestras analizadas fueron NEGATIVAS para la amplificación del polimorfismo de 14 pb de HLA-G.

HLA-G 01:05N (ALELO NULO) AMPLIFICACIÓN PCR					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	POSITIVA	23	14,6	14,6	14,6
	NEGATIVA	134	85,4	85,4	100,0
	Total	157	100,0	100,0	

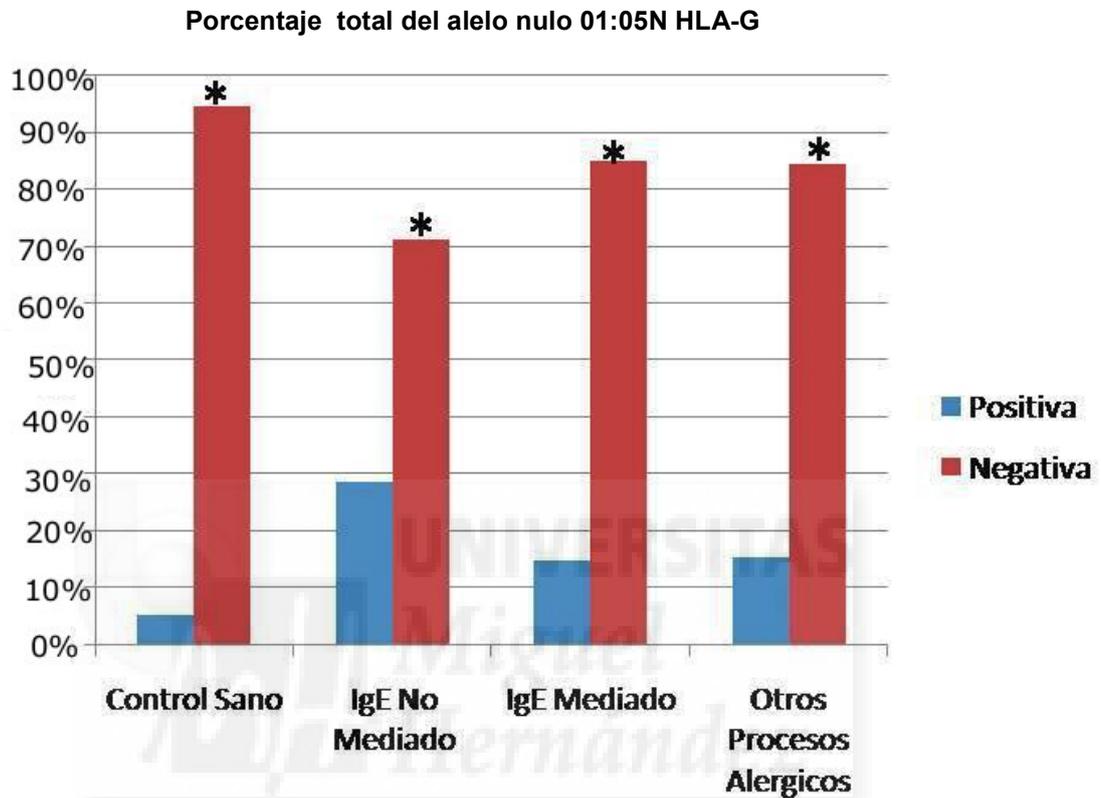
**Tabla 10.** Frecuencia y porcentaje total del alelo nulo 01:05N HLA-G, analizado en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y controles sanos.



**Figura 13.** Porcentaje total del polimorfismo de 14 bp de HLA-G analizado en las muestras de cada uno de los grupos de estudio. P valor <0.001.

En el grupo de controles sanos podemos establecer 17,5% de las muestras analizadas se encontró una amplificación POSITIVA, un 82,5% con una amplificación NEGATIVA y en ninguna muestra hubo amplificación del doble polimorfismo de 14 pb HLA-G. En el grupo de No IgE Mediados se detectó amplificación POSITIVA en un 71,4% de las muestras analizadas, un 8,6% con una amplificación NEGATIVA y de forma significativa, el 20% de pacientes con amplificación del doble polimorfismo de 14 pb HLA-G. En el grupo de IgE Mediado se determinó que un 85% de las muestras analizadas contaban con una amplificación POSITIVA, un 15% con una amplificación NEGATIVA y no se observó amplificación del doble polimorfismo de 14 pb HLA-G en este grupo de pacientes. En el grupo de “Otros procesos alérgicos”, un 84,4% de las

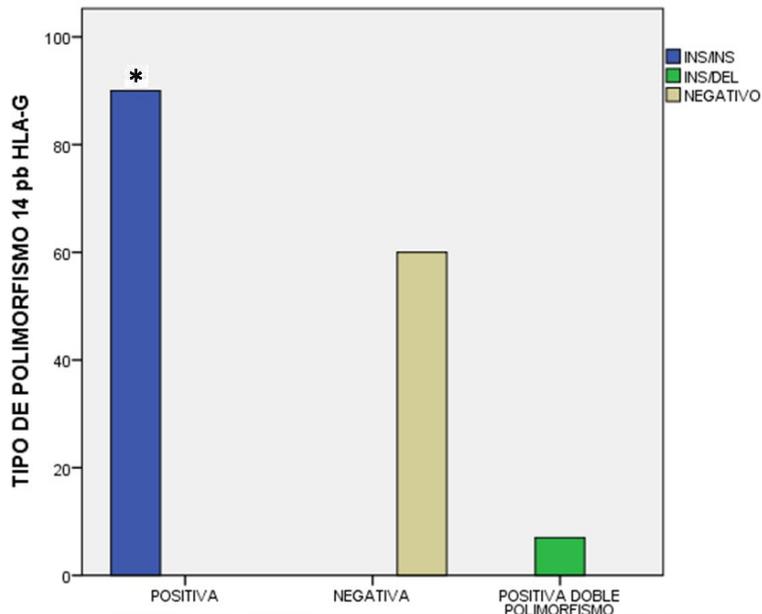
muestras analizadas fue de amplificación POSITIVA, un 15,6% con una amplificación NEGATIVA del doble polimorfismo de 14 pb HLA-G.



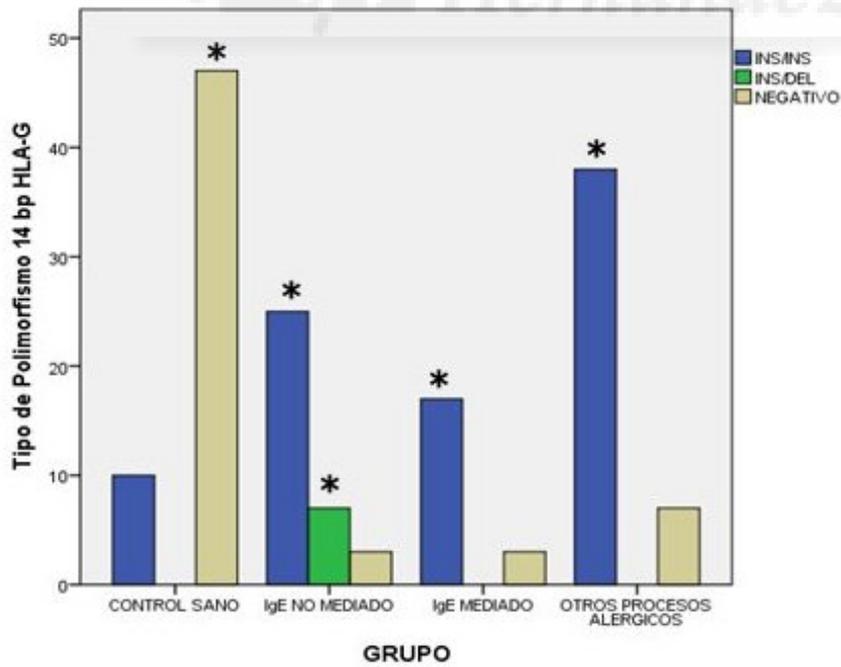
**Figura 14.** Porcentaje total del alelo nulo 01:05N HLA-G, analizado en las muestras de saliva de cada uno de los grupos de estudio.

En el grupo de controles sanos observamos que una amplificación POSITIVA en un 5,3% de las muestras analizadas, un 94,7% de muestras con una amplificación NEGATIVA. En el grupo de No IgE Mediado se observó una amplificación POSITIVA para el 28,6% de las muestras analizadas, y una amplificación NEGATIVA en un 71,4% de estas. En el grupo de IgE Mediado, el 15% de las muestras analizadas fue de amplificación POSITIVA, un 85% con una amplificación NEGATIVA. En el grupo de Otros procesos alérgicos se detectó una amplificación POSITIVA en el 15,6% de las muestras analizadas, y amplificación NEGATIVA en un 85,4% de dichas muestras.

A)



B)



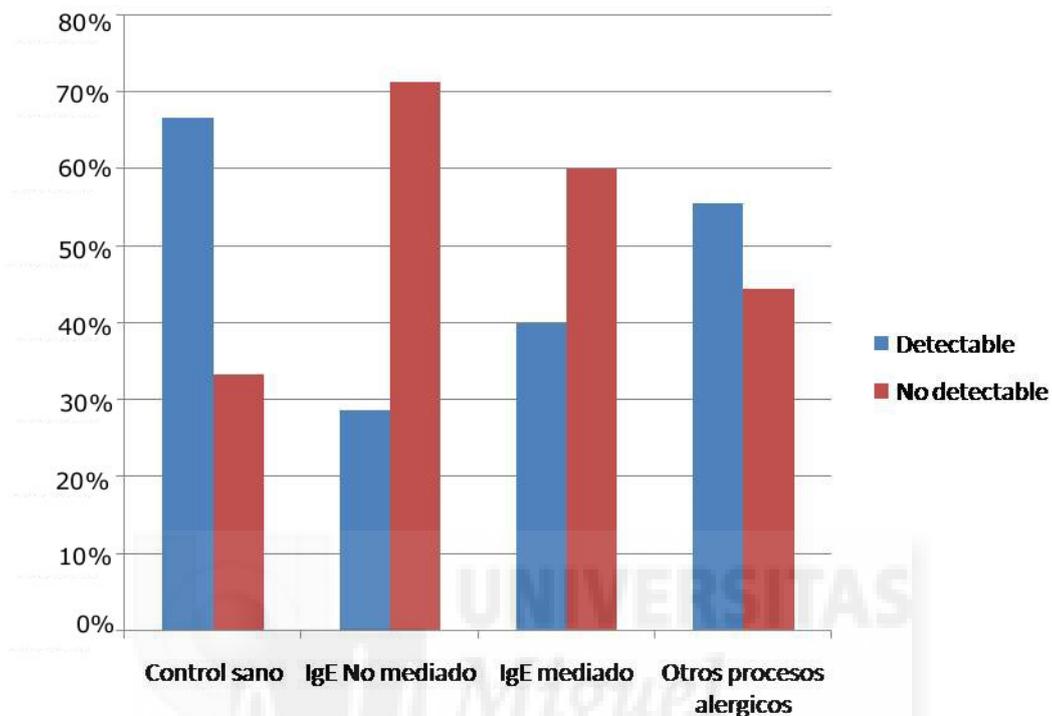
**Figura 15. A)** Frecuencia del tipo de polimorfismo de 14 bp ins/del de HLA-G. **B)** Recuento del tipo de polimorfismo de 14 bp ins/del de HLA-G.

En el grupo de controles sanos observamos que una mayor frecuencia de muestras con una amplificación NEGATIVA. En el grupo de no IgE mediado, IgE mediado y otros procesos alérgicos se evidenció una mayor frecuencia del polimorfismo ins/ins a diferencia del del/del y del ins/del. Sólo en el grupo no IgE mediado se observó un porcentaje bajo del polimorfismo ins/del, a diferencia de los demás grupos de estudio.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE sHLA-G.**

Las determinaciones de la proteína a nivel soluble (sHLA-G) se realizaron a partir de muestras de saliva de los pacientes con alergias alimentarias y controles sanos. El análisis de la proteína HLA-G se estableció como "Detectable" y "No detectable", se definió como punto de corte de 3,91 U/ml debido a que se establece como el límite de concentración más bajo del estándar del kit de la casa comercial EXBIO, y se correlacionó posteriormente con la presencia del polimorfismo a nivel genético y el resultado obtenido por la técnica Western Blot. El estudio y la determinación de ésta proteína a nivel soluble sHLA-G fue crucial para establecer con claridad la detección o no detección de ésta proteína por Western Blot, ya que se pudo definir en algunos pacientes en los cuales no se observó la detección de ésta proteína. En estos se logró determinar una baja concentración de pg/ml por ELISA, no detectada por Western Blot; por lo que se demuestra la sensibilidad del ELISA puesto a punto en este trabajo para sHLA-G.

Porcentaje de Detección de la Proteína Soluble sHLA-G



**Figura 16.** Porcentaje de detección de la proteína soluble sHLA-G a partir de muestras de saliva de los grupos de estudio. P valor <0,001.

En el grupo control la proteína fue “Detectable” en un 66,7% de donantes, y “No detectable” en un 33,3%. En el grupo No IgE Mediado se encontró la proteína “Detectable” en un 28,6% y “No detectable” en un 71,4%. En el grupo IgE Mediado se encontró proteína “Detectable” en un 40% y “No detectable” en un 60%. En el grupo “Otros procesos alérgicos” se encontró “Detectable” en un 55,6% y “No detectable” en un 44,4%. El grupo con un porcentaje mayor de pacientes donde no se detecta HLA-G es el de alérgicos IgE No Mediados.

sHLA-G (pg/ml)

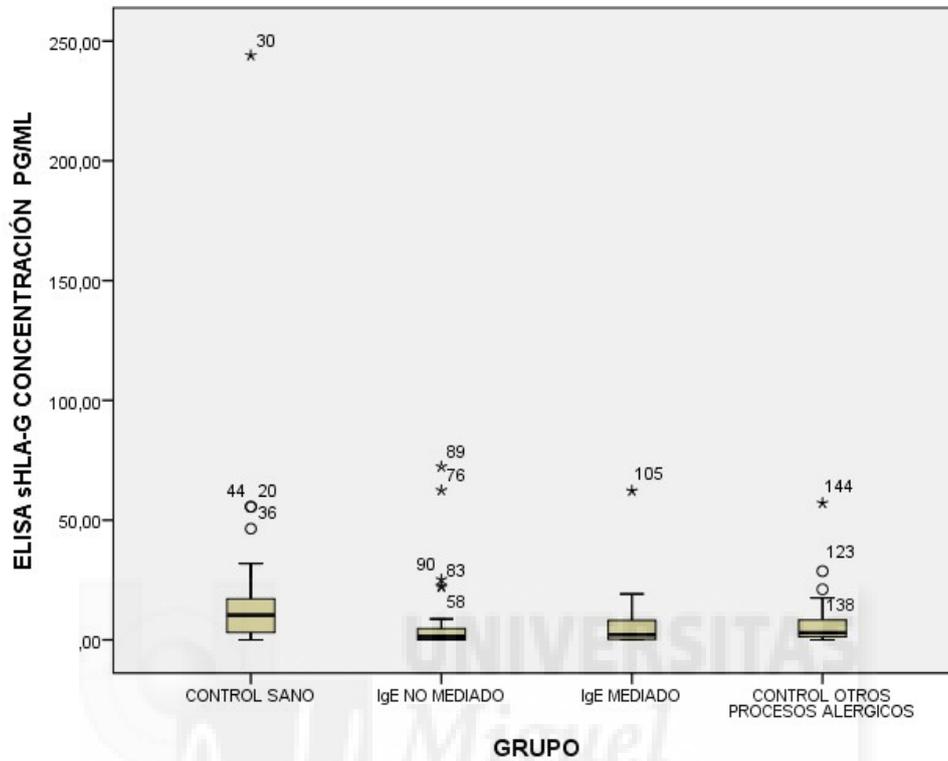


Figura 17. Determinación de la concentración de sHLA-G en pg/ml en las muestras de saliva de los grupos de estudio donde se observan las distintas concentraciones detectadas.

