



CEU
*Universidad
San Pablo*



CEU
*Escuela Internacional
de Doctorado*

Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado

Programa en Medicina Traslacional

Identificación de biomarcadores
asociados a la inflamación alérgica

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Leticia Mera Berriatua

Dirigida por: María Marta Escribese Alonso

Co-Dirigida por: Domingo Barber Hernández

MADRID, 2020

TESIS DOCTORAL

LETICIA MERA BERRIATUA

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi directora de tesis María Escribese y a mi codirector Domingo Barber por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran grupo durante los últimos cuatro años y especialmente por haberme guiado durante todo este proceso, sin ellos este trabajo no habría sido posible.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros del IMMA, que más que compañeros son amigos y han hecho de estos años una experiencia increíble, sin duda sois lo mejor que me llevo y lo que más voy a echar de menos. Mención especial a mis supermanes sin capa (Eli, David, Javi S., Irina, Irene, Edu, Marisa y la veterana Susan), gracias por todos los viajes, las fiestas y por haber estado siempre ahí, ya sea para echarnos unas risas o quejarnos de la vida en general. Gracias también a Noe por estar tan zumbada y pasar en moto de todo y sobre todo, por estar siempre dispuesta a ayudarme (tanto laboral como personalmente). Gracias Nico y Cira por haber sido mis primeros maestros en el labo y por todos los ratos compartidos fuera de él. Gracias también a Javi M. por sus mocotrococ y charlas de padre, a Sergio y Ricardo y Pepa, a Paloma, Marina, Vir, Cris, Juan y Carmela. Gracias a todo el personal que forma parte de la Universidad CEU San Pablo.

Me gustaría agradecer también a la Fundación Universitaria San Pablo CEU por el apoyo económico recibido.

Por otro lado quiero agradecer a Markus Ollert, a Oliver Hunewald y a Guillem el haberme acogido esos cuatro meses en Luxemburgo y haberme dado la oportunidad de ampliar mi formación. También a todos los amigos que hice allí, especialmente a mis ponchitos, a Sergio y a Noe.

Gracias también a mis amigos, tanto a los de siempre como a los que han ido llegando por ser una parte esencial de mi vida.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos y a los que ya no están, que sé que estarán muy orgullosos.

Abreviaturas

AA: abuela alérgica.

AC: abuela control.

ADP: adenosin difosfato.

AIT: inmunoterapia con alérgenos específicos.

APLV: alergia a la proteína de leche de vaca.

ASVs: amplicon sequence variants.

ATP: adenosin trifosfato.

CCA: análisis de correspondencia canónica.

CD: células dendríticas.

cDNA: DNA complementario.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

COPD: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

CPA: células presentadoras de antígeno.

EPG: estación polínica de gramíneas.

F: leche de fórmula.

FC: fold change.

FcεI: receptor de alta afinidad para IgE.

FDR: false discovery rate.

FEV1: volumen espiratorio forzado.

GDEs: genes diferencialmente expresados.

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

GSEA: gene set enrichment analysis.

H: hidrolizado de leche de fórmula.

IFN γ : interferón gamma.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleucina.

ILC2: células linfoides innatas tipo 2.

iNKT: células T natural killer invariantes.

IPA: ingenuity pathway analysis.

IT: inmunoterapia.

ITO: inmunoterapia oral.

ITSC: inmunoterapia subcutánea.

ITSL: inmunoterapia sublingual.

LA: lactante alérgico a la proteína de leche de vaca.

LC: lactante control.

LM: leche materna.

LTPs: proteínas de transferencia de lípidos.

MA: madre alérgica.

MC: madre control.

miRNAs: micro RNAs.

Mono: pacientes monosensibilizados a *Phleum pratense*.

mRNA: RNA mensajero.

NETs: neutrophil extracellular traps.

NKT: células T natural killer.

OTU: operational taxonomic units.

PCoA: análisis de coordenadas principales.

PCR: polymerase chain reaction.

PERMANOVA: análisis multivariante permutacional.

Poli: pacientes polisensibilizados.

PPP: plasma pobre en plaquetas.

PRP: plasma rico en plaquetas.

qPCR: PCR cuantitativa.

RMA: robust-multiarray-average.

RQI: RNA quality indicator.

rRNA: RNA ribosómico.

RT-PCR: reverse transcription PCR.

S1P: esfingosina 1-fosfato.

SAO: síndrome de alergia oral.

SPT: skin prick test.

TG: tracto gastrointestinal.

TLR: toll like receptor.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TReg: células T reguladoras.

TSLP: linfopoyetina del estroma tímico.

TXA2: tromboxano A2.

UHNT: unidad de hemoterapia no transfusional.

Resumen

Durante los últimos años tanto la prevalencia como la gravedad de las enfermedades alérgicas se ha visto aumentada. Además, las características subyacentes al desarrollo de un fenotipo alérgico grave no están bien definidas actualmente y existe una falta de biomarcadores útiles tanto para la clasificación de estos pacientes como de predicción y monitorización de eficacia de tratamientos como la inmunoterapia sublingual. Por otro lado, en los últimos años ha cobrado mucha relevancia el papel de las plaquetas como células clave en la inflamación alérgica, así como la relación entre microbiota y el desarrollo de la alergia, sin embargo, aún no hay estudios suficientes que profundicen en estas cuestiones.

Con el fin de indagar en estos aspectos, en este trabajo nos propusimos la evaluación del papel de las plaquetas en el desarrollo y progresión de la alergia en distintos modelos de gravedad respiratoria, con y sin alergia alimentaria asociada mediante un análisis transcriptómico, por otro lado, la caracterización del perfil transcriptómico asociado al tratamiento con inmunoterapia sublingual a *Phleum pratense* (GRAZAX) y por último, la identificación de cambios en la composición de la microbiota intestinal en un modelo de alergia a la proteína de leche de vaca en lactantes.