ELISA sHLA-G CONCENTRACIÓN PG/ML

<b>Control Sano</b>	<b>Media</b>		16,37
	95% de intervalo de confianza para la media	<b>Límite inferior</b> <b>Límite superior</b>	7,55
			25,18
	Mediana		10,34
	Varianza		1103,47
	Desviación estándar		33,21
<b>No IgE Mediado</b>	<b>Media</b>		7,31
	95% de intervalo de confianza para la media	<b>Límite inferior</b> <b>Límite superior</b>	1,68
			12,95
	Mediana		1,31
	Varianza		269,06
	Desviación estándar		16,40
<b>IgE MEDIADO</b>	<b>Media</b>		7,18
	95% de intervalo de confianza para la media	<b>Límite inferior</b>	0,63 13,74

	Mediana	<b>Límite superior</b>	2,10
	Varianza		196,11
	Desviación estándar		14,00
<b>IgE MEDIADO</b>	Media	<b>Límite inferior</b> <b>Límite superior</b>	6,31
<b>CONTROL OTROS PROCESOS ALERGICOS</b>	95% de intervalo de confianza para la media		3,39
	Mediana		9,24
	Varianza		3,00
	Desviación estándar	94,84	
			9,74

**Tabla 11.** Determinación de la concentración de la proteína HLA-G soluble (sHLA-G) realizada en las muestras de saliva en los diferentes grupos de estudio.

Se estableció una media de 16,37 pg/ml de concentración de sHLA-G en el grupo de controles sanos. El grupo IgE No Mediado presentó una media de concentración de sHLA-G de 7,31 pg/ml. En el grupo IgE Mediado se evidenció una media de concentración de sHLA-G de 7,18 pg/ml, y finalmente en el grupo Otros Procesos Alérgicos se detectó una concentración de sHLA-G de 6,31 pg/ml.

Estas diferencias en la concentración de la proteína HLA-G soluble pueden deberse a distintas variaciones a nivel genético de HLA-G determinadas en éste estudio, como la presencia del polimorfismo de 14 bp en el exón 8, y la presencia del alelo nulo 01:05N. Por lo tanto procedimos a realizar una comparación de éstas variaciones genéticas de HLA-G, y la concentración y detección de sHLA-G por la técnica de ELISA.

RESULTADO COMPARATIVO ELISA sHLA-G y HLA-G POLIMORFISMO 14 pb							
HLA-G POLIMORFISMO 14 pb			GRUPO				Total
			CONTROL SANO	No IgE Mediado	IgE MEDIADO	CONTROL OTROS PROCESOS ALERGICOS	
AMPLIFICACIÓN POSITIVA	RESULTADO	DETECTABLE	7	8	8	25	48
	ELISA sHLA-G	NO DETECTABLE	3	17	9	13	42
	Total			10	25	17	38
AMPLIFICACIÓN NEGATIVA	RESULTADO	DETECTABLE	31	2	0	0	33
	ELISA sHLA-G	NO DETECTABLE	16	1	3	7	27
	Total			47	3	3	7
AMPLIFICACIÓN POSITIVA DOBLE POLIMORFISMO	RESULTADO	NO DETECTABLE		7			7
	Total			7			7
Total	RESULTADO	DETECTABLE	38	10	8	25	81
	ELISA sHLA-G	NO DETECTABLE	19	25	12	20	76
	Total			57	35	20	45

**Tabla 12.** Recuento del número de muestras positivas y negativas para el polimorfismo 14 bp de HLA-G en comparación con la detección de la proteína soluble HLA-G (sHLA-G) en saliva de controles y pacientes de los diferentes grupos de estudio.

RESULTADO COMPARATIVO ELISA sHLA-Gy HLA-G 01:05N (ALELO NULO)							
HLA-G 01:05N (ALELO NULO) AMPLIFICACIÓN PCR			GRUPO				Total
			CONTROL SANO	No IgE Mediado	IgE MEDIADO	CONTROL OTROS PROCESOS ALERGICOS	
AMPLIFICACIÓN POSITIVA	ELISA sHLA-G	DETECTABLE	1	0	0	0	1
		NO DETECTABLE	2	10	3	7	22
	Total			3	10	3	7
AMPLIFICACIÓN NEGATIVA	ELISA sHLA-G	DETECTABLE	37	10	8	25	80
		NO DETECTABLE	17	15	9	13	54
	Total			54	25	17	38
Total	ELISA sHLA-G	DETECTABLE	38	10	8	25	81
		NO DETECTABLE	19	25	12	20	76
	Total			57	35	20	45

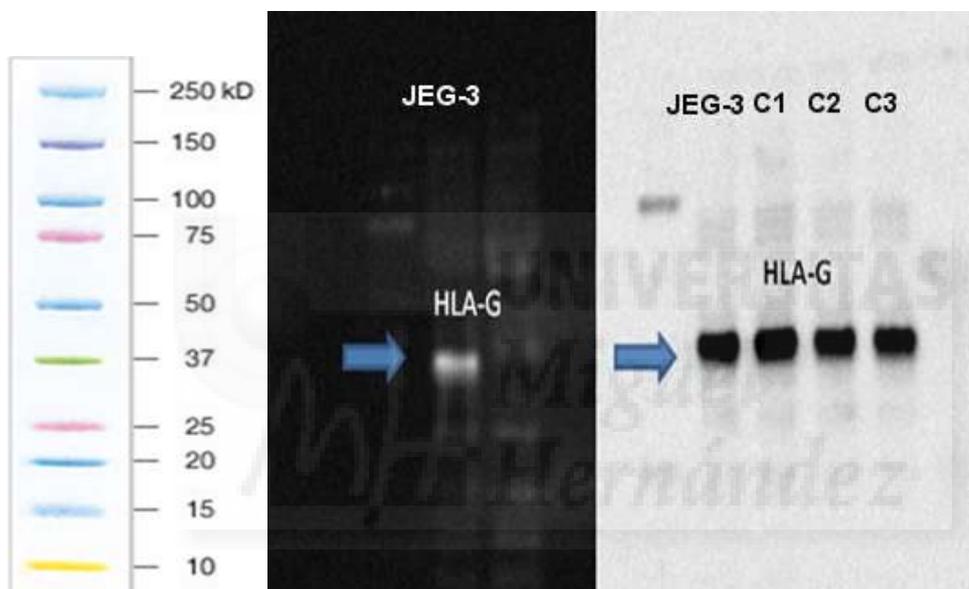
**Tabla 13.** Recuento del número de muestras positivas y negativas para el alelo nulo 01:05N de HLA-G con respecto a la detección de la proteína soluble HLA-G (sHLA-G) en los distintos grupos de estudio.

En las tablas 14 y 15 podemos observar la comparación del patrón genético de HLA-G de los pacientes con el perfil de detección proteica de sHLA-G, en las muestras de los distintos grupos de estudio.

Los pacientes donde se detecta más sHLA-G es en el grupo Control en comparación con el grupo No IgE Mediado donde se detecta una menor concentración de sHLA-G.

#### 4. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-G POR LA TÉCNICA WESTERN BLOT EN PACIENTES CON ALERGIA ALIMENTARIA Y CONTROLES SANOS.

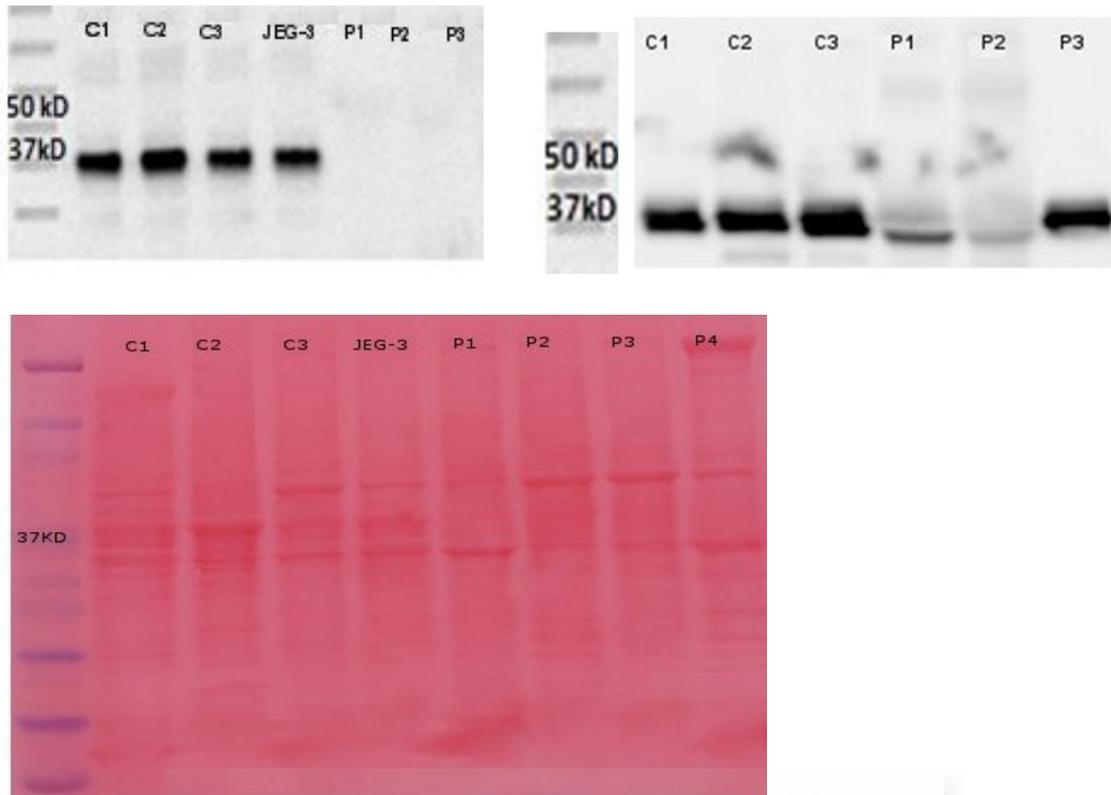
Con el objeto de realizar la determinación de la proteína HLA-G realizamos la detección de dicha proteína utilizando la técnica Western Blot. La proteína HLA-G tiene un peso de 37 kD. Realizamos la determinación de esta proteína a partir de muestras de saliva de los pacientes y controles de los diferentes grupos de estudio.



**Figura 18.** Determinación de la proteína HLA-G de 37 kD por la técnica Western Blot.

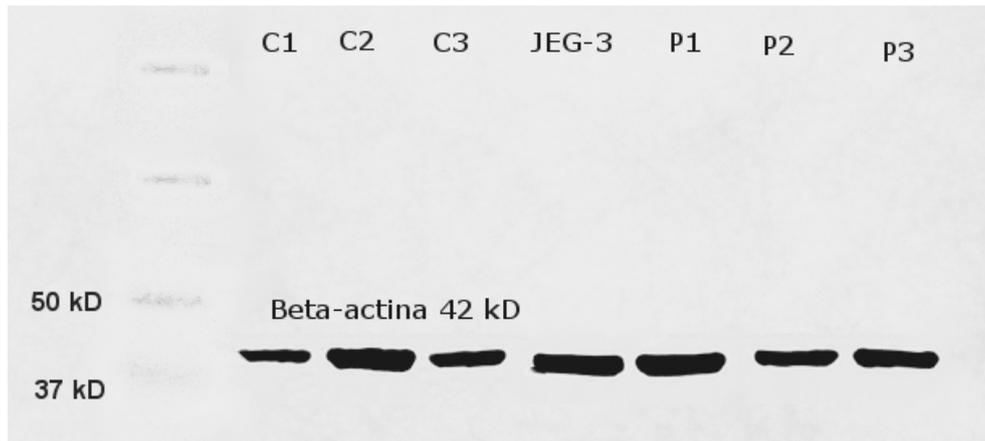
IgE No Mediado

IgE Mediado

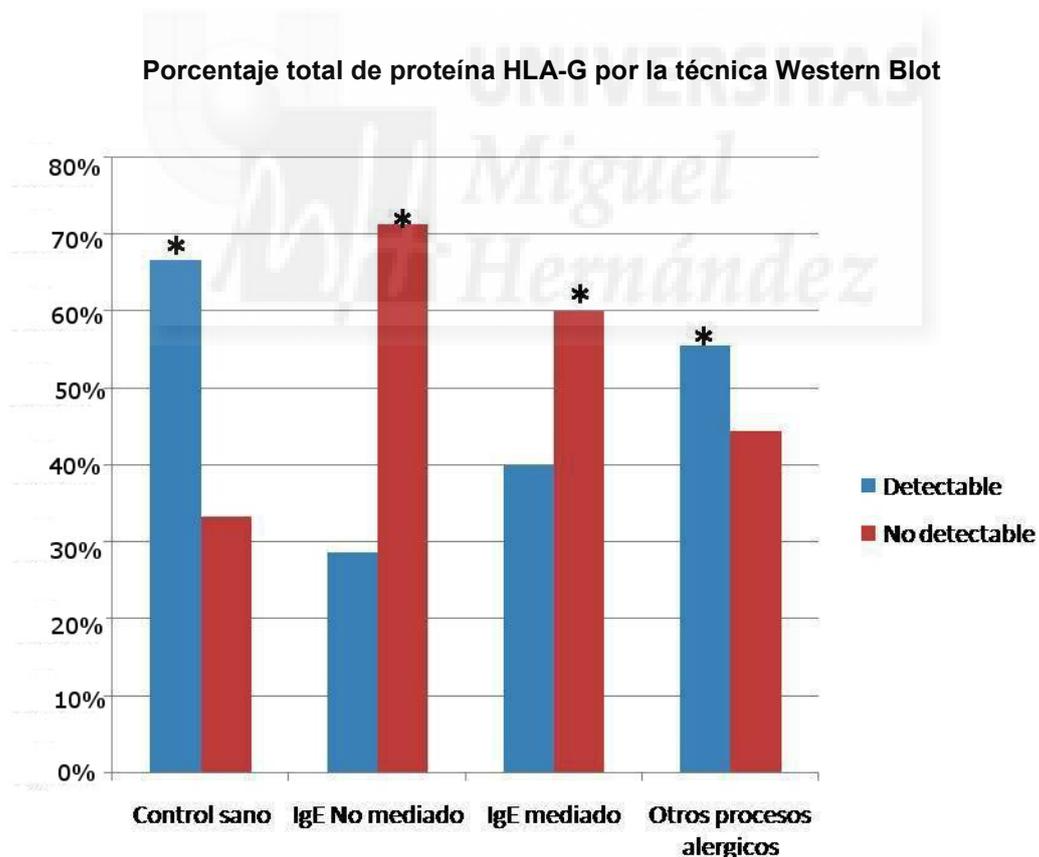


**Figura 19.** Determinación de la proteína HLA-G de 37Kd por la técnica Western Blot en muestras de pacientes con alergia alimentaria y sus controles. Se empleó como anticuerpo primario MEM-G/1 a dilución 1:500 y un anticuerpo secundario anti-mouse HRP en una dilución 1:1000 en tampón PBS-T con 5% de leche desnatada. C1-C3: Controles sanos, P1-P3: pacientes con alergia No IgE Mediada.

Las muestras identificadas como C1, C2, C3 son muestras de controles sanos, en los cuales se espera encontrar la glicoproteína de 37 KD correspondiente a HLA-G. La muestra identificada como JEG-3 corresponde a la proteína que se detecta en el sobrenadante de una línea celular que expresa de forma constitutiva HLA-G, y que empleamos como control positivo del ensayo. Las muestras identificadas como P1, P2, P3, son muestras que corresponden a pacientes con alergia alimentaria No IgE Mediada y en los cuales no se detecta HLA-G; en los IgE Mediados se detecta la proteína HLA-G.



**Figura 20.** Determinación de la proteína  $\beta$ -Actina por Western Blot en muestras de saliva de pacientes con alergia alimentaria y sus controles. En ésta figura podemos observar la cantidad de proteína en cada carril de las muestras y por lo tanto evidenciar la presencia de proteínas totales en cada uno de los carriles de las muestras, por lo tanto ésta proteína puede establecerse como control en cada una de nuestras muestras.



**Figura 21.** Porcentaje total de muestras donde se detecta la proteína HLA-G por la técnica Western Blot, en cada uno de los grupos de estudio. P valor <0,001.

En el grupo de Controles sanos se detectó HLA-G en el 68,4% de las muestras analizadas, mientras que en el grupo de No IgE Mediado sólo se detectó en un 28,6%. En el grupo de IgE Mediado se observó presencia de proteína HLA-G en un 40% de las muestras y en el grupo de Otros Procesos Alérgicos en un 52,6%. El nivel de proteína menor se observa, por tanto, en los pacientes con alergias no mediadas por IgE en comparación con los IgE mediados.

## **5. MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON EDAD PEDIÁTRICA**

La composición de la microbiota intestinal se ha descrito como un factor importante en el tipo de respuesta que se da a antígenos alimentarios. Dado que la detección de la proteína HLA-G fue significativamente menor en los pacientes con respuestas alérgicas no mediadas por IgE, nos propusimos evaluar el perfil de la microbiota intestinal en muestras de materia fecal en estos pacientes y sus respectivos controles por edad, para después correlacionar dichos datos con los obtenidos para HLA-G. Se recogieron muestras fecales a los pacientes del grupo, en este caso la mayoría de edad pediátrica, y se realizó un cuestionario con características clínicas y de hábitos de alimentación de los distintos pacientes y controles (ANEXO III, IV).

Las principales características clínicas de los grupos se muestran en la Tabla 16. El tipo de nacimiento se considera un factor que influye en la composición de la microbiota y, por lo tanto, se ha considerado como un determinante en la composición posterior de la microbiota intestinal del individuo.

Se compararon las características demográficas y clínicas de los pacientes y controles del estudio, y se clasificaron según el tipo de nacimiento. Se encontró un mayor número de nacidos por cesárea (62,5%) en pacientes en comparación con los controles (25%). También observamos un porcentaje menor de pacientes que fueron alimentados exclusivamente con leche materna (12,5%), en comparación con el grupo control (45,45%). La diferencia fue estadísticamente significativa entre los controles sanos y el grupo IgE No Mediado.

	Pacientes (n=17)	%	Controles (n=12)	%	p valor*
<b>Género</b>					
Femenino	10	58.82	8	66.67	0.67
Masculino	7	41.18	4	33.33	
<b>Tipo de Nacimiento</b>					
Cesárea	10	62.5	3	25.00	0.05
Vaginal	6	37.5	9	75.00	
<b>Tipo de Alimentación</b>					
Leche Materna	2	12.50	5	45.45	0.06
Fórmula	1	6.25	0	0.00	0.40
Mixta	13	81.25	6	54.55	0.14
<b>Parámetros de Escala Bristol para evaluar hábitos Intestinales</b>					
Normal	11	73.33	8	66.67	0.71
Estreñimiento y Diarrea	4	26.67	4	33.33	
<b>Ingesta materna de antibióticos durante el embarazo o la lactancia</b>	5	31.25	2	16.67	0.38
<b>Ingesta probiótica materna durante el embarazo o la lactancia</b>	10	71.43	8	66.67	0.79

**Tabla 14.** Características clínicas y demográficas de los pacientes del grupo IgE No Mediado y los controles. \*p valor (Chi-cuadrado).

### 5.1 Ingesta de alimentos

Las ingestas diarias medias en términos de energía, proteínas, grasas y carbohidratos en pacientes y controles se muestran en la Tabla 17. Se observó un consumo ligeramente inferior de energía, proteínas y carbohidratos en los pacientes; sin embargo, ninguna de las diferencias en la ingesta de energía o macronutrientes fue estadísticamente significativa y, por lo tanto, no se consideraron en los análisis posteriores.

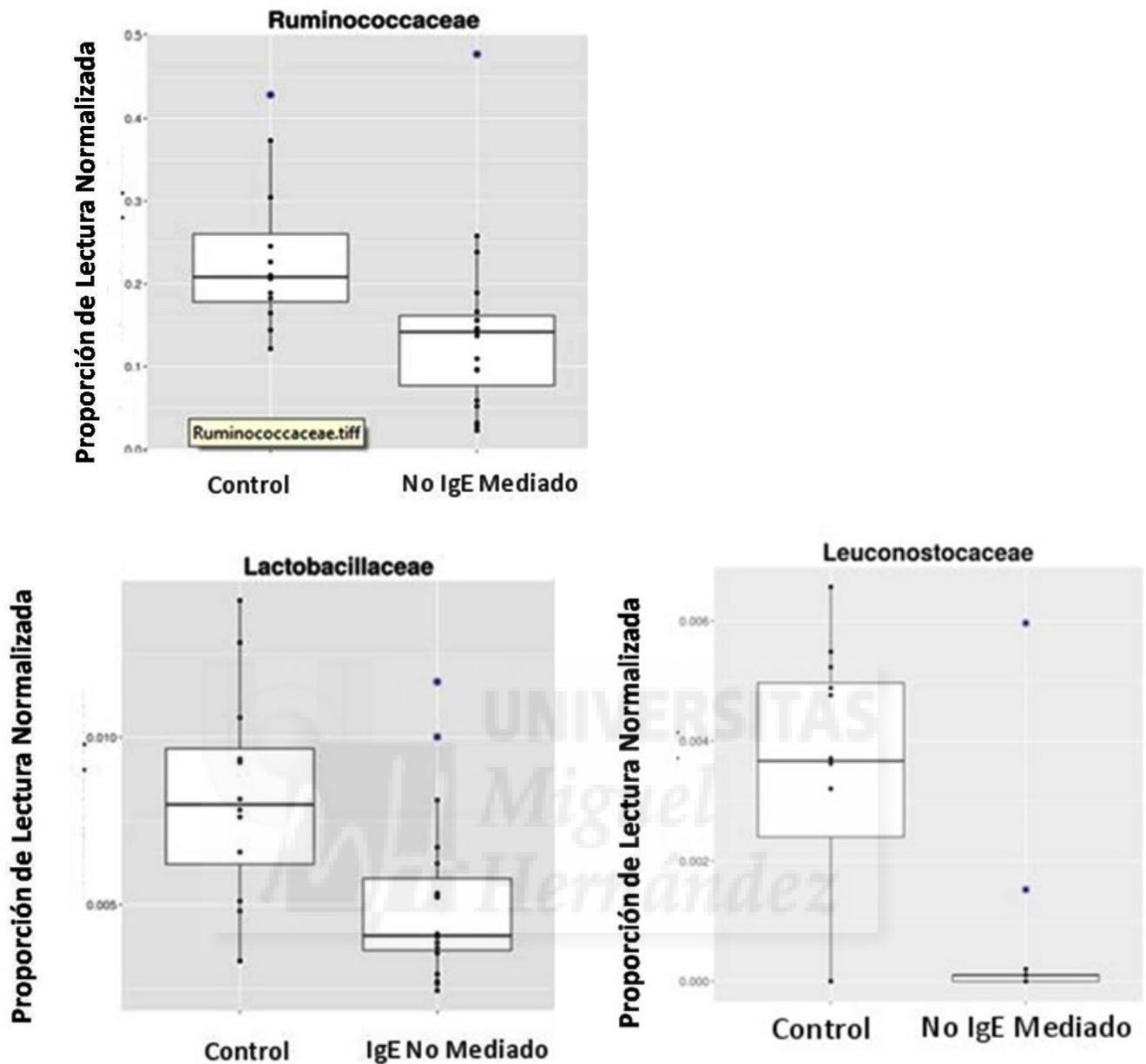
Nutrientes	Pacientes (n=17)		Controles (n=11)		p valor
	Media	DS	Media	DS	
Energía (kcal)	2017.47	487.19	2211	373.6	0.25
Proteína (g)	80.05	21.37	92.31	26.35	0.21
Proteína (%)	15.96		14.9		
Carbohidratos (g)	227	59.24	252.73	62.19	0.29
Carbohidratos (%)	47.16		47.54		
Grasa (g)	83.71	26.92	88.03	16.13	0.6
Grasa (%)	36.86		35.94		

**Tabla 15.** Medida y desviación estándar (DS) de energía, proteínas, carbohidratos y consumo de grasa en pacientes y controles incluidos en el presente estudio.

## 5.2 Evaluación de la composición de la microbiota intestinal en Pacientes en Edad Pediátrica

Se analizó la diversidad microbiana y la composición de microbiota en las muestras fecales de 17 pacientes en edad pediátrica y 12 controles. Se observó que la comunidad microbiana intestinal de los pacientes no difiere drásticamente de la de los controles en términos uniformidad y número de especies bacterianas (figura 21). Se realizó una secuenciación de las muestras de materia fecal y posterior análisis de diversidad beta, basado en la abundancia y relaciones filogenéticas entre las 623 OTU (*Operational Taxonomic Unit*). Este enfoque fue útil para evaluar el impacto de diferentes variables sobre la estructura de la comunidad microbiana además del estado de la enfermedad.

Se analizó el perfil de la microbiota intestinal de acuerdo a las diferentes variables compiladas para todos los sujetos, tales como dieta, sexo, tipo de parto, tipo de leche de alimentación, y estado de salud. Además, para el análisis se tomaron en cuenta resultados nulos indicando que la dieta, el género, el modo de administración y el tipo de alimentación en cuanto a la leche ingerida, no influyen significativamente en la estructura de la comunidad microbiana observada tanto para pacientes como para controles. Con el fin de identificar con precisión las especies alteradas en la disbiosis asociada a las alergias alimentarias, se evaluó la distribución de las especies microbianas presentes en las heces de controles y pacientes mediante la realización de análisis de taxonomía de alta calidad de ADN como se observa en la figura 21.



**Figura 22.** Diversidad microbiana en muestras de controles y pacientes con alergia alimentaria IgE No Mediada en edad pediátrica.

La distribución taxonómica a nivel de *Phylum* no obtuvo diferencias en la composición de microbiota entre individuos controles y pacientes con alergia alimentaria. Un análisis de OTU para determinar las especies probables presentes diferencialmente en la microbiota de pacientes y controles condujo a identificar una lista de especies diferencialmente asociadas con el estado de salud o de alergia alimentaria de acuerdo a una puntuación LDA (análisis discriminante lineal) mayor de 3, los resultados podemos observarlos en la tabla 18.

A) OTU	B) Asociación	C) Blast(id%)	D) LDA	E) p- valor
OTU2	Control	<i>Faecalibacteriumprausnitzii</i> (98)	4.57	0.0106
OTU241	Control	<i>Bacteroidesovatus</i> (99)	4.08	0.0149
OTU34	FPA	<i>Eubacteriumhallii</i> (98)	4.03	0.0316
OTU50	Control	<i>Parabacteroides distasonis</i> (100)	3.52	0.0316
OTU46	FPA	<i>Spiroplasma sabaudiense</i> (84)	3.49	0.0063
OTU42	FPA	<i>Ruminococcus albus</i> (93)	3.47	0.0002
OTU37	Control	<i>Intestinomonas butyric producens</i> (95)	3.38	0.0425
OTU540	Control	<i>Bacteroides caccae</i> (99)	3.35	0.0285
OTU23	Control	<i>Enterococcus hirae</i> (100)	3.33	0.0231
OTU26	Control	<i>Parabacteroides merdae</i> (100)	3.25	0.0257
OTU47	Control	<i>Lactobacillus hominis</i> (100)	3.22	0.0090
OTU59	Control	<i>Weisella confusa</i> (100)	3.19	0.0073
OTU68	Control	<i>Ruminococcus champanellensis</i> (96)	3.18	0.0015
OTU83	FPA	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> (100)	3.13	0.0339
OTU73	FPA	<i>Lactococcus taiwanensis</i> (100)	3.00	0.0056
OTU105	FPA	<i>Blautia producta</i> (96)	3.00	0.0316

**Tabla 16.** Lista de las OTU asociadas al estado de salud.

A) OTU (especies) que exhiben una proporción más alta en controles o en pacientes con alergias alimentarias.

B) Asignación de taxonomía basada en la mejor compatibilidad frente a la base de datos del gen 16S referencia del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) teniendo en cuenta la alineación completa de la OTU.

C) La asignación taxonómica basada en una identidad de secuencia inferior al 97% podría corresponder a una especie diferente pero estrechamente relacionada con la descrita.

D) LDA,

E) p valor según LEfSe analysis.

La lista anterior de probables especies microbianas asociadas con la salud o el estado de la enfermedad coinciden con los datos obtenidos a partir de comparaciones a nivel familiar. Así mismo, varias especies pertenecientes a las *Ruminococcaceae* (*F. prautsnitzii*, *R. champanellensis*, *I. butyric producens*), *Lactobacillaceae hominis*, y *Leuconostocaceae* (*W. confusa*) se encontraron en mayor proporción en los individuos control, mientras que especies como *Eubacterium hallii* y *Blautia spp*, especies pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*, fueron más abundantes en pacientes con alergia alimentaria no mediada por IgE. Además, algunas especies de *Bacteroidaceae* (*B.ovatus*, *B.caccae*) y *Porphyromonadaceae* (*P.distasonia*, *P. merdae*) también están asociadas con buen estado de salud.

### Limitaciones del Estudio

En el grupo No IgE Mediado los pacientes se eligieron de un grupo de niños seleccionados que presentaban enterocolitis por pescado.

El anticuerpo primario utilizado como reactivo de captura en nuestra investigación no permite distinguir entre las diferencias isoformas y dado que no se realizó un análisis específico de PCR de transcripción inversa en el ARN de las células de la mucosa oral, se desconoce la naturaleza precisa de las moléculas de HLA-G detectadas. Se utilizó el anticuerpo MEM-G/1 y MEM-G/4, los cuales reaccionan con la cadena pesada de HLA-G desnaturalizada. El epítipo reconocido sólo está presente en las moléculas HLA-G y G5, por lo tanto es posible que éstas sean las isoformas que estaremos observando en el Western Blot.



## **V. DISCUSIÓN**





## DISCUSIÓN

### 1. PERFIL CLÍNICO DE LOS PACIENTES

La alergia alimentaria es una respuesta de hipersensibilidad a alimentos que inicialmente son inofensivos, y que implican al sistema inmunitario en su desarrollo. Identifica de forma incorrecta ciertos componentes de los alimentos como nocivos<sup>87</sup>. La reacción puede ocurrir en minutos o unas pocas horas. La gravedad de una reacción alérgica puede variar en intensidad y grado entre individuos.