En cuanto al papel de las plaquetas en la alergia, durante la Fase I del estudio, encontramos una disminución de transcritos asociados a funciones plaquetarias en las CMSP obtenidas de pacientes con alergia respiratoria a gramíneas, sensibilizados a profilina y que llegaban a desarrollar reacciones alimentarias graves en comparación con los sujetos no alérgicos y los pacientes con una alergia respiratoria ligada a alergia alimentaria leve y moderada. Posteriormente, en la Fase II del estudio, nos propusimos validar estos resultados en otro modelo de gravedad alérgica, en este caso de alergia respiratoria a gramíneas en ausencia de alergia alimentaria, centrándonos en la población plaquetaria obtenida mediante un procedimiento de aféresis. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la Fase I, los pacientes con una alergia grave mostraban una disminución de transcritos asociados con funciones plaquetarias tales como la agregación y la activación, así como una respuesta inflamatoria disminuida en comparación con los sujetos no alérgicos, sugiriendo un posible agotamiento plaquetario y una alteración en el sistema de reparación.

En cuanto al tratamiento con ITSL, se analizó el perfil transcriptómico de los pacientes con alergia a gramíneas incluidos en un estudio aleatorizado doble ciego controlado con placebo a dos años. Los principales resultados obtenidos mostraron que los pacientes tenían un perfil transcriptómico diferente según su sensibilización (monosensibilizados o polisensibilizados) previamente a comenzar al tratamiento. Además, los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados que recibían tratamiento activo también mostraban un perfil transcriptómico diferente tras dos años de tratamiento, sugiriendo que su respuesta al tratamiento con ITSL era diferente. Por último, se analizó el perfil transcriptómico de los pacientes monosensibilizados previamente al tratamiento (T0) y tras dos años de ITSL (T2), observándose una desensibilización de las células efectoras a T2, que parece ser clave para la respuesta reguladora que se establece según la mayoría de los estudios a partir del tercer año de tratamiento.

Como último objetivo nos propusimos investigar el papel de la microbiota en el desarrollo de la alergia alimentaria, para lo cual utilizamos un modelo de APLV en el que analizamos la composición bacteriana de muestras de heces de lactantes alérgicos, sus madres y sus abuelas y de lactantes control, sus madres y sus abuelas. Por un lado, encontramos que existía una mayor diversidad de la microbiota intestinal en adultos que en lactantes. En cuanto a composición, se encontró una alteración de la familia *Prevotellaceae* al comparar la microbiota de lactantes alérgicos y lactantes control. Esta diferencia también aparecía al analizar la composición microbiana intestinal de lactantes que se alimentaban con leche de fórmula (todos lactantes control) con aquellos que tomaban hidrolizado (la mayoría de los lactantes alérgicos), por lo que no podemos saber si es debida a la alergia o a la alimentación ya que existe un sesgo. Por último, quisimos analizar si existía un patrón disbiótico transferido de madres a hijos a lo largo de estas tres generaciones, para lo cual se calculó la distancia de Bray-Curtis en los miembros de la misma familia (madre-lactante, madre-abuela, abuela-lactante) y se compararon las familias alérgicas frente a no alérgicas. Las distancias fueron similares por lo que no pudimos concluir que existiese una disbiosis transmitida de madres a hijos en este modelo de APLV.

Índice

| | |
|--|------------|
| Abreviaturas..... | 3 |
| Resumen..... | 7 |
| Introducción..... | 10 |
| Hipótesis y Objetivos..... | 34 |
| Capítulo I | |
| Materiales y métodos..... | 36 |
| Resultados..... | 48 |
| Discusión..... | 67 |
| Capítulo II | |
| Materiales y métodos..... | 76 |
| Resultados..... | 79 |
| Discusión..... | 89 |
| Capítulo III | |
| Materiales y métodos..... | 98 |
| Resultados..... | 102 |
| Discusión..... | 114 |
| Conclusiones..... | 118 |
| Lista de publicaciones científicas..... | 119 |
| Anexos..... | 120 |
| Bibliografía..... | 124 |

Introducción

1. La Enfermedad Alérgica

1.1 Origen y definición

Actualmente la Alergia se define como una hipersensibilidad inmunológica ante sustancias inocuas (pólenes, ácaros del polvo, alimentos, fármacos...) que puede llevar a la aparición de varias enfermedades a través de distintos mecanismos patológicos^{1,2}. Estas sustancias inocuas son los denominados alérgenos que se definen como sustancias antigénicas, es decir, capaces de desencadenar formación de anticuerpos (habitualmente Inmunoglobulina E, IgE), y que causan una respuesta inmunitaria (Alergia)³. En cuanto a sus propiedades bioquímicas, algunos de los alérgenos más conocidos son proteínas que en ocasiones fijan lípidos o participan en la transferencia de lípidos (LTPs) y otros son glicoproteínas. Existen distintos tipos de alérgenos cuya clasificación se representa en la Figura 1³.



Figura 1. Clasificación de alérgenos.