Dichas manifestaciones pueden ser orales (síndrome alergia oral, o SAO, que es una reacción alérgica que generalmente solo afecta a la boca y la garganta) cutáneas como la urticaria, o sistémicas. En el caso de las reacciones de tipo retardado cursan con síntomas gastrointestinales aislados y las entidades más frecuentemente descritas son (enteropatía, enterocolitis y proctocolitis alérgica) que provocan síntomas gastrointestinales variados, los cuales son trastornos clínicos en general transitorios, más frecuentes en el lactante, por la inmadurez de los componentes de su barrera intestinal y de su sistema inmunológico, que hace que el organismo del niño se encuentre más desprotegido frente a los alérgenos alimentarios<sup>88</sup>.

En nuestro grupo de pacientes se evidenció una diversidad de edades desde un niño de tres años hasta un adulto de 70 años, y en el grupo donde se observaron principalmente pacientes con edad pediátrica fue en el grupo IgE No Mediado. Debido a que la mayoría de éstos presentaban un cuadro clínico de FPIES los cuales fueron nuestro principal objeto de estudio para determinación del perfil de microbiota intestinal<sup>88, 89, 90</sup>.

En cuanto a la distribución por sexos, se encontraron en mayor proporción el porcentaje del género femenino en los grupos control sano, IgE No mediado y otros procesos alérgicos, a diferencia del grupo IgE

mediado, donde fue similar el porcentaje tanto del género femenino como masculino<sup>91</sup>.

Los resultados obtenidos en la sintomatología clínica referida por los pacientes varían según el grupo de estudio<sup>91</sup>. Se realizaron pruebas cutáneas a cada paciente de los diferentes grupos de estudio reflejándose que los alérgenos a los que estaban sensibilizados los distintos pacientes del grupo de estudio fueron el pescado como alérgeno principal en el grupo No IgE Mediado en comparación con los otros grupos de estudio. En el caso del grupo IgE Mediado se disponía de un mayor número de casos positivos al alérgeno LTP, y en el caso del grupo “Otros procesos alérgicos” se encontró un mayor número de casos positivos a los alérgenos ácaros y polen respectivamente<sup>91</sup>. Las pruebas cutáneas pueden ser una gran ayuda para, su simplicidad y rapidez la hacen una herramienta rápida y útil para el diagnóstico de una alergia alimentaria<sup>92</sup>.

El síntoma más destacado observado en nuestro grupo de pacientes fue el vómito, el cual se encontró en pacientes del grupo de No IgE Mediado, con diagnóstico de enteropatía por alimentos (FPIES)<sup>93,94</sup>. Ésta enfermedad es representativa en el grupo de estudio No IgE Mediado, en el cual se han encontrado alteraciones en el perfil genético y proteico de HLA-G y con repercusión en la microbiota intestinal, así como en un gravedad en los síntomas de la enfermedad.

## **2. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DELECIÓN/ INSERCIÓN DE 14 PARES DE BASES EN EL EXÓN 8 DE HLA-G.**

En el presente estudio se realizó el análisis del polimorfismo de 14 bp del exón 8 y el alelo nulo 01:05N, en las muestras de saliva de los individuos que se incluyeron en el estudio. Estas anomalías genéticas posiblemente podrían

causar una alteración en la proteína soluble HLA-G y en la concentración de ésta<sup>95,96</sup>. Podríamos establecer que al tener genéticamente alguna alteración como el polimorfismo de 14 bp y el alelo nulo 01:05N de HLA-G se esperaría encontrar una disminución en la concentración y una no detección de dicha proteína en algunas de las muestras analizadas y, por lo tanto, causando alteraciones en el mecanismo de tolerancia a nivel inmunológico frente a los alérgenos de origen alimentario. Por lo tanto consideramos que una alteración en la proteína soluble sHLA-G o la no detección de ésta pueda ser esencial en la interpretación del tipo de respuesta inmunitaria de los pacientes con alergia alimentaria.

Observamos un perfil polimórfico donde se puede ver la amplificación del “Doble Polimorfismo” de 210 y 226 pares de bases. Estos pacientes fueron los que clínicamente tenían un peor pronóstico, y que fueron ingresados en UCI, presentaban una mayor gravedad en los síntomas y cuadro clínico, por lo tanto consideramos que HLA-G podría tenerse en cuenta como un indicador de un mal pronóstico en la enfermedad. La asociación de éste mal pronóstico se evidencia en el grupo de estudio No IgE Mediado, ya que en éste grupo en particular se ha encontrado una posible asociación con la amplificación positiva para doble polimorfismo y en algunos casos una amplificación en conjunto con el alelo nulo 01:05N, además hemos encontrado un polimorfismo 14 bp ins/del el cual se ha encontrado asociado con una susceptibilidad genética lo cual puede causar una grave alteración o la no detección de la proteína soluble sHLA-G y por lo tanto no llevar a cabo su función tolerogénica en la patología alérgica alimentaria<sup>102</sup>. Las moléculas de sHLA-G podrían desempeñar un papel importante en los mecanismos de tolerancia inmunitaria frente a los alérgenos porque, al igual que sus contrapartes ligadas a la membrana de superficie, poseen propiedades inmunosupresoras. De hecho, las moléculas de sHLA-G inhiben la proliferación de células T inducida por células dendríticas alogénicas y, en analogía a las moléculas sHLA-A, -B y -C, inducen la apoptosis de las células T y NK CD8 + e inhiben la actividad citotóxica de las células T CD8 por la interacción Fas/sFasL<sup>103</sup>. Las características inmunorreguladoras de HLA-G han llevado a varios estudios encaminados a

evaluar la expresión de sHLA-G en diversas muestras de pacientes afectados por una diversidad de trastornos del sistema inmune, por lo tanto es importante indicar que la disminución o la ausencia de ésta proteína soluble puede ser posiblemente considerada como un biomarcador de mal pronóstico en la alergia alimentaria.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE SHLA-G POR LA TÉCNICA ELISA Y LA DETECCIÓN POR WESTERN BLOT.**

Las determinaciones de la proteína a nivel soluble (sHLA-G) se realizaron a partir de muestras de saliva de los pacientes con alergias alimentarias y controles sanos. El estudio y la determinación de ésta proteína a nivel soluble sHLA-G, fue crucial para establecer con claridad la detección o no detección de ésta proteína por Western Blot, ya que se pudo establecer que en algunos pacientes en los cuales no se observó la detección de ésta proteína, se logró determinar una baja concentración de pg/ml de ésta proteína por ELISA.

En el presente estudio se demuestra que las moléculas de sHLA-G encontradas en las muestras de saliva de los pacientes con alergias alimentaria y en los controles sanos, demuestran que la presencia de ésta fundamental en la tolerancia oral frente a los alérgenos a los cuales nos enfrentamos en el consumo diario de los alimentos<sup>103</sup>.

La detección de antígeno sHLA-G en las muestras de saliva podría ser considerada como un marcador fiable de la expresión génica de proteínas y por lo tanto un sistema de defensa de nuestra mucosa oral. En este supuesto hemos demostrado que la modulación de las moléculas de HLA-G es un requisito fundamental para el desarrollo de la tolerancia alimentaria. De hecho, el perfil genético está directamente ligado a la expresión y concentración de la proteína soluble sHLA-G, es por esto que en el grupo donde se observó mayor disminución de concentración de proteína en pg/ml y en una baja detección de

ésta por Western Blot fue en el No IgE Mediado, y por lo tanto es posible que la sintomatología y las alteraciones a nivel inmunológicos sean mucho mayor que con respecto a los demás grupos de estudio ya que presentan una interrupción en la tolerancia frente a diversos alérgenos y presentarían una disminución en la modulación frente a la respuesta de las NK y los LT CD8 citotóxicos<sup>103,104</sup>.

También se ha evidenciado la posible asociación entre el grupo No IgE Mediado y el polimorfismo de 14 bp con una baja detección y concentración en los niveles de sHLA-G. Además de otra posible asociación del alelo nulo 01:05N con la no detección ni indicios de concentración de sHLA-G en la saliva de estos pacientes, mientras que en los controles sanos se observaron detección en los niveles y la concentración de de sHLA-G en saliva y se evidenció una posible asociación entre la no amplificación tanto para el polimorfismo de 14 bp y el alelo nulo 01:05N; lo que demuestra que al no presentar ninguna alteración a nivel genético, no se esperaría encontrar ningún defecto en ARNm para la proteína HLA-G<sup>104, 106</sup>.

Estos resultados obtenidos por ELISA y Western Blot validan la hipótesis de un papel inmunomodulador para tales estructuras en la interfaz de la tolerancia oral frente a los alérgenos alimentarios. Nuestros datos confirman que las moléculas de HLA-G tienen un papel obligatorio, pero no suficiente, sin embargo, se necesitan más investigaciones dirigidas a la identificación del papel biológico de HLA-G específico<sup>106</sup>.

Las moléculas de sHLA-G detectadas en sobrenadantes de cultivo JEG-3 han constituido en nuestro caso el control positivo para las técnicas ELISA y Western Blot, ya que expresa constitutivamente HLA-G soluble. Tanto las líneas celulares EVT (citotrofoblasto extravelloso) de corta vida como las células JEG-3 se utilizan para estudiar los mecanismos moleculares responsables de invasividad. Sin embargo, a diferencia de las células cancerosas, en la línea JEG-3 su proliferación y migración *in situ* son estrictamente controlados por factor de crecimiento transformante derivado de decidua (TGF)-beta. Estas células similares a trofoblastos epiteliales se utilizan también en la identificación de los cambios genéticos subyacentes<sup>108</sup>.

Determinamos que como en el caso de la detección de ésta proteína por la técnica ELISA, podemos definir que en el grupo No IgE Mediado se observa una baja detección de la proteína HLA-G en correlación con los demás grupos de estudio como los IgE mediados donde se observa un aumento de la detección y de la concentración de dicha proteína. Es posible las isoformas que estemos observando en el Western Blot sean moléculas HLA-G1 y G5 por el origen de los anticuerpos usados para su detección.

La isoforma HLA-G1 está compuesta de cadenas pesadas asociadas con  $\beta$ 2-microglobulina, por lo tanto podemos intuir que el anticuerpo de captura utilizado empleado en nuestro estudio reacciona con un determinante del marco de expresión en la cadena pesada de HLA clase I asociada con  $\beta$ 2-microglobulina y, como consecuencia, identifica solamente las estructuras de sHLA-G1<sup>106</sup>. Se podría esperar que la ausencia de las moléculas de sHLA-G1 represente un marcador de un defecto genético para producir isoformas funcionales. Esta deficiencia no permite la generación de la proteína y por tanto la potencial inducción del estado de tolerancia fisiológica, lo cual es reflejado principalmente en los pacientes del grupo No IgE mediado y no en los IgE mediados.

#### **4. MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON EDAD PEDIÁTRICA**

##### **Microbiota en enfermedad**

De acuerdo a los síntomas presentados por los pacientes del grupo No IgE mediado decidimos estudiar la microbiota intestinal utilizando materia fecal de éstos pacientes que se encuentran predominantemente en edad pediátrica. De esta manera podríamos establecer otro factor que nos ayude a esclarecer la fisiopatología y el perfil inmunológico de la enfermedad que padecen los pacientes de éste grupo, que es la enteropatía FPIES<sup>154</sup>.

Se realizó una secuenciación de las muestras de materia fecal de 17 pacientes y 12 controles en el cual se evaluaron por previo cuestionario factores como hábitos alimenticios, hábitos digestivos, tipo de nacimiento, consumo de antibióticos y probióticos. Se observó un consumo ligeramente inferior de proteínas y carbohidratos en éstos pacientes que pertenecen al grupo No IgE Mediado; Sin embargo, ninguna de las diferencias en la ingesta de energía o macronutrientes fue significativamente diferente a nivel estadístico.

Se analizó la diversidad microbiana y la composición de microbiota en las muestras fecales. Se encontró que los valores en la comunidad microbiana intestinal de los individuos con alergia No IgE Mediada, difieren de los encontrados controles en términos de número de especies bacterianas y la uniformidad.

Se realizó una secuenciación de las muestras de materia fecal y un análisis de diversidad. Se analizó el perfil de la microbiota intestinal de acuerdo a las diferentes variables compiladas para todos los sujetos, tales como dieta, sexo, parto, tipo de leche de alimentación, y estado de salud. Además, para el análisis se tomaron en cuenta resultados nulos indicando que la dieta, el género, el modo de administración y el tipo de alimentación de leche no influyen significativamente en la estructura de la comunidad microbiana observada tanto para pacientes del grupo IgE No Mediado y los controles, por lo tanto, los principales cambios observados a nivel de la comunidad microbiana están principalmente asociados con la condición de la enfermedad. Con el fin de identificar con precisión las especies alteradas en la disbiosis asociada a las alergias alimentarias No IgE mediada, se evaluó la distribución de las especies microbianas presentes en las heces de controles y pacientes mediante la realización de análisis de taxonomía de alta calidad de ADN. La distribución taxonómica a nivel de *phylum* no obtuvo diferencias en la composición de microbiota entre individuos control y pacientes con alergia alimentaria No IgE Mediada<sup>155</sup>.

La lista anterior de probables especies microbianas asociadas con la salud o el estado de la enfermedad coinciden con los datos obtenidos a partir de comparaciones a nivel familiar. Así mismo, varias especies pertenecientes a las *Ruminococcaceae* (*F. prausnitzii*, *R. champanellensis*, *I butyric producens*), *LactobacillaceaeHominis*, y *Leuconostocaceae* (*W. confusa*) familias que se encontraron en mayor proporción en los individuos control, las cuales son bacterias fermentadoras lácticas y productoras de butirato. El butirato es un subproducto de la digestión de la fibra dietética por parte de los microorganismos intestinales, y se piensa que posiblemente actúa como un interruptor epigenético que estimula el sistema inmune mediante la inducción de la producción de células T reguladoras en el intestino<sup>155</sup>. Esto se consigue a través de cambios epigenéticos que regulan la expresión de los genes responsables de la diferenciación de las células T vírgenes en células Treg<sup>155</sup>; a diferencia de la familia *Ruminococcaceae*, que pertenecen a la clase *Clostridia*, las cuales son anaerobias gram positivas, que en algunos casos pueden llegar a ser productores de esporas.

En el caso de las muestras de los pacientes con alergia alimentaria No IgE Mediada con FPIES se encontraron en mayor proporción especies como *Lachnospiraceae*, *Eubacterium hallii* y *Blautia spp*; las cuales corresponden a la clase *Clostridia* y también, se encontraron algunas especies de bacterias fermentadoras de ácido láctico como *Bacteroidaceae* (*B. ovatus*, *B. caccae*) y *Porphyromonadaceae* (*P. distasonia*, *P. merdae*) las cuales probablemente podrían contrarrestar el efecto negativo de los microorganismos anaerobios como los de la familia *Clostridia* en el intestino.

Por lo tanto cabe destacar que los pacientes con FPIES tienen un perfil de microbiota intestinal muy distinto al de los controles sanos ya que en éste tipo de paciente predominan las bacterias anaerobias que desplazarían probablemente a las bacterias fermentadores de ácido láctico y productoras de butirato que proporcionan bienestar y ácidos grasos a la mucosa intestinal<sup>155</sup>. A diferencia de la microbiota intestinal que predomina en los controles sanos, en los cuales predominan las bacterias anaerobias aerotolerantes, ya que la

mayoría de sus miembros convierten la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico, dando lugar a la fermentación láctica.

La membrana mucosa del tracto gastrointestinal está expuesta constantemente a una gran cantidad de alimentos y componentes. El sistema inmune digestivo sano mantiene un equilibrio entre la defensa inmunológica de las membranas mucosas y la tolerancia sistémica y en el caso de alergia alimentaria este equilibrio se altera. El desarrollo de la alergia alimentaria es causado por diversos factores de riesgo como la barrera intestinal inmadura y los linfocitos T (Th2) que están presentes en la primera infancia. La colonización de las bacterias en la membrana de la mucosa del tracto digestivo comienza después del nacimiento, sin embargo, el desarrollo de microbiota es gradual, y depende inicialmente, de la composición de la flora intestinal de la madre y del ambiente, así como los posibles factores genéticos<sup>160-161</sup>.

Muchas especies son importantes en la descomposición de la materia vegetal, por lo tanto, los principales cambios observados a nivel de la comunidad microbiana parece estar principalmente asociado con la condición de la enfermedad, sin embargo se deben realizar más estudios para comprender el papel biológico potencial de la microbiota específica encontrada en pacientes con alergia a proteínas alimentarias con diagnóstico de alergia no IgE Mediada.

#### **4.1 RELACIÓN CON LOS SÍNTOMAS y RECURRENCIA DE LA ALERGIA ALIMENTARIA: HLA-G Y LA MICROBIOTA**

La relación de los síntomas y la recurrencia de la de la alergia alimentaria podría encontrarse relacionada con el HLA-G, ya que éste constituye la primera línea de defensa contra patógenos microbianos, aunque aún no hay mucho descrito. Una consecuencia directa de esta función fisiológica es una red muy compleja de interacciones inmunológicas que conducen a un fuerte control del equilibrio inmune de la mucosa<sup>158</sup>.

El HLA-G es una molécula de clase I de complejo principal de histocompatibilidad mayor (HLA) no clásica, altamente expresada por células citotrofoblásticas humanas. Estas células desempeñan un papel en la tolerancia inmune mediante la inmunomodulación en la protección celular frente a las células NK. Debido a la falta de regulación de la actividad del sistema inmune a nivel intestinal hecho que se refleja en la microbiota intestinal, y así como al papel inmunorregulador de HLA-G, hemos intentado correlacionar los resultados obtenidos en el perfil genético y proteicos de HLA-G y analizar su expresión y el impacto en la microbiota intestinal de los pacientes del grupo de estudio No IgE Mediado que padecen FPIES<sup>158</sup>.

Nuestro estudio muestra que la expresión diferencial de HLA-G ofrece una manera potencial de implicar un mecanismo diferente de regulación inmune. la presencia de HLA-G en la superficie de las células epiteliales intestinales en pacientes con alergia alimentaria, presta apoyo a la noción de que esta molécula puede servir como un regulador de la respuesta inmune de la mucosa a antígenos de origen indefinido<sup>160</sup>.

El HLA-G parece tener un papel protector, de hecho, se ha descrito como una molécula implicada en la tolerancia inmune que además de su importante función, sería esencial en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos alimentarios y en la microbiota intestinal<sup>162</sup>. Esta tolerancia puede estar asociada con la expresión selectiva de HLA-G a nivel de la mucosa intestinal.

Sin embargo, es probable que tal expresión sea insuficiente para proteger el intestino de la inflamación inducida por antígenos extraños que se eliminan sin éxito de la mucosa y de una respuesta inmunitaria aguda. En este sentido, después de que se detiene la agresión, el HLA-G puede participar en la supresión de la actividad de las citoquinas pro-inflamatorias y en el retorno de la respuesta inmunitaria a un estado basal<sup>162</sup>.

Dado que el HLA-G es altamente expresado en el organismo, incluso en las superficies epiteliales, y además se ha encontrado que esta molécula suprime la lisis de NK<sup>162</sup>; es probable que debido a esto el HLA-G podría posiblemente

proteger la mucosa intestinal de la lisis mediada por NK. Además se ha demostrado que el HLA-G regula el equilibrio de citoquinas Th1/Th2 de una manera que puede cambiar hacia la dominancia relativa Th2<sup>162</sup>. La IL-10 es una citocina reguladora que desempeña un papel crucial en el equilibrio del sistema inmune de la mucosa, evitando la inflamación aguda<sup>162-163</sup>. La IL-10 es importante para la respuesta inmunitaria intestinal y la tolerancia a los componentes de la flora intestinal. En su ausencia, los antígenos lumbinales estimulan una respuesta dependiente de Th1 que conduce a una inflamación intestinal. Los cambios en el microambiente pueden dar lugar a una disminución de IL-10 en la mucosa intestinal inflamada de los pacientes con FPIES, lo que sugiere que la modulación de la expresión de IL-10 por parte de HLA-G en esta enfermedad (FPIES) puede regular la respuesta inflamatoria e inmunitaria general.

El HLA-G puede mediar en el equilibrio entre la tolerancia y la capacidad de respuesta en la mucosa intestinal. Un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la expresión y secreción de HLA-G a nivel intestinal permitirá futuros enfoques terapéuticos dirigidos a prevenir el daño tisular y celular en éste tipo de enfermedades.



## **VI.CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

- Las características clínicas de los pacientes de los grupos de estudio fueron comparables y se evidenciaron diferencias en el polimorfismo de 14 bp ins/del, en los niveles y concentración de sHLA-G y en la microbiota intestinal principalmente entre el grupo No IgE mediado y el IgE mediado.
- La presencia del polimorfismo de 14 bp en solitario disminuye la expresión de la proteína soluble sHLA-G, y la determinación del alelo nulo 01:05N genera una ausencia completa de la proteína.
- Existe una correlación entre el perfil genético del polimorfismo de 14 bp del exón 8 y el alelo nulo 01:05N de HLA-G con la expresión de la proteína sHLA-G. En el grupo de controles sanos detectamos niveles normales y superiores de sHLA-G en comparación con los demás grupos de estudio.
- El nivel de proteína menor se observa en los pacientes con alergias No mediadas por IgE, en comparación con los demás grupos de estudio, lo cual nos sugiere que HLA-G puede considerarse como un biomarcador importante en el diagnóstico de alergias alimentarias No IgE Mediadas.
- En el caso del grupo de pacientes con alergia IgE Mediada y Otros Procesos Alérgicos observamos una disminución en la concentración de la proteína sHLA-G por la técnica de ELISA, pero nunca una alteración completa o ausencia como en el caso del grupo No IgE Mediados.
- Los resultados obtenidos en el análisis de la microbiota intestinal en los pacientes con edad pediátrica que presentaron un cuadro clínico de enteropatía FPIES (grupo de No IgE Mediado), sugieren que la presencia de bacterias de la clase *Clostridia* en comparación la familia *Lactobacillaceae* indiquen una alteración en la barrera protectora gastrointestinal, que junto a una baja o deficiente funcionalidad de la proteína sHLA-G determinen un cuadro clínico más grave para la

enfermedad. A diferencia de esto, en los controles sanos se evidenció una mayor población de la familia *Lactobacillaceae*, la cual confiere una protección eficaz a nivel gastrointestinal.



## VII. ANEXOS





## Hoja de información a los pacientes

### **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DETERMINACIÓN DE HLA-G EN ALERGIAS ALIMENTARIAS Y VALORACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES DE EDAD PEDIÁTRICA**

#### **Invitación a participar**

Apreciado/a Sr/a.

El Laboratorio de Inmunología de la Universidad Miguel Hernández y su Médico Alergólogo del Hospital General Universitario de Alicante le invita a participar en un estudio que lleva por título: **DETERMINACIÓN DE HLA-G EN ALERGIAS ALIMENTARIAS Y VALORACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES DE EDAD PEDIÁTRICA**

Este estudio lo llevará a cabo el/la investigador/a: **VICTOR SORIANO GOMIS/LAURA VELÁSQUEZ.**

Antes de confirmar su participación en el estudio de investigación, es importante que entienda en qué consiste. Por favor, lea detenidamente este documento y haga todas las preguntas que le puedan surgir.

#### **Objetivo del estudio**

Durante la realización de este trabajo, nos proponemos realizar una detección a nivel genético del gen y la proteína HLA-G ya que ésta proteína se ha asociado como un factor protector y tiene la capacidad para contrarrestar la inflamación presente en las patologías alérgicas y más concretamente en las alimentarias. Los niveles y la concentración de esta proteína HLA-G se medirá y determinará, por diferentes técnicas como Reacción en cadena de Polimerasa (PCR), Western Blot y ELISA (ensayos de inmunoensayo) en las distintas muestras de saliva disponibles y proporcionadas por el Servicio de Alergia del Hospital de Alicante); los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Inmunología, Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández, Campus San Juan de Alicante. Posteriormente se realizará una correlación de la información de los resultados obtenidos de las pruebas de laboratorio con los síntomas, recurrencia del proceso alérgico y la clínica presentada por los pacientes y sus controles y por lo tanto se podrá establecer una correlación con la patología alérgica.

#### **Objetivos Específicos:**

- Evaluar la respuesta al test prick con alérgenos en pacientes con síntomas sugestivos de alergias alimentarias y con pruebas cutáneas e IgE específica séricas negativas o positivas a pescado, frutas y verduras y establecer de ésta manera patologías alérgicas alimentarias IgE mediadas y no mediadas.
- Evaluar la prevalencia, características clínicas y severidad de la patología alérgica.

## **ANEXO I**

### **Síntomas**

- Dolor en el momento de la ingesta de algún alimento.
- Prurito
- Dificultad Respiratoria

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes entre 0-75 años con sintomatología de alergia alimentaria.
- Pruebas cutáneas habituales con resultado Positivo.
- sIgE sérica a alérgenos alimentarios Negativa o Positiva.
- Conocimiento de la hoja de información del estudio y que aporten su consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión:**

- Embarazo o lactancia.
- Enfermedades inmunológicas.
- Los pacientes serán instruidos para evitar: Corticoides sistémicos (3 meses).
- Antihistamínicos (2 semanas).

### **Variables:**

#### **Demográficas y clínicas:**

- Sexo
- Edad
- Años de evolución de la patología alérgica
- Edad de inicio del cuadro alérgico
- Antecedentes familiares de atopia
- Tabaquismo

#### **Biológicas:**

- Resultado del prick test a alérgenos alimentarios
- IgE total y sIgE sérica

### **Participación voluntaria**

Usted es completamente libre de elegir participar o no en el estudio. Su decisión no influirá en su atención médica/en su relación con la UPV/EHU.

### **Procedimientos del estudio**

El médico/investigador valorará si usted es un candidato adecuado para el estudio. Esta valoración se basa en factores clínicos, tales como la presentación de sintomatología frente a la ingesta a algún alimento, lo cual puede sugerir patología alérgica. Una vez usted haya otorgado su consentimiento y el médico/investigador haya verificado que cumple los criterios

para participar en el presente estudio, el médico le realizará una serie de preguntas relacionadas con el tema de este estudio. **ANEXO I**

Posteriormente, es posible que el médico/investigador decida tomarle una muestra de saliva para el estudio que su Médico le solicitará dentro de la práctica clínica habitual. Esta muestra de saliva será guardada para ser utilizada en un futuro con el único fin de efectuar los análisis correspondientes para un diagnóstico de la alergia y ésta será almacenada en el biobanco en el Laboratorio de Inmunología, Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, Campus San Juan de Alicante.

## **Riesgos e inconvenientes**

No existe ningún riesgo añadido en este estudio.

## **Posibles beneficios del estudio**

Del estudio se obtendrá información importante acerca del proceso de sensibilización o exposición a los diferentes alérgenos como frutas, pescado y proteína vegetal que en un futuro podrá ser de ayuda para la población, ya que se podría determinar el riesgo existente para un individuo de desarrollar procesos de mayor gravedad tras la sensibilización a dichos alérgenos.

## **Confidencialidad**

Si usted accede a colaborar en este estudio, debe saber que serán utilizados algunos datos sobre su salud, los cuales serán incorporados a una base de datos informatizada sin su nombre.

Sus documentos médicos podrán ser revisados por personas dependientes de las Autoridades Sanitarias, miembros de comités éticos independientes y otras personas designadas por ley para comprobar que el estudio se está llevando a cabo correctamente.

Sus datos serán objeto de un tratamiento disociado, vinculándose a un código, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable. **Todos sus datos se mantendrán estrictamente confidenciales.** Ningún dato personal que permita su identificación será accesible a ninguna persona que no sea su médico/investigador responsable, ni podrán ser divulgados por ningún medio, conservando en todo momento la confidencialidad (de acuerdo a los artículos 4 y 5 de la LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.) y la ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de carácter personal. El comité Ético de investigación clínica del Hospital General Universitario de Alicante ha aprobado éste proyecto de investigación.

## **Aspectos Éticos a Tener en Cuenta**

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, la Declaración de Helsinki (versión octubre 2013), las normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente en esta materia. Todos los pacientes incluidos en el estudio deberán leer la Hoja de Información al Paciente y firmar el Consentimiento Informado. Todos los datos de los pacientes se anonimizarán mediante la asignación de un doble código tanto a la muestra como al archivo de datos y sólo personal debidamente autorizado tendrá acceso a los datos personales identificables. Siempre se mantendrán los niveles más altos de conducta

profesional y confidencialidad, cumpliendo con el artículo 7 de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. **ANEXO I**

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos de los pacientes participantes, sólo tendrán acceso a los mismos el investigador responsable y su equipo de investigadores colaboradores, la persona encargada de realizar las tareas de monitorización, el auditor en caso de que el estudio se sometiese a una auditoría, el Comité Ético del hospital y las autoridades sanitarias.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de datos de carácter personal de los participantes en el estudio se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002, de Autonomía del Paciente.

Los proyectos de este tipo de estudios deben someterse a revisión por un comité independiente. Por ello, el presente estudio ha sido sometido para su evaluación al Comité Ético del Hospital General de Alicante.

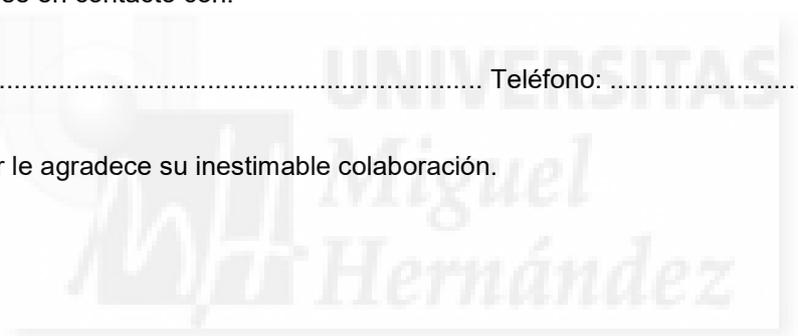
## **Preguntas / Información**

Si desea hacer alguna pregunta o aclarar algún tema relacionado con el estudio, por favor, no dude en ponerse en contacto con:

Dr.: ..... Teléfono: .....

El investigador le agradece su inestimable colaboración.

**ANEXO I**



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se está realizando una investigación de alergia a pescado, frutas y proteína vegetal y le rogamos responda el formulario que se incluye. Se le pide consentimiento para realizar una toma de muestra de saliva para determinar el polimorfismo a nivel genético y cuantificar la proteína HLA-G.

Yo,.....

(nombre y apellidos del sujeto/paciente)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con.....