1.2 Epidemiología y coste de las enfermedades alérgicas

La prevalencia de las enfermedades alérgicas y su gravedad se ha visto incrementada en los últimos 30 años, especialmente en los países más industrializados y en desarrollo debido a distintos factores, como pueden ser la excesiva higiene, el

aumento de los niveles de contaminación, el cambio climático, llevar un estilo de vida más sedentario con la consecuente exposición a alérgenos interiores y el incremento en el uso de antibióticos y fármacos^{4,5}. La Organización Mundial de la Alergia (The World Allergy Organization (WAO)) apunta a que aproximadamente una de cada cinco personas sufre de algún tipo de enfermedad alérgica (rinitis alérgica, asma, conjuntivitis, eczema, alergia alimentaria, alergia a medicamentos...). Centrándonos en Europa, según los datos proporcionados por la European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) actualmente 100 millones de europeos padecen rinitis alérgica, 70 millones sufren de asma y hasta 7 millones presentan una alergia alimentaria, llegándose a producir episodios de anafilaxia en el 8% de esta población alérgica. Además, el 45% de la población europea alérgica sufre el riesgo de ser mal diagnosticado⁶. Este incremento de las enfermedades alérgicas se ha convertido en un problema grave de salud actual, llegando a denominarse “la enfermedad del siglo XXI” y por tanto se ha convertido en un asunto de preocupación tanto para gobiernos como para los propios individuos que la sufren, ya que su coste económico está aumentando de forma exponencial, estimándose que los costes indirectos evitables de no tratar adecuadamente la alergia en la UE oscilan entre 55 y 151 mil millones de euros al año. Estos costes incluyen:

- Costes directos que derivan de la asistencia médica incluyendo visitas al médico, diagnóstico, medicación, hospitalizaciones, etc. y costes personales de transporte, asistencia social, etc.
- Costes indirectos como la pérdida de productividad laboral.
- Costes intangibles como el sufrimiento, miedo o tristeza de los individuos y familiares que las sufren³.

1.3 Aspectos inmunológicos de la enfermedad alérgica

La alergia se manifiesta cuando el sistema inmune no es capaz de reconocer una sustancia como inocua (alérgeno), generándose una respuesta inmunológica específica, produciéndose anticuerpos y la aparición de síntomas que se pueden extender a lo largo de todo el organismo³.

A rasgos generales, las reacciones alérgicas se dividen en tres fases:

- *Fase de Sensibilización*: tiene una duración indeterminada. El paciente se hace sensible a ese alérgeno, pero no manifiesta ningún tipo de síntoma. En esta

fase se produce un primer contacto con un alérgeno, el cual es capturado por las células presentadoras de antígeno (CPA), que lo procesan en su interior y lo presentan a los linfocitos T, que interactúan con los linfocitos B, produciendo IgE específica frente a ese alérgeno. La IgE a su vez se unirá a sus receptores en células efectoras (mastocitos y basófilos).

- *Reacción alérgica aguda:* ante una segunda exposición, el alérgeno es dirigido directamente hacia los anticuerpos IgE específicos que se habían generado previamente y que estaban unidos a mastocitos y basófilos. Al producirse la unión alérgeno-anticuerpo se produce la liberación de histamina e interleucinas (IL), que inducen un estado inflamatorio. Es en este momento en el que el individuo comienza a manifestar sintomatología alérgica (conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, estornudos, dificultad respiratoria, etc.).
- *Reacción alérgica tardía:* de cuatro a seis horas después de la “reacción alérgica aguda” se produce una segunda reacción inflamatoria gracias al efecto de las IL, cuya misión es atraer a los eosinófilos al lugar de inflamación, donde liberan sus gránulos, que generan daño en inflamación de una manera más permanente, perpetuándose los síntomas³ (Figura 2).

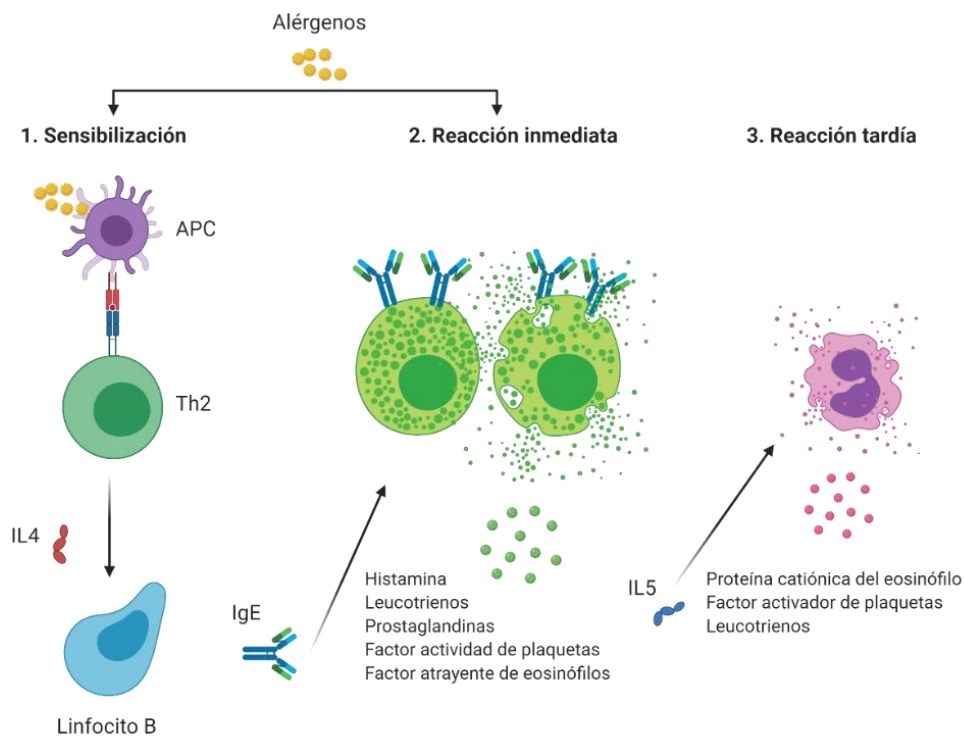


Figura 2. Mecanismo de la alergia. APC: célula presentadora de antígeno. Th2: linfocito Th2. IL4: interleucina 4. IL5: interleucina 5. Figura adaptada de *El libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA 2012*.

Aunque hay una gran variedad de mecanismos inmunológicos implicados en la patogénesis de la alergia, la mayoría de las respuestas alérgicas se consideran reacciones de hipersensibilidad tipo I, caracterizadas por la producción de IgE.

Existen varias células inmunitarias participantes en el desarrollo de la respuesta inmune innata durante la inflamación alérgica⁷:

- *Mastocitos y basófilos*: son responsables de fenómenos como el asma y la anafilaxia. Ambos secretan mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos, interleucinas o citoquinas Th2) y expresan receptores tipo Toll Like Receptor (TLR). En pacientes alérgicos, el receptor de alta afinidad para IgE (FcεI) está casi saturado y listo para iniciar la respuesta mediada por IgE ante una cantidad suficiente de alérgeno.
- *Eosinófilos*: generalmente durante la respuesta alérgica, se acumulan en tejido mucoso. Su proliferación y diferenciación se lleva a cabo gracias a la interleucina 5 (IL5) producida principalmente por células Th2. Además, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés) producido por células epiteliales, también está implicado en la activación y reclutamiento de los eosinófilos en tejido.
- *Células epiteliales*: son la interfaz entre el huésped y el exterior y suponen la primera barrera de defensa frente a agentes externos patógenos como microorganismos y alérgenos. La activación de receptores de reconocimiento de patrones presentes en las células epiteliales de las vías respiratorias o del intestino produce la liberación de IL25, IL33 y linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) que atraen y activan células del sistema inmune innato y adaptativo y son capaces de iniciar y mantener la respuesta inmunitaria tipo Th2⁸. Este es un proceso clave en el reconocimiento de alérgenos que activan a las células dendríticas (CD), que coordinan el siguiente paso en la respuesta inmunitaria.
- *Células dendríticas*: son CPAs y hacen de nexo entre el sistema inmune innato y adaptativo. Procesan los alérgenos y se los presentan a las células T en los ganglios linfáticos, liberándose IL4, IL12 e interferón gamma (IFNγ), produciéndose la polarización de las células T.
- *Células T Natural Killer (NKT)*: producen citoquinas proinflamatorias e inmunosupresoras como IFNγ, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e IL10. Dentro de estas células hay un linaje específico denominado células T NK

invariantes (iNKT) que expresan receptores de células T y producen IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-13.

- *Células linfoides innatas tipo 2 (ILC2)*: producen citoquinas Th2. Se identificaron por primera vez en el tracto gastrointestinal, el pulmón y sangre^{3,7} (Figura 3).

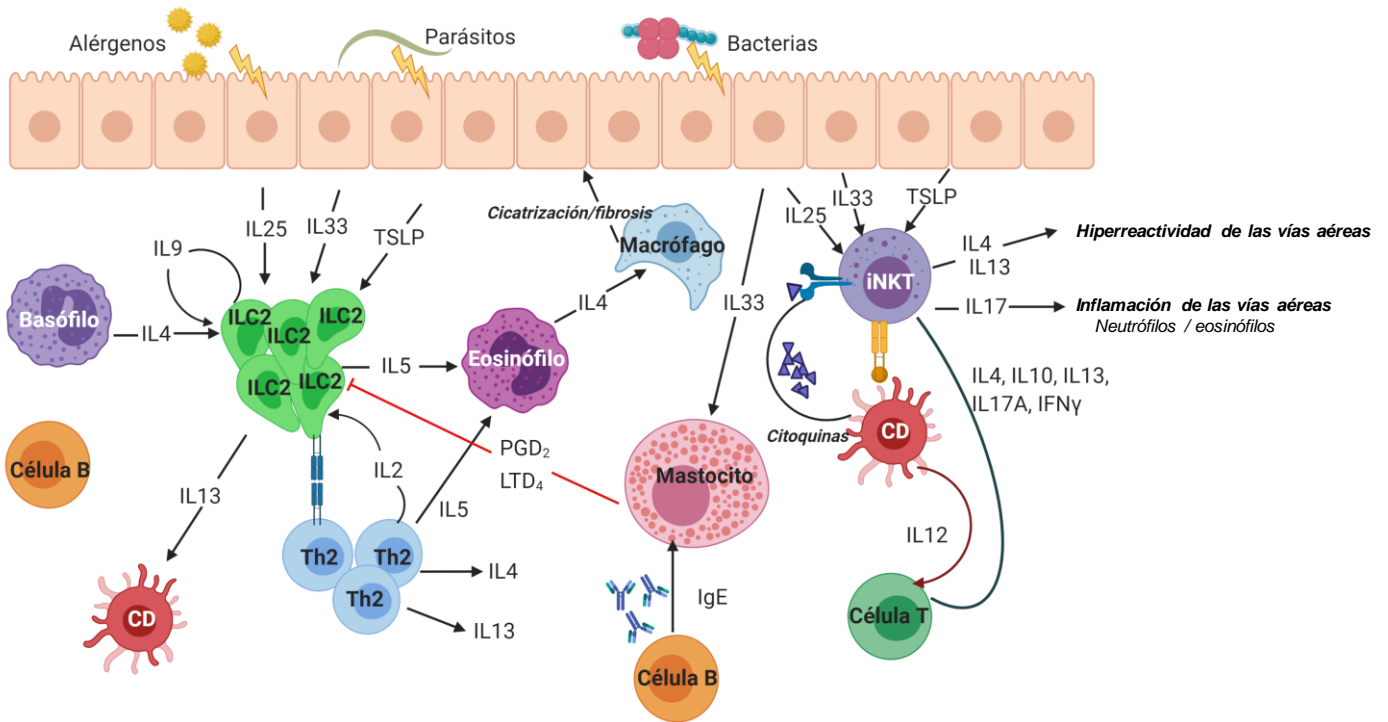


Figura 3. Papel del sistema inmune innato durante la inflamación alérgica. PG: prostaglandina; LT: leucotrieno. Figura adaptada de *Escribese MM, Gómez-Casado C, Barber D, Diaz-Perales A. Immune Polarization in Allergic Patients: Role of the Innate Immune System. J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25(4):251-258.*

1.4 Las plaquetas como integrantes fundamentales en la respuesta alérgica inflamatoria

Además de las células mencionadas anteriormente, durante los últimos años, se ha identificado un nuevo tipo celular con un papel importante en la respuesta inmunitaria y también en alergia: las plaquetas.