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2ª Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

De igual modo, declaro haber sido informado de las medidas que serán adoptadas, en aras a garantizar la confidencialidad y disociación de cuanta información sobre mi persona pudiere recogerse durante el desarrollo del estudio, así como de la posibilidad de ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición a través de una petición formal realizada ante el responsable del Estudio. Presto libremente mi consentimiento para participar en el estudio.

Firma del participante

Fecha: **ANEXO I**

Nombre paciente.

.....

**CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA**

Se le pregunta con qué frecuencia ha consumido los alimentos en los últimos 12 meses. Debe marcar su respuestas para todos los alimentos en incluso los que no consuma, marcando “nunca o menos de 1 vez al mes”

<b>LÁCTEOS. ANEXO II</b>									
Leche									
Yogur									
Queso curados o semicurados									
Queso fresco									
Queso cremoso o en porciones (quesitos, tranchetes...)									
Postres con base de leche (natillas, flan, helados...)									
<b>HUEVOS, CARNES, PESCADOS</b>									
Huevos de gallina									
Embutidos (jamón, salchichón, salami, mortadela)									
Salchichas y similares									
Pates, foie-gras									
Hamburguesa									
Tocino, bacon, panceta									
Carne blanca (pollo, conejo, pavo)									
Carne roja (ternera, cordero)									

Pescado. <b>ANEXO II</b>										
Marisco (gambas, mejillones...)										
Pescado y marisco enlatado (atún, mejillones, pulpo, caballa, sardinas...)										
<b>VERDURAS, FRUTA Y LEGUMBRES</b>										
Verdura (lechuga, tomate, coliflor, pimientos...)										
Fruta (manzana, plátano, naranja...)										
Legumbres (lentejas, garbanzos, judías...)										
<b>PAN, CEREALES Y SIMILARES</b>										
Pan										
Tubérculos (patata, boniato, yuca, batata...)										
Arroz										
Pasta: espaguetis, macarrones y similares										
<b>ACEITES Y GRASAS</b>										
Aceite oliva										
Otro aceites vegetales: girasol, maíz, soja										
Margarina añadida al pan o a la comida										

Mantequilla añadida al pan o a la comida									
Manteca (de cerdo) añadida al pan o a la comida									
<b>DULCES Y PASTELES. ANEXO II</b>									
Bollería casera (galletas, biscochos, magdalenas...)									
Bollería casera con chocolate o cremas (galletas, biscochos, magdalenas...)									
Bollería industrial (galletas, biscochos, magdalenas...)									
Bollería industrial con chocolate o cremas (galletas, biscochos, magdalenas...)									
Chucherías (gominolas, caramelos...)									
Chocolate (bombones, lacasitos...)									
Chocolate en polvo (cola-cao, nesquick...)									
<b>BEBIDAS</b>									
Refrescos con gas: coca-cola, Fanta naranja o limón									
Zumos de frutas envasados									
Café (cafeinado)									
Te									
Bebidas vegetales (coco, almendra, arroz, soja, avena, ...)									
<b>PRECOCINADOS, PREELABORADOS Y MISCELANEAS</b>									

Croquetas.									
Pizzas, lasagnas...									
Palitos o delicias de pescado fritos									
Sopas o cremas de sobre									
Mayonesa									
Salsa de tomate (kétchup)									
Picantes: tabasco, pimienta, guindilla									
Sal									
Mermelada, miel									
Azúcar (en la leche, zumos, café, té...)									
Paella									
Espicias varias (curry, pimentón,...)									

## ANEXO II



1. ¿Qué hace con la grasa visible cuando la come?
  - a. La quito
  - b. Quito la mayoría
  - c. Quito un poco
  - d. No quito nada
2. ¿Cada cuánto tiempo come comidas fritas fuera de casa?
  - a. A diario
  - b. 4-6 veces a la semana
  - c. 1-3 veces a la semana
  - d. Menos de 1 vez a la semana
3. ¿Qué clase de grasa o aceite usa para ALIÑAR?
  - a. Manteca/mantequilla
  - b. Margarina
  - c. Aceite de Oliva
  - d. Otros aceites Vegetales
4. ¿Qué clase de grasa o aceite usa para COCINAR?
  - e. Manteca/mantequilla
  - f. Margarina
  - g. Aceite de Oliva
  - h. Otros aceites. Vegetales
5. ¿Toma algún producto con Vitaminas?
  - a. Si ¿Cuál?.....
  - b. No
6. ¿Hace algún tipo de dieta?
  - a. Si
  - b. No
7. ¿Ha cambiado su dieta durante el año pasado?
  - a. Si
  - b. No
8. Indique para los siguientes alimentos si los consume refinados o integrales.
 

a. Pan	blanco <input type="checkbox"/>	Integral <input type="checkbox"/>
b. Pasta	blanco <input type="checkbox"/>	Integral <input type="checkbox"/>
c. Azúcar	blanco <input type="checkbox"/>	Integral (moreno, panela) <input type="checkbox"/>

## ANEXOII

## Cuestionario para la recogida de datos (a rellenar por la familia) 1/3

### DATOS PERSONALES DEL NIÑO

<b>Nombre:</b>	
<b>Edad:</b>	<b>Fecha de nacimiento:</b>
<b>Nacido en:</b>	<b>Sexo (H/M):</b>
<b>Peso:</b>	<b>Talla:</b>
<b>Teléfono:</b>	
<b>Email:</b>	
<b>Alergia o intolerancia alimentaria a.....</b>	
<b>Edad de diagnóstico de la alergia o intolerancia alimentaria:</b>	
<b>Manifestaciones de la alergia/intolerancia alimentaria:</b>	<b>Gastrointestinales</b> <input type="checkbox"/> <b>No Gastrointestinales</b> <input type="checkbox"/>
	<b>Ambas</b> <input type="checkbox"/>

### ANTECEDENTES FAMILIARES

¿Familiares (padre, madre o hermanos) con enfermedades atópicas?

**Tipo de enfermedad atópica:** Rinitis alérgica  Asma  Dermatitis

¿Familiares (padre, madre o hermanos) con alergias/intolerancias alimentarias?

**Tipo de alergia/intolerancia alimentaria:**

### DATOS DEL EMBARAZO Y PARTO

**Número de semanas de gestación:** .....

**Tipo de parto:** .....

**Peso del niño al nacer** < 1500 g  1500-2500 g  >2500 g

**Tipo de lactancia:**

<b>-Lactancia materna exclusiva</b>	Desde .....	Hasta .....
	Nº tomas al día: .....	
<b>-Lactancia mixta</b>	Desde .....	Hasta .....
	Nº tomas al día: .....	
<b>-Artificial</b>	Desde .....	Hasta .....
	Nº tomas al día: .....	

**Tratamiento con antibióticos durante el embarazo o lactancia (Gastroenteritis, infecciones respiratorias, otitis, urinarias u otras con tratamiento con antibióticos)** Sí  No

¿Cuáles? ..... Tratada con .....

¿Siguió durante el embarazo/lactancia una dieta libre de gluten? Sí  No

¿Tomó regularmente probióticos (yogures, Actimel u otros)? Sí  No

¿Cuáles? ..... ¿Con qué frecuencia? .....

**ANEXO III**

**Cuestionario para la recogida de datos (a rellenar por la familia) 2/3**

DATOS DEL PRIMER AÑO DE VIDA

Edad en la que se introdujo la alimentación complementaria (fruta, verdura, cereales):..... meses.

Edad de introducción de gluten: .....meses

Durante el primer año de vida de su hijo, ¿Recuerda cuántas veces al día defecaba su hijo?

0-1  2-3  más de 3

Indique según la escala de Bristol cuál era la forma (en general) de las heces de su hijo.

Tipo 1  Tipo 2  Tipo 3  Tipo 4  Tipo 5  Tipo 6  Tipo 7

The diagram illustrates the Bristol Stool Scale with seven types of stool, each accompanied by a small illustration and a descriptive text. The types are grouped into three categories on the right side:

- Estreñimiento (Constipation):** Includes Tipo 1 (trozos duros separados) and Tipo 2 (fragmentos cohesionados en forma de salchicha, dura o seca).
- Normal:** Includes Tipo 3 (como una salchicha con algunas grietas en la superficie) and Tipo 4 (como una salchicha lisa y suave).
- Diarrea:** Includes Tipo 5 (bolas blandas de bordes definidos), Tipo 6 (fragmentos de bordes indefinidos y consistencia blanda-pastosa), and Tipo 7 (totalmente líquida).

## Cuestionario para la recogida de datos (a rellenar por la familia) 3/3

### HÁBITOS INTESTINALES ACTUALES

¿Cuántas veces defeca el niño al día? 0-1  2-3  más de 3

Indique según la Escala de Bristol la forma (en general) de las heces de su hijo.

Tipo 1  tipo 2  tipo 3  tipo 4  tipo 5  tipo 6  tipo 7



Tipo 1: trozos duros separados (heces caprinas)



Tipo 2: fragmentos cohesionados en forma de salchicha, dura o seca



Tipo 3: como una salchicha con algunas grietas en la superficie



Tipo 4: como una salchicha lisa y suave



Tipo 5: bolas blandas de bordes definidos



Tipo 6: fragmentos de bordes indefinidos y consistencia blanda-pastosa



Tipo 7: totalmente líquida

Estreñimiento

Normal

Diarrea

Toma regularmente probióticos (Actimel u otros)?

Sí

No

¿Cuáles? .....

¿Con qué frecuencia? .....

¿Uso de antihistamínicos, anti-inflamatorios (corticoesteroides, etc), anti-ácidos u otros medicamentos para el tratamiento de los síntomas de la alergia alimentaria?

¿Última vez que se usaron estos medicamentos?

### ANEXO III

## Cuestionario para la recogida de datos (a rellenar por el hospital)

### DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Peso:

Talla:

### HISTORIA CLÍNICA

¿Padeció de alguna infección en algún momento cercano al momento de diagnóstico de la alergia alimentaria?

Sí  No  ¿Cuál?.....¿Cuándo?.....Tratada con antibióticos: Sí  No  ¿Cuál?.....

#### Infecciones durante el primer año de vida:

1-Gastroenteritis agudas (con vómitos, fiebre o diarrea)

Sí  No  Tipo de síntomas: .....  
¿A qué edad? ..... Tratada con antibióticos: Sí  No  ¿Cuál?.....

2-Infecciones respiratorias (bronquiolitis, síndromes febriles claros, otitis)

Sí  No  Tipo: .....  
¿A qué edad? ..... Tratada con antibióticos: Sí  No  ¿Cuál?.....

3-Infecciones urinarias

Sí  No  .....  
¿A qué edad? ..... Tratada con antibióticos: Sí  No  ¿Cuál?.....

4-Otros síndromes tratados con antibióticos

Sí  No  .....  
¿A qué edad? ..... ¿Cuál?.....

#### Dermatitis durante el primer año de vida

Sí  No  ¿Atópica? Sí  No  ¿Edad? .....

Otras enfermedades no infecciosas: Sí  No

¿Cuál? ..... ¿A qué edad? .....

¿Se ha recuperado completamente? Sí  No

#### Vacunas

1-Vacunas no obligatorias (al año de vida)

¿Cuál? .....Dosis a: ..... meses .....meses .....meses

¿Cuál? .....Dosis a: ..... meses .....meses .....meses

2-Vacunación frente a rotavirus Sí  No

¿A qué edad? .....

### ANEXO III

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 8º Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. (2015).
2. Pelaez A. Dávila I.J. Tratado de Alergología Tomo II. SEAIC. 2007.
3. Janeway Ch. A. Travers P. Walport M. Shlomchik M.J. 2º Ed. "Inmunologia. "El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. (2003).
4. Parham Meter, Inmunología 2º Edición Editorial Médica Panamericana, (2006).
5. Roitt Ivan, Brostoff J. Male D. "Inmunología. Fundamentos"9 Ed. Panamericana (2004)
6. Fernandez-Rivas M. Chem Immunol Allergy. 2015; 101:162-70.doi: 10.1159/000375469. Epub 2015 May 21. Fruit and vegetable allergy.
7. Fernández-Rivas M. Elsevier. Epub 05/06/2015. Reactividad cruzada en frutas y vegetales.
8. EM EM Hidalgo-Castro, Blanca Estela del Río-Navarro, Juan José Luis Sienra-Monge. Factores de riesgo de alergia alimentaria. Revista Alergia México. 2009; 56(5):158-64.
9. A. Cubero Santos, L. Rodríguez Romero, A. Rodríguez Martínez, B. Espín Jaime. A. Pizarro Martín. INTOLERANCIA Y ALERGIA ALIMENTARIA. VOX PEDIATRICA. Volumen 16 N° 1, 2008.

10. Carole Ober, HLA-G: An Asthma Gene on Chromosome 6p, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, Volume 25, Issue 4, November 2005, Pages 669-679, ISSN 0889-8561, 10.1016/j.iac.2005.08.001.
11. Jiřina Bartůňková, Jana Kayserová Yehuda Shoenfeld, *Allergy and autoimmunity: Parallels and dissimilarity: The Yin and Yang of Immunopathology*, *Autoimmunity Reviews*, Volume 8, Issue 4, February 2009, Pages 302-308, ISSN 1568-9972, 10.1016/j.autrev.2008.09.004.
12. Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A. Current understanding of the immune mechanisms of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 May;7(3):317-27./Sampson HA. Food allergy. Part I: Immuno pathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunology*, 1999, 103 (5): 717-728.
13. Gigante G, Tortora A, Ianiro G, Ojetti V, , Purchiaroni F, Campanale M, Cesario V, Scarpellini E, Gasbarrini A. Role of gut microbiota in food tolerance and allergies. *Dig Dis*. 2011;29(6):540-9.
14. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:43-52.e7.4
15. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199:1679–88.
16. Ruffner MA, Spergel. Eosinophilic Esophagitis in children. *JM. Curr Allergy Asthma Rep*. 2017 Aug; 17(8):54. doi: 10.1007/s11882-017-0721-2.
17. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest* 2003;111:1065–72.

18. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:1211–8.e3.
19. Prussin C, Lee J, Foster B. Eosinophilic gastrointestinal disease and peanut allergy are alternatively associated with IL-5+ and IL-5(-) T(H)2 responses. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:1326–32.e6.
20. HA, Cousins DJ, Munteanu A et al. IL-9 is a key component of memory TH cell peanut-specific responses from children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:1329–38.e10.
21. Quin et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing *Nature*, 2010; 464, 59-65.
22. Jyonuchi H. Non-IgE mediated food allergy-update of recent progress in mucosal immunity. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Oct;11 (5):382-96.
23. Smith DW, Nagler-Anderson C (2005) Preventing intolerance: the induction of non responsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 174(7):3851–3857.
24. Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI). Declaración Pública sobre la Alergia a los Alimentos y la Anafilaxia. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).
25. Alverdy JC, Chang EB. The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away. *J Leukoc Biol*. 2008 Mar;83(3):461-6. Epub 2007 Dec 26.
26. Lapichino G, Callegari ML, Marzorati S, Cigada M, Corbella D, Ferrari S, Morelli L. Impact of antibiotics on the gut microbiota of critically ill patients. *J Med Microbiol*. 2008 Aug;57(Pt 8):1007-14. doi: 10.1099/jmm.0.47387-0.