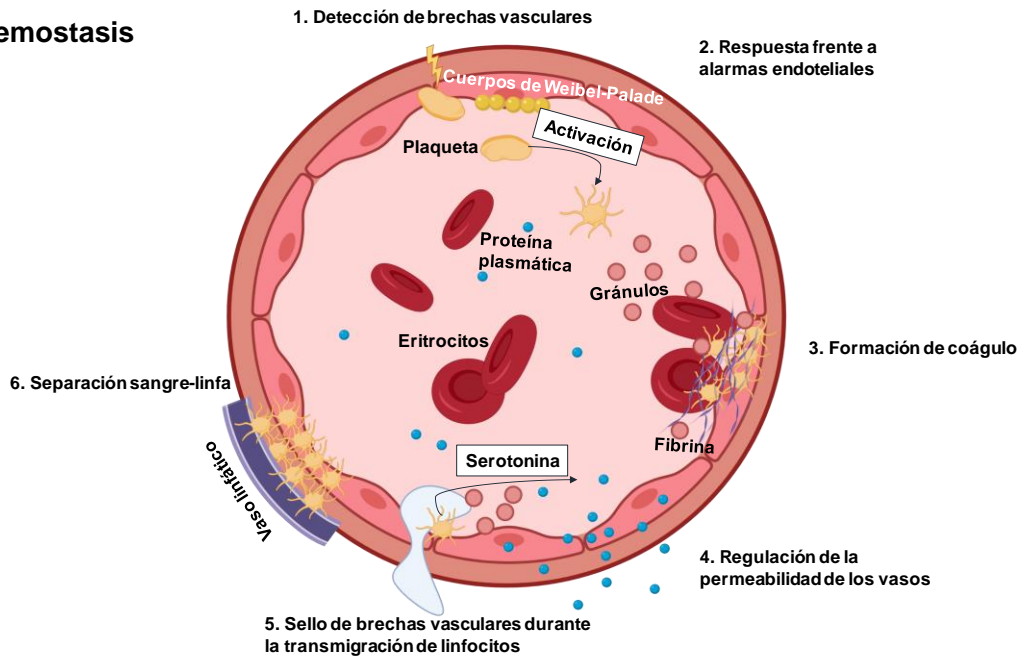
1.4.1 Biología de las plaquetas y respuesta inmune

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados derivados del megacariocito y han sido consideradas tradicionalmente como mediadores en los procesos de hemostasis y coagulación. Circulan por la sangre, examinando la vasculatura para el

mantenimiento de la homeostasis (Figura 4A). Detectan brechas vasculares y responden antes señales de peligro como el contenido de los cuerpos de Weibel-Palade, liberados por células endoteliales dañadas. Una vez activadas, son capaces de iniciar la trombosis, regulando la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Además, previenen la pérdida de eritrocitos durante la trans migración de los leucocitos y también participan en la unión linfovenosa⁹.

En los últimos años, se ha comenzado a investigar otras funciones asociadas, especialmente en el campo de la inmunología y la inflamación¹⁰. Las plaquetas pueden reconocer amenazas inmunes directamente mediante receptores de patrón conservados o indirectamente a través de señales leucocitarias, como las trampas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) o citoquinas. Por otro lado, son capaces de envolver patógenos y eliminarlos mediante su desgranulación y el reclutamiento de leucocitos, con los que además son capaces de interactuar físicamente para intercambiar señales proinflamatorias como el ácido araquidónico proveniente de los neutrófilos para sintetizar tromboxano A2 (TXA2) (Figura 4B). Además, varios estudios han demostrado su capacidad para interactuar con las células endoteliales, neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos T, por lo que podrían tener un papel importante en el desarrollo de patologías inflamatorias como la alergia⁹ (Figura 4B).

A. Hemostasis



B. Inmunidad

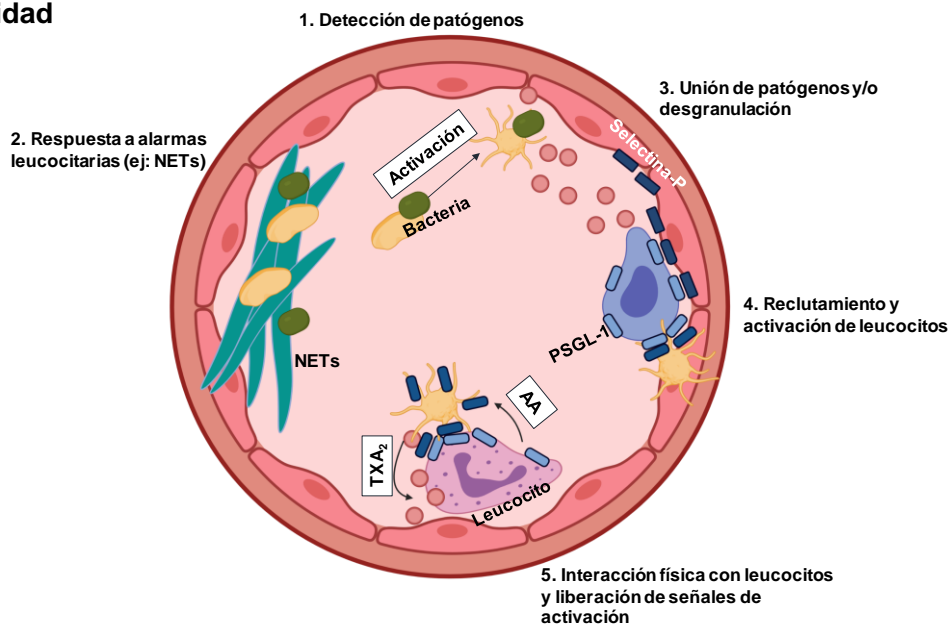


Figura 4. Principales funciones plaquetarias en homeostasis (A) e inmunidad (B). PSGL-1: Ligando-1 Selectina-P; AA: Ácido Araquidónico; TXA₂: Tromboxano A₂.

A pesar de no tener núcleo, las plaquetas tienen mitocondria, lisosomas y peroxisomas y contienen múltiples mediadores almacenados en gránulos y vesículas, que liberan al ser activadas. Por otro lado, se ha descubierto que expresan receptores de membrana para permitir la interacción con leucocitos y células endoteliales y que contienen mRNA citoplasmático, capaz de sintetizar algunas proteínas, así como miRNAs¹¹⁻¹⁵.

En cuanto a los mediadores y receptores sintetizados y/o almacenados por las plaquetas relacionados con la respuesta inmune, éstos se encuentran almacenados en tres tipos de vesículas: α -gránulos, gránulos densos y gránulos lisosomales¹⁶. Los α -gránulos son los más grandes (200-400 nm) y abundantes (\approx 60 por plaqueta). Contienen alrededor de 300 proteínas, incluyendo numerosas citoquinas, factores de crecimiento y mediadores de inflamación¹⁷ (Tabla 1). Por el contrario, los gránulos densos son más pequeños (150 nm) y menos abundantes (3-8 por plaqueta) y almacenan moléculas más pequeñas como ADP, ATP, serotonina y calcio (Tabla 1). Por último, los gránulos lisosomales son escasos y contienen proteasas y glicosidasas¹⁸.

Por último, cabe mencionarse que durante los últimos años se han publicado varios protocolos de extracción de RNA plaquetario¹⁹ que han permitido el estudio de su transcriptoma²⁰.

Tabla 1. Principales mediadores inflamatorios y receptores de membrana derivados de las plaquetas. Tabla adaptada de Gómez-Casado C, Villaseñor A, Rodríguez-Nogales A, Bueno JL, Barber D, Escribese MM. *Understanding Platelets in Infectious and Allergic Lung Diseases. Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1730.

| α -gránulos | |
|--------------------|--|
| Molécula | Función |
| PF4 (CXCL4) | Inducción de liberación interleucinas proinflamatorias en neutrófilos, monocitos y reclutamiento de células T. Diferenciación de linfocitos Th |
| Selectina-P | Molécula de adhesión: permite la interacción plaqueta-leucocito y leucocito-endotelio |
| CD40L | Superfamilia TNF: activación de CPA. Respuesta de células B. Activación de células endoteliales |
| MIP-1a (CCL3) | Interleucina: activación de neutrófilos y eosinófilos. Producción de Ig por linfocitos B |
| IL-1 β | Interleucina: involucrada en la respuesta de fase aguda. Activación de leucocitos y del endotelio |
| RANTES (CCL5) | Quimiocina: promueve el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células T |
| TGF- β | Interleucina: proliferación celular, diferenciación de células T, regulación de macrófagos y células B |
| PDGF | Factor de crecimiento: crecimiento celular y diferenciación. Diferenciación monocito/macrófago |
| VWF | Adhesión plaquetaria. Extravasación de neutrófilos |

| | |
|---------------------------------------|---|
| CD63 | Tetraspanina: proteína adaptadora transmembrana. Reclutamiento de leucocitos |
| SDF-1 | Quimiocina: quimiotaxis de células T, monocitos y neutrófilos |
| VEGF | Factor de crecimiento: angiogénesis. Expresión de moléculas de adhesión |
| Ppbp β -tromboglobulina (NAP-2) | Quimiocina: activación y reclutamiento de neutrófilos. Actividad fagocítica de macrófagos |
| Trombospondinas | Apoptosis. Inflamación de células endoteliales. Interacción plaqueta-macrófago |
| MMP-2, MMP-9 | Proteasas: ruptura de matriz extracelular. Interacción plaqueta-leucocito |
| Ciclofilina A | Factor de crecimiento vascular del músculo liso |
| CXCL1, CXCL5, CXCL7, CXCL12 | Quimiocina |
| Proteínas microbianas | Proteínas catiónicas: disrupción de membrana celular |
| Gránulos densos | |
| Molécula | Función inmunitaria/inflamatoria |
| Serotonina | Función de células dendríticas y células T |
| Glutamato | Tráfico de células T |
| Polifosfatos | Amplificación de la respuesta inflamatoria |
| ADP | Activación de plaquetas, leucocitos y células endoteliales |
| Histamina | Aumento de la reactividad de los vasos sanguíneos y desgranulación |
| ATP, fosfato, calcio | Combustible celular y cofactores en la trombosis |
| Eicosanoides | Señalizadores proinflamatorios |