- 27.** Zhang S, Li D, Tian K, Bai Y, Zhang H, Song C, Qiao M, Kong D, Yu Y. Development of a recombinant ureolytic *Lactococcus lactis* for urea removal. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2009;37(6):227-34. doi: 10.3109/10731190903356420.
- 28.** Favier C. F., Vaughan E. E., De Vos W. M., Akkermans A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219–226. doi: 10.1128/AEM.68.1.219-226.2002.
- 29.** Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Ollé B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature.* 2013 Aug 8;500(7461):232-6. doi: 10.1038/nature12331. Epub 2013 Jul 10.
- 30.** Anna Klindworth, Elmar Pruesse, Timmy Schweer, Jörg Peplies, Christian Quast, Matthias Horn, Frank Oliver Glöckner Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41(1): e1.
- 31.** Magoč T, Salzberg SL FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011 Nov 1;27(21):2957-63. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507. Epub 2011 Sep 7.
- 32.** Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec;75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09. Epub 2009 Oct 2.

- 33.** Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011 Aug;27(16):2194-200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381. Epub 2011 Jun 23.
- 34.** Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219. Epub 2012 Nov 28.
- 35.** Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Aug;73(16):5261-7. Epub 2007 Jun 22.
- 36.** Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2460-1. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461. Epub 2010 Aug 12.
- 37.** Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6):R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- 38.** Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):169-72. doi: 10.1038/ismej.2010.133. Epub 2010 Sep 9.
- 39.** Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. Epub 2010 Apr 11

40. González-Delgado P et al. Clinical and immunological characteristics of a pediatric population with food protein-induced enterocolitis (FPIES) to fish. *Pediatric Allergy Immunol.* 2016; 27(3):269-75.
41. Camarero, B. de la Hoz, M. Mesa. *Revista Española de Inmunología.* Volumen 62 Enero - Febrero 2006. Hipersensibilidad a los alimentos en la infancia: definición, clasificación y epidemiología.
42. J.M. Fernández, M. Frías, L. Castro, J. Peña. HLA-G y sus funciones. *Inmunología en línea.* 2000.
43. Castro MJ, Morales P, Rojo-Amigo R, Martínez-Laso J, Allende L, Varela, García-Berciano M, Guillen-Perales J, Arnaiz-Villena A. 2000. Homozygous HLA-G\*0105N healthy individuals indicate that membrane anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* 2000; 56: 232-239.
44. Velasco Ruiz, G Rubio Pedraza, M Acién. Sánchez, J Gascón Castillo, E Caparrós Cayuela, P Acién Álvarez. HLA-G Soluble en Endometriosis y Otras Patologías Ováricas Benignas. 31 CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA DE GINECOLOGÍA Y OBSTERICIA. 2011.
45. Rincón Verónica, Manrique Edwin. HLA-G: Su importancia inmunológica, NOVA - ISSN: 1794-2470 vol.4 No. 5 ENERO - JUNIO DE 2006:1-116.
46. Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B. The ZVITAMBO Study Group, and Roger M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Hum Immunol* 2000; 61: 1150-1156.
47. Torres MI, Moreau P, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carosella. ED. HLA-G today. *Inmunología* 2001; 20: 18-29.
48. K. van der Ven, S. Skrablin, G. Engels, and D. Krebs, HLA-G Polymorphisms and Allele Frequencies in Caucasians *Human Immunology* 59, 302–312 (1998).

- 49.** An Verloes, Hilde Van de Velde,, Joel LeMaoult, Ileana Mateizel, Greet auffman,Peter A. Horn, Edgardo D. Carosella, Paul Devroey, Marc De Waele, Vera Rebmann, and Martine Vercammen. HLA-G Expression in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. *The Journal of Immunology*, 2011, 186: 2663–2671.
- 50.** Rebmann V, Pfeiffer K, Päßler M, Ferrone S, Mainer S, Weiss E, Grosse-Wilde. H. Detection of HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 1999; 53:14-22.
- 51.** R. Olavio Baricordi, Marina Stignani, Loredana Melchiorri, Roberta Rizzo .HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008 Jun;7(2):67-74.
- 52.** Xia WU, Li-Jun WU, Xiong-Yan Luo, Zhong Tang, Ming-Hui Yang1, Yan-Hui Xia1,Chuan-Mei XIE1, Ning-Tao Liu3, Xiao-feng Zeng4, Jian-Long Guan5 and Guo-Hua Yuan1. Association of HLA-G 14bp nsertion/deletion polymorphism with autoantibody production in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research* Vol. 2(2), pp. 15-21, August 2010.
- 53.** Rob C. A. A. van Schie and Mark E. Wilson. Genomic DNA from saliva using QIAamp Kits. Reprinted from *J. Immunol. Methods* 208, van Schie, R.C.A.A. and Wilson, M.E., *Saliva: a convenient source of DNA for analysis of bi-allelic polymorphisms of Fcg receptor IIA (CD32) and Fcg receptor IIIB (CD16)*, p. 91, 1997 with kind permission from Elsevier Science – NL, Sara Burgerhartstraat 25, 1055 KV Amsterdam, The Netherlands. UMDNJ-New Jersey Dental School, Newark, NJ.
- 54.** Roberta Rizzo, PhD,a Cristina E. Mapp, MD,b Loredana Melchiorri, PhD,a Piero Maestrelli, MD,c Annalisa Visentin, MD,c Stefano Ferretti, MD,d Ilaria Bononi, PhD,Deborah Miotto, PhD,b and Olavio R. Baricordi, PhD. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*. doi:10.1016/j.jaci.2004.11.031.

- 55.** Nicholas G. Walpole, Lars Kjer-Nielsen, Lyudmila Kostenko, James McCluskey, Andrew G. Brooks, Jamie Rossjohn, Craig S. Clements, The Structure and Stability of the Monomorphic HLA-G Are Influenced by the Nature of the Bound Peptide, *Journal of Molecular Biology*, Volume 397, Issue 2, 26 March 2010, Pages 467-480, ISSN 0022-2836, 10.1016/j.jmb.2010.01.052.
- 56.** Jim Sheu, Ie-Ming Shih, HLA-G and Immune Evasion in Cancer Cells, *Journal of the Formosan Medical Association*, Volume 109, Issue 4, April 2010, Pages 248-257, ISSN 0929-6646, 10.1016/S0929-6646(10)60050-2.
- 57.** Tal Twito, Jemy Joseph, Amelia Mociornita, Vivek Rao, Heather Ross, Diego H. Delgado, The 14-bp deletion in the HLA-G gene indicates a low risk for acute cellular rejection in heart transplant recipients, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 30, Issue 7, July 2011, Pages 778-782, ISSN 1053-2498, 10.1016/j.healun.2011.01.726.
- 58.** Ole B. Christiansen, Astrid M. Kolte, Mette Dahl, Elisabeth C. Larsen, Rudi Steffensen, Henriette S. Nielsen, Thomas V. Hviid, Maternal homozygosity for a 14 base pair insertion in exon 8 of the HLA-G gene and carriage of HLA class II alleles restricting HY immunity predispose to unexplained secondary recurrent miscarriage and low birth weight in children born to these patients, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 7, July 2012, Pages 699-705, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.04.014.
- 59.** Nahla Ghandri, Sallouha Gabbouj, Karim Farhat, Nouredine Bouaouina, Hamdi Abdelaziz, Abdelatif Nouri, Lotfi Chouchane, Elham Hassen, Association of HLA-G polymorphisms with nasopharyngeal carcinoma risk and clinical outcome, *Human Immunology*, Volume 72, Issue 2, February 2011, Pages 150-158, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2010.10.006.
- 60.** Roberta Rizzo, Daria Bortolotti, Nadia Ben Fredj, Antonella Rotola, Francesca Cura, Massimiliano Castellazzi, Carmine Tamborino, Silva Seraceni, Eleonora Baldi, Loredana Melchiorri, Maria Rosaria Tola, Enrico Granieri, Olavio R. Baricordi, Enrico Fainardi, Role of HLA-G 14bp

deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Human Immunology*, Available online 21 August 2012, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.08.005.

- 61.** Ayesha Shakhawat, Valerie Shaikly, Essam Elzatma, Emmanouil Mavrakos, Asma Jabeen, Nelson Fernández, Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 85, Issue 1, May 2010, Pages 40-46, ISSN 0165-0378, 10.1016/j.jri.2010.02.004.
- 62.** Juergen Bukur, Simon Jasinski, Barbara Seliger, The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 22, Issue 4, August 2012, Pages 350-358, ISSN 1044-579X, 10.1016/j.semcancer.2012.03.003.
- 63.** H.J. van Beekhuizen, I. Joosten, F.K. Lotgering, J. Bulten, L.C. van Kempen, Natural Killer Cells and HLA-G Expression in the Basal Decidua of Human Adhesive Placenta, Volume 31, Issue 12, December 2010, Pages 1078-1084, ISSN 0143-4004, 10.1016/j.placenta.2010.09.016.
- 64.** Edgardo D. Carosella, The tolerogenic molecule HLA-G, *Immunology Letters*, Volume 138, Issue 1, July 2011, Pages 22-24, ISSN 0165-2478, 10.1016/j.imlet.2011.02.011.
- 65.** Takele Teklemariam, Longmei Zhao, Basil M. Hantash, Full-length HLA-G1 and truncated HLA-G3 differentially increase HLA-E surface localization, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 9, September 2012, Pages 898-905, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.06.007.
- 66.** Le Gal F, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet, J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999;11: 1351-56.

- 67.** Philippe Rousseau, Magali Le Discorde, Gaël Mouillot, Céline Marcou, Edgardo D Carosella, Philippe Moreau, The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability, *Human Immunology*, Volume 64, Issue 11, November 2003, Pages 1005-1010, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2003.08.347.
- 68.** Thomas Vauvert F. Hviid, Roberta Rizzo, Loredana Melchiorri, Marina Stignani, Olavio R. Baricordi, Polymorphism in the 5' Upstream Regulatory and 3' Untranslated Regions of the HLA-G Gene in Relation to Soluble HLA-G and IL-10 Expression, *Human Immunology*, Volume 67, Issues 1–2, January–February 2006, Pages 53-62, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2005.12.003.
- 69.** Margit Hørup Larsen, Thomas Vauvert F. Hviid, Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease, *Human Immunology*, Volume 70, Issue 12, December 2009, Pages 1026-1034, ISSN 0198.
- 70.** Im Sheu, Ie-Ming Shih, HLA-G and Immune Evasion in Cancer Cells, *Journal of the Formosan Medical Association*, Volume 109, Issue 4, April 2010, Pages 248-257, ISSN 0929-6646, 10.1016/S0929-6646(10)60050-2.
- 71.** Mirjana Urosevic, HLA-G in the skin—Friend or foe?, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 17, Issue 6, December 2007, Pages 480-484, ISSN 1044-579X, 10.1016/j.semcancer.2007.09.001.
- 72.** Vito Pistoia, Fabio Morandi, Xinhui Wang, Soldano Ferrone, Soluble HLA-G: Are they clinically relevant?, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 17, Issue 6, December 2007, Pages 469-479, ISSN 1044-579X, 10.1016/j.semcancer.2007.07.004.
- 73.** Christine Guillard, Inès Zidi, Céline Marcou, Catherine Menier, Edgardo D. Carosella, Philippe Moreau, Role of HLA-G in innate immunity through direct activation of NF- $\kappa$ B in natural killer cells, *Molecular Immunology*,

Volume 45, Issue 2, January 2008, Pages 419-427, ISSN 0161-5890, 10.1016/j.molimm.2007.06.160.

- 74.** Leos Kren, Katarina Muckova, Eva Lzicarova, Marek Sova, Vaclav Vybihal, Tomas Svoboda, Pavel Fadrus, Martin Smrcka, Ondrej Slaby, Radek Lakomy, Petr Vanhara, Zdenka Krenova, Jaroslav Michalek, Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: A role in innate immunity?, *Journal of Neuroimmunology*, Volume 220, Issues 1–2, 30 March 2010, Pages 131-135, ISSN 0165-5728, 10.1016/j.jneuroim.2010.01.014.
- 75.** Roberta Rizzo, Daria Bortolotti, Nadia Ben Fredj, Antonella Rotola, Francesca Cura, Massimiliano Castellazzi, Carmine Tamborino, Silva Seraceni, Eleonora Baldi, Loredana Melchiorri, Maria Rosaria Tola, Enrico Granieri, Olavio R. Baricordi, Enrico Fainardi, Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Human Immunology*, Available online 21 August 2012, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.08.005.
- 76.** Raghed M. Jassem, Wafaa Sadoon Shani, Dagan A. Loisel, Maysoon Sharief, Christine Billstrand, Carole Ober, HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 8, August 2012, Pages 811-817, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.05.009.
- 77.** (Juergen Bukur, Simon Jasinski, Barbara Seliger, The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 22, Issue 4, August 2012, Pages 350-358, ISSN 1044-579X, 10.1016/j.semcancer.2012.03.003.
- 78.** Zhan-Kui Jin, Cui-Xiang Xu, Pu-Xun Tian, Wu-Jun Xue, Xiao-Ming Ding, Jin Zheng, Chen-Guang Ding, Guan-Qun Ge, Tian-Ci Mao, Yuan Lin, Impact of HLA-G 14-bp polymorphism on acute rejection and cytomegalovirus

infection in kidney transplant recipients from northwestern China, *Transplant Immunology*, Available online 29 June 2012, ISSN 0966-3274, 10.1016/j.trim.2012.06.008.

- 79.** Xiang-Juan Li, Xia Zhang, Aifen Lin, Yan-Yun Ruan, Wei-Hua Yan, Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical cancer lesions is associated with disease progression, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 9, September 2012, Pages 946-949, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.07.041.
- 80.** Hernandez Costa Cynthia, Gelmini Georgia Fernanda, Fanini Wowk Priscilla, Botogosque Mattar Sibelle, Vargas Rafael Gustavo, Muñoz Valéria Maria Sperandio Roxo, Schuffner Alessandro, da Graça Bicalho Maria, HLA-G regulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 9, September 2012, Pages 891-897, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.06.002.
- 81.** Takele Teklemariam, Longmei Zhao, Basil M. Hantash, Full-length HLA-G1 and truncated HLA-G3 differentially increase HLA-E surface localization, *Human Immunology*, Volume 73, Issue 9, September 2012, Pages 898-905, ISSN 0198-8859, 10.1016/j.humimm.2012.06.007.
- 82.** Paula A.G. Fregonezi, Tarsia G.A. Silva, Renata T. Simões, Philippe Moreau, Edgardo D. Carosella, Carla P.M. Kläy, Maria A.G. Gonçalves, Edson G. Soares, Francisco Souto, Eduardo A. Donadi, Christiane P. Soares, Expression of non classical molecule human leukocyte antigen–G in oral lesions, *American Journal of Otolaryngology*, Volume 33, Issue 2, March–April 2012, Pages 193-198, ISSN 0196-0709, 10.1016/j.amjoto.2010.08.001.
- 83.** David R.J. Bainbridge , Shirley A. Ellis Ian L. Sargent. The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *Journal of Reproductive Immunology*. 47 (2000) 1–16.

84. Ariz Akhter · Vinita Das · Sita Naik, Rehan Mujeeb Faridi, Amita Pandey, Suraksha Agrawal. Upregulation of HLA-G in JEG-3 cells by dexamethasone and hydrocortison. *Arch Gynecol Obstet* (2012) 285:7–14 DOI 10.1007/s00404-011-1880-3.
85. Aractingi, S., et al. (2001). "HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells?" *Am J Pathol* 159(1): 71-77.
86. David, Natalie A. et al. Food allergen extracts to diagnose food-induced allergic diseases. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* , Volume 119 , Issue 2 , 101 - 107
87. P. Fernandez González, L. Alcántara Canabal. Alergia alimentaria no mediada por IgE. Mesa Redonda: Novedades en la alergia a alimentos en Pediatría. *BOL PEDIATR* 2011; 51: 251-254.
88. F.Guarner. Role of intestinal flora in health and disease *Nutr. Hosp.* vol.22 supl.2 Madrid may. 2007.
89. Sasaki M, Koplin JJ, Dharmage SC, Field MJ, Sawyer SM, McWilliam V, Peters RL, Gurrin LC, Vuillermin PJ, Douglass J, et al. Prevalence of clinic-defined food allergy in early adolescence: The SchoolNuts study. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jul 21. pii: S0091-6749(17)31017-5. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.041. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28755784.
90. Acker WW, Plasek JM, Blumenthal KG, Lai KH, Topaz M, Seger DL, Goss FR, Slight SP, Bates DW, Zhou L. Prevalence of food allergies and intolerances documented in electronic health records. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 May 23. pii: S0091-6749(17)30672-3. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28577971.
91. Yanagida N, Sato S, Takahashi K, Nagakura KI, Ogura K, Asaumi T, Ebisawa M. Skin prick test is more useful than specific IgE for diagnosis of buckwheat allergy: A retrospective cross-sectional study. *Allergol Int.* 2017

May 4. pii: S1323-8930(17)30046-1. doi: 10.1016/j.alit.2017.04.005. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28479284.

92. Michelet M, Schluckebier D, Petit LM, Caubet JC. Food protein-induced enterocolitis syndrome - a review of the literature with focus on clinical management. *J Asthma Allergy*. 2017 Jun 27;10:197-207. doi: 10.2147/JAA.S100379. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28721077; PubMed Central PMCID: PMC5499953.
93. Barasche J, Stollar F, Bergmann MM, Caubet JC. Severely Altered-Consciousness Status and Profuse Vomiting in Infants: Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES) a Challenging Diagnosis. *Pediatr Emerg Care*. 2016 Oct 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27741073.
94. Le Bouteiller P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 1999; 167: 233-244.
95. Cavalcanti A, Almeida R, Mesquita Z, Duarte ALBP, Donadi EA, Lucena-Silva N. Gene polymorphism and HLA-G expression in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus: A pilot study. *HLA*. 2017 Jul 11. doi: 10.1111/tan.13084. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28695673.
96. Pascale P, Cabestre AF, Ibrahim E, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Moya RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED. Identification of HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61: 1138-1149.
97. Ishitani A, Geraghty D. Alternative Splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3947-3951.
98. Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLAG antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 1994; 153: 5516-5524.

- 99.** Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. 1997. The alpha 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5249-5254.
- 100.** Pascale P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal A, Avril M, Dausset J, Guillet J, Carosella ED. HLAG expression in melanoma: A way for tumor cells to scape from immuno surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4510-4515.
- 101.** Carosella ED1, Rouas-Freiss N1, Tronik-Le Roux D1, Moreau P1, LeMaoult J2. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol.* 2015;127:33-144. doi: 10.1016/bs.ai.2015.04.001. Epub 2015 May 27.
- 102.** Ben Fredj N, Sakly K, Bortolotti D, Aissi M, Frih-Ayed M, Rotola A, Caselli E, Cura F, Sakly N, Aouni M, Di Luca D, Rizzo R. The association between functional HLA-G 14bp insertion/deletion and +3142 C>G polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2016 Dec;180:24-30. doi: 10.1016/j.imlet.2016.10.006. Epub 2016 Oct 19. PubMed PMID: 27771469.
- 103.** Giuseppe Murdaca, Paola Contini, Simone Negrini, Giorgio Ciprandi, and Immunoregulatory. Role of HLA-G in Allergic Diseases *Journal of Immunology Research* Volume 2016 (2016), Article ID 6865758, 7 pages.
- 104.** Ben Fredj N, Sakly K, Bortolotti D, Aissi M, Frih-Ayed M, Rotola A, Caselli E, Cura F, Sakly N, Aouni M, Di Luca D, Rizzo R. The association between functional HLA-G 14bp insertion/deletion and +3142 C>G polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2016 Dec;180:24-30. doi: 10.1016/j.imlet.2016.10.006. Epub 2016 Oct 19. PubMed PMID: 27771469.

- 105.** Zhao L, Teklemariam T, Hantash BM. Reassessment of HLA-G isoform specificity of MEM-G/9 and 4H84 monoclonal antibodies. *Tissue Antigens*. 2012 Sep;80(3):231-8. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01922.x. Epub 2012 Jun 28. PubMed PMID: 22738368.
- 106.** J.-H. Lee, H.-H. Yu, L.-C. Wang, Y.-H. Yang, Y.-T. Lin, and B.-L. Chiang, "The levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells in pediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 148, no. 1, pp. 53–63, 2007.
- 107.** Liu X1, Gu W, Li X. HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation. 2013 Nov;34(11):1044-52. doi: 10.1016/j.placenta.2013.07.070. Epub 2013 Sep 17.
- 108.** M. I. Torres, M. Le Discorde, P. Lorite, A. Ríos, M. A. Gassull, A. Gil, J. Maldonado, J. Dausset, E. D. Carosella. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* (2004) 16 (4): 579-583. DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh061>. Published: 01 April 2004.
- 109.** Pazmany, L., Mandelboim, O., ValésGómez, M., Davis, D. M., Reyburn, H. T. and Strominger, J. L. 1996 . Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 274-792.
- 110.** Cao, M.; Yie, S.-M.; Liu, J.; Ye, S.R.; Xia, D.; Gao, E. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens* 2011, 78, 120–128.
- 111.** Castelli, E.C.; Mendes-Junior, C.T.; Deghaide, N.H.S.; de Albuquerque, R.S.; Muniz, Y.C.N.; Simões, R.T.; Carosella, E.D.; Moreau, P.; Donadi, E.A. The genetic structure of 30 untranslated region of the HLA-G gene: Polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun*. 2010, 11, 134–141.

- 112.** Castelli, E.C.; Veiga-Castelli, L.C.; Yaghi, L.; Moreau, P.; Donadi, E.A. Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the HLA-G Gene. *J. Immunol. Res.* 2014, 2014, 1–15.
- 113.** Hviid, T.V.F.; Hylenius, S.; Rørbye, C.; Nielsen, L.G. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003, 55, 63–79.
- 114.** Larsen, M.H.; Hviid, T.V.F. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum. Immunol.* 2009, 70, 1026–1034.
- 115.** Martelli-Palomino, G.; Pancotto, J.A.; Muniz, Y.C.; Mendes-Junior, C.T.; Castelli, E.C.; Massaro, J.D.; Krawice-Radanne, I.; Poras, I.; Rebmann, V.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Moreau, P.; Donadi, E.A. Polymorphic sites at the 30 untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French Population. *PLoS ONE* 2013, 8, e71742.
- 116.** Garziera, M.; Catamo, E.; Crovella, S.; Montico, M.; Cecchin, E.; Lonardi, S.; Mini, E.; Nobili, S.; Romanato, L.; Toffoli, G. Association of the HLA-G 3' UTR polymorphisms with colorectal cancer in Italy: A first insight. *Int. J. Immunogenet.* 2016, 43, 32–39.
- 117.** Jeong, S.; Park, S.; Park, B.-W.; Park, Y.; Kwon, O.-J.; Kim, H.-S. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS ONE* 2014, 9, e98284
- 118.** Ferguson, R.; Ramanakumar, A.V.; Koushik, A.; Coutlée, F.; Franco, E.; Roger, M.; the Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. *Int. J. Cancer* 2012, 131, E312–E319.
- 119.** Garziera, M.; Bidoli, E.; Cecchin, E.; Mini, E.; Nobili, S.; Lonardi, S.; Buonadonna, A.; Errante, D.; Pella, N.; D'Andrea, M.; et al. HLA-G 3' UTR

Polymorphisms Impact the Prognosis of Stage II-III CRC Patients in Fluoropyrimidine-Based Treatment. *PLoS ONE* 2015, 10, e0144000.

- 120.** Sabbagh, A.; Luisi, P.; Castelli, E.C.; Gineau, L.; Courtin, D.; Milet, J.; Massaro, J.D.; Laayouni, H.; Moreau, P.; Donadi, E.A.; Garcia, A. Worldwide genetic variation at the 30 untranslated region of the HLA-G gene: Balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun.* 2014, 15, 95–106.
- 121.** Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaout, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv. Immunol.* 2015, 127, 33–144.
- 122.** Rizzo, R.; Audrito, V.; Vacca, P.; Brusa, D.; Stignani, M.; Bortolotti, D.; D’Arena, G.; Coscia, M.; Laurenti, L.; Forconi, F.; et al. HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: Impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism. *Haematologica* 2015, 99, 888–896.
- 123.** Bielska, M.; Bojo, M.; Klimkiewicz-Wojciechowska, G.; Jesionek-Kupnicka, D.; Borowiec, M.; Kalinka-Warzocho, E.; Prochorec-Sobieszek, M.; Robak, T.; Warzocho, K.; Mlynarski, W.; et al. Human leukocyte antigen-G polymorphisms influence the clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2015, 54, 185–193.
- 124.** Poras, I.; Yaghi, L.; Martelli-Palomino, G.; Mendes-Junior, C.T.; Muniz, Y.C.N.; Cagnin, N.F.; Sgorla de Almeida, B.; Castelli, E.C.; Carosella, E.D.; Donadi, E.A.; et al. Haplotypes of the HLA-G 3’ Untranslated Region Respond to Endogenous Factors of HLA-G<sup>+</sup> and HLA-G<sup>-</sup> Cell Lines Differentially. *PLoS ONE* 2017, 12, e0169032.
- 125.** Wang, J.; Reiss, K.A.; Khatri, R.; Jaffee, E.; Laheru, D. Immune Therapy in GI malignancies: A review. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 1745–1753. [CrossRef] [PubMed] 56. Sun, X.; Suo, J.; Yan, J. Immunotherapy in human colorectal cancer: Challenges and prospective. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22, 6362.

- 126.** Le Rond, S. et al. (2006) Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J. Immunol.* 176, 3266–3276.
- 127.** Uccelli, A. et al. (2006) Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 2566–2573.
- 128.** Selmani, Z. et al. HLA-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T-lymphocyte and NK function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells* (in press).
- 129.** Liang, S. et al. (2006) Human ILT2 receptor associates with murine MHC class I molecules in vivo and impairs T cell function. *Eur. J. Immunol.* 36, 2457–247.
- 130.** Wiendl, H. et al. (2003) The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 126, 176–185.
- 131.** Cirulli, V. et al. (2006) The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the non classical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 55, 1214–1222.
- 132.** Torres, M.I. et al. (2004) Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. Immunol.* 16, 579–583.
- 133.** Torres, M.I. et al. (2007) New aspects in celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 13, 1156–1161.
- 134.** Feger, U. et al. (2007) HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 110, 568–577.
- 135.** Rizzo, R. et al. (2008) Different production of soluble HLA-G antigens by peripheral blood mononuclear cells in ulcerative colitis and Crohn's disease: a noninvasive diagnostic tool? *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 100–105.

- 136.** Verbruggen, L.A. et al. (2006) Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* 67, 561–567.
- 137.** Rizzo, R. et al. (2005) Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 508–513.
- 138.** Fainardi, E. et al. (2006) Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 12, 2–12.
- 139.** Mitsdoerffer, M. et al. (2005) Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon- $\beta$  in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 159, 155–164.
- 140.** Airas, L. et al. (2007) Postpartum-activation of multiple sclerosis associated with down-regulation of tolerogenic HLA-G. *J. Neuroimmunol.* 187, 205–211.
- 141.** Paul, P. et al. (1998) HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immuno surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4510–4515.
- 142.** Rouas-Freiss, N. et al. (2005) HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 65, 10139–10144.
- 143.** Ugurel, S. et al. (2001) Soluble human leukocyte antigen-G serum levels are elevated in melanoma patients and are further increased by interferon- $\alpha$  immunotherapy. *Cancer* 92, 369–376.
- 144.** Singer, G. et al. (2003) HLA-G is a potential tumor marker in malignant sites. *Clin. Cancer Res.* 9, 4460–4464.

- 145.** Leleu, X. et al. (2005) Total soluble HLA class I and soluble HLA-G in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin. Cancer Res.* 11, 7297–7303.
- 146.** Gros, F. et al. (2006) Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* 8, 223–230.
- 147.** Sebti, Y. et al. (2007) Expression of functional soluble human leucocyte antigen-G molecules in lympho proliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 138, 202–212.
- 148.** Morandi, F. et al. (2007) Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer Res.* 67, 6433–6441.
- 149.** Menier, C. et al. (2004) Erythroblasts secrete the non classical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* 104, 3153–3160.
- 150.** Castro MJ, Morales P, Rojo-Amigo R, Martínez-Laso J, Allende L, Varela, García-Berciano M, Guillen-Perales J, Arnaiz-Villena A. 2000. Homozygous HLA-G\*0105N healthy individuals indicate that membrane anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* 2000; 56: 232-239.
- 151.** Le Friec G, Laupèze B, Fardel O, Sebti Y, Pangault C, Guilloux V, Beauplet A, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol.* 2003 Aug; 64(8):752-61.
- 152.** Nwaru BI, Takkinen HM, Kaila M, Erkkola M, Ahonen S, Pekkanen J, Simell O, Veijola R, Ilonen J, Hyöty H, Knip M, Virtanen SM. Food diversity in infancy and the risk of childhood asthma and allergies. *J Allergy Clin*

Immunol. 2014 Apr;133(4):1084-91. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1069. Epub 2014 Jan 25. PubMed PMID: 24472626.

- 153.** Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, Zhou Y, O'Connor G, Sandel M, Bacharier LB, Zeiger R, Sodergren E, Weinstock GM, Gold DR, Weiss ST, Litonjua AA. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy*. 2017 Jun 20. doi: 10.1111/all.13232. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28632934.
- 154.** Alessio, V. G., Beltzer, A. H., Lajmanovich, R. C., & Quiroga, M. A. Ecología alimentaria de algunas especies de Passeriformes (Furnariidae, Tyrannidae, Icteridae y Emberizidae): consideraciones sobre algunos aspectos del nicho ecológico. *Insugeo Miscelánea*, 2005. 14, 441-482.
- 155.** Yukihiro Furusawa, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Takaho A. Endo, Gaku Nakato, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450 (19 December 2013).
- 156.** Gigante G, Tortora A, Ianiro G, Ojetti V, Purchiaroni F, Campanale M, Cesario V, Scarpellini E, Gasbarrini A. Role of gut microbiota in food tolerance and allergies. *Dig Dis*. 2011; 29(6):540-9.
- 157.** Quin et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing *Nature*, 2010; 464, 59-65.
- 158.** Jyonuchi H. Non-IgE mediated food allergy-update of recent progress in mucosal immunity. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Oct;11 (5):382-96.
- 159.** Smith DW, Nagler-Anderson C (2005) Preventing intolerance: the induction of non responsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 174(7):3851–3857.

- 160.** van de Merwe JP, Stegeman JH, Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983;49:119–124.
- 161.** Monika Marko, Rafał Pawliczak The role of microbiota in allergy development *Polish Journal of Allergology*, Volume 4, Issue 2, April–June 2017, Pages 58-62.
- 162.** Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, Moreau P, LeMaout J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol.* 2015;127:33-144. doi: 10.1016/bs.ai.2015.04.001. Epub 2015 May 27. Review. PubMed PMID: 26073983.
- 163.** Torres MI, Moreau P, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carosella ED. HLA-G today. *Inmunologia* 2001; 20: 18-29.