1.4.2 Plaquetas y respuesta alérgica

Desde hace 50 años se han observado anomalías plaquetarias en los pacientes que sufren de alergia como cambios en el volumen medio plaquetario (tamaño promedio de las plaquetas), en el plaquetocrito (porcentaje del volumen de plaquetas sobre el volumen total de sangre) o en su vida media en pacientes asmáticos o con dermatitis atópica²¹. Estos cambios pueden estar relacionados con cambios en la activación de las plaquetas y sus funciones^{22,23}. Además, recientemente se ha demostrado que los pulmones son capaces de producir por megacariocitos residentes alrededor del 50% de las plaquetas totales²⁴, sugiriendo un posible papel de éstas en enfermedades pulmonares inflamatorias (COPD, asma). Sin embargo, muchos otros autores no han observado ninguna de estas diferencias al comparar sujetos sanos

con pacientes alérgicos^{25,26}. Los datos generados en este campo hasta la fecha no resultan concluyentes, sin embargo, sí que ponen de manifiesto la necesidad de analizar el papel de las plaquetas en la adquisición de fenotipos alérgicos graves.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, son necesarios estudios que profundicen y permitan entender los mecanismos de producción, activación e interacción con células inmunitarias de las plaquetas, especialmente en modelos de inflamación. Con el fin de aportar algo de luz a estas cuestiones, en este trabajo nos centraremos en evaluar su papel en la progresión alérgica en un modelo de pacientes con alergia respiratoria grave.

1.5 Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad alérgica

Uno de los métodos más habituales es el diagnóstico *in vivo*, que busca demostrar la reacción de hipersensibilidad en el propio paciente, siendo uno de los más frecuentemente utilizados en la práctica clínica la prueba cutánea o *Skin prick test* (SPT), capaz de identificar reacciones alérgicas inmediatas mediadas por IgE^{3,27}. Para la realización de este procedimiento se utilizan paneles de extractos alérgicos comerciales que contienen alérgenos purificados de alimentos, ciertos medicamentos y alérgenos inhalados y ocupacionales²⁸. Además de éste, encontramos otros métodos similares tales como las pruebas epicutáneas (*Patch test*)²⁹ y las pruebas de provocación oral en el caso de alérgenos alimentarios o la provocación intranasal para alérgenos inhalados³⁰.

Por otro lado, durante los últimos años han surgido nuevas técnicas de diagnóstico *in vitro* basados en la detección de IgE específica. El alérgeno unido a una base sólida se incuba con suero humano y posteriormente se añade un anticuerpo anti-IgE para detectar los positivos. Uno de estos métodos es el ImmunoCAP ISAC (Immuno Solid-phase Allergen Chip), que permite la cuantificación simultánea de IgE específica de cientos de moléculas alérgicas individuales³¹.

Como se ha mencionado anteriormente, la alergia tiene influencias tanto sociales como económicas y afecta a la vida diaria de los pacientes por lo que su correcto manejo y tratamiento es muy importante³. Puesto que la alergia es una enfermedad muy heterogénea entre pacientes, el tratamiento de la misma debe ser personalizada. Los principales tratamientos son la farmacoterapia y la inmunoterapia^{1,32}.

Conceptualmente el manejo de las alergias puede ser visto como una pirámide con 4 niveles (Figura 5):

- *Evitación del alérgeno*: es la base de la pirámide. Consiste en evitar la exposición ante el alérgeno causante de la enfermedad alérgica siempre que sea posible³³.
- *Farmacoterapia*: busca aliviar la sintomatología alérgica. Incluye entre otros, el tratamiento con antihistamínicos, glucocorticosteroides, broncodilatadores, cromonas, anti-leucotrienos y anticolinérgicos. Puesto que las enfermedades alérgicas y sus fenotipos son muy heterogéneos, se han generado muchas estrategias de manejo escalonado y muchas veces se utiliza la combinación de varios fármacos en función de la sintomatología específica que presenta el paciente^{1,32}.
- *Inmunoterapia*: pese al gran número de fármacos disponibles para el tratamiento, muchos pacientes no consiguen manejar bien su sintomatología alérgica, en estos casos se plantea el tratamiento con inmunoterapia específica para la inducción de tolerancia (Global Atlas of Allergy). Es el único tratamiento hasta la actualidad capaz de cambiar el curso de la enfermedad alérgica³⁴.
- *Tratamiento con biológicos*: que durante los últimos años ha surgido el tratamiento con biológicos, especialmente indicado para pacientes asmáticos graves, incapaces de controlar sus síntomas con la medicación habitual. Algunos de ellos son el omalizumab (anti-IgE), mepolizumab, reslizumab y benralizumab (anti-IL5) y el dupilumab (anti-IL4 e IL13)³⁵.



Figura 5. Pirámide del tratamiento de la alergia. IT: inmunoterapia

2. Inmunoterapia

Pese al gran número de fármacos disponibles para el tratamiento de la alergia, muchos pacientes no consiguen manejar bien su sintomatología alérgica, en estos casos se plantea el tratamiento con inmunoterapia específica para la inducción de tolerancia¹.

La inmunoterapia con alérgenos específicos (AIT) se ha utilizado durante 100 años como terapia desensibilizante para la alergia y tiene un alto potencial curativo y específico³⁴. Sus mecanismos incluyen cambios en el perfil de la respuesta alérgeno-específica de memoria celular T y B. Se produce un cambio de respuesta hacia un fenotipo no inflamatorio por la producción de isotipos de anticuerpos específicos, produciéndose un cambio en el equilibrio entre células Th2 alérgeno-específicas y T reguladoras (TReg), y además la disminución de la activación, migración a los tejidos y la desgranulación de células efectoras (mastocitos, basófilos y eosinófilos). Las células B alérgeno-específicas, cambian de células productoras de IgE a productoras de IgG4, que impide la activación y desgranulación de células efectoras^{1,36} (Figura 6).

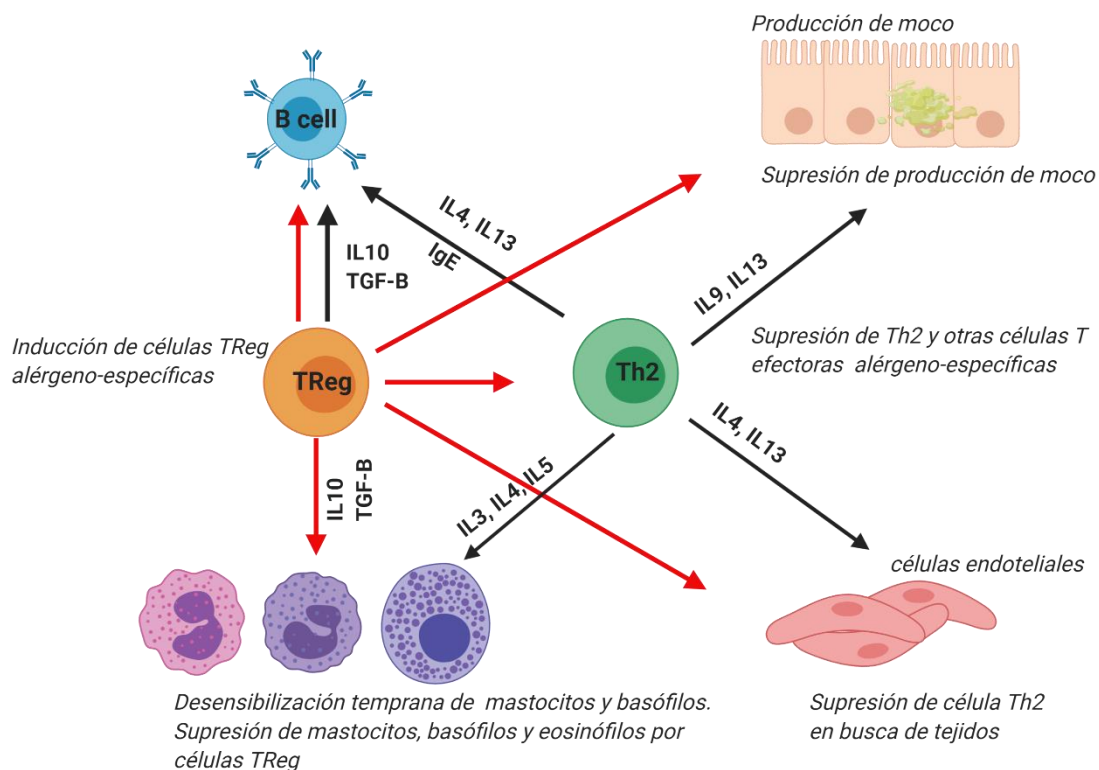


Figura 6. Mecanismo de tolerancia a largo plazo obtenido por AIT. TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante β.

A pesar de los efectos descritos anteriormente, hay mucho desconocimiento en torno a los mecanismos de la AIT, se desconocen los mecanismos moleculares de la generación de células TReg, el papel de las células residentes de tejido en la inducción de tolerancia inmune y los mecanismos moleculares involucrados en la curación espontánea, las remisiones y las exacerbaciones de la alergia. Por otro lado, no existen marcadores ni predictores moleculares tempranos que se puedan utilizar para la evaluación del tratamiento con AIT y tampoco se conocen los mecanismos por los cuales se mantiene la tolerancia frente al alérgeno a largo plazo¹.

En cuanto a las formas de administración de la inmunoterapia, existen varias, siendo las más comunes la inmunoterapia subcutánea (ITSC), la inmunoterapia sublingual (ITSL) con aeroalérgenos y veneno de himenópteros y la inmunoterapia oral (ITO) con alérgenos alimentarios. En cuanto al tiempo de tratamiento, varios estudios han demostrado que la tolerancia se suele inducir y tener un efecto mantenido a los 3-5 años de haber comenzado el tratamiento^{37,38}.

2.1 Inmunoterapia sublingual: GRAZAX®

La ITSL surgió hace aproximadamente 30 años como una alternativa a la inmunoterapia subcutánea, ya que su administración es más sencilla al ser gotas o tabletas de rápida disolución y no requiere de personal hospitalario especializado además de ser más segura^{1,39}. Además, se ha visto que tiene una gran eficacia en el tratamiento de la alergia al polen de gramíneas⁴⁰.

En este trabajo nos centraremos especialmente en la inmunoterapia sublingual para el tratamiento de la alergia respiratoria al polen de gramíneas (*Phleum pratense*), más concretamente en el estudio de los efectos sistémicos asociados al tratamiento de ITSL con Grazax®.

Grazax® es uno de los pocos tratamientos de ITSL con una eficacia clínica contrastada ya que se ha validado en más de 20 ensayos clínicos independientes^{39,41}.

En estudios previos de nuestro grupo, se ha observado que los mecanismos involucrados en su eficacia incluyen la desensibilización de células efectoras, la interferencia de inmunoglobulinas y la regulación de células B y T, observándose una disminución en el recuento de eosinófilos y los niveles de IgE por debajo de sus valores iniciales, así como la sintomatología alérgica (Figura 7). En cuanto a la eficacia

del tratamiento y la mejora clínica, se ha demostrado que su efecto mantenido se consigue al administrarlo durante al menos 3 años. Sin embargo, cuando el tratamiento es administrado solamente durante dos años, el efecto clínico desaparece rápidamente al suspender el tratamiento. Este hecho sugiere que el segundo año de intervención con ITSL puede ser un punto crítico para estudiar los mecanismos efectoros de este tratamiento^{38,42}.

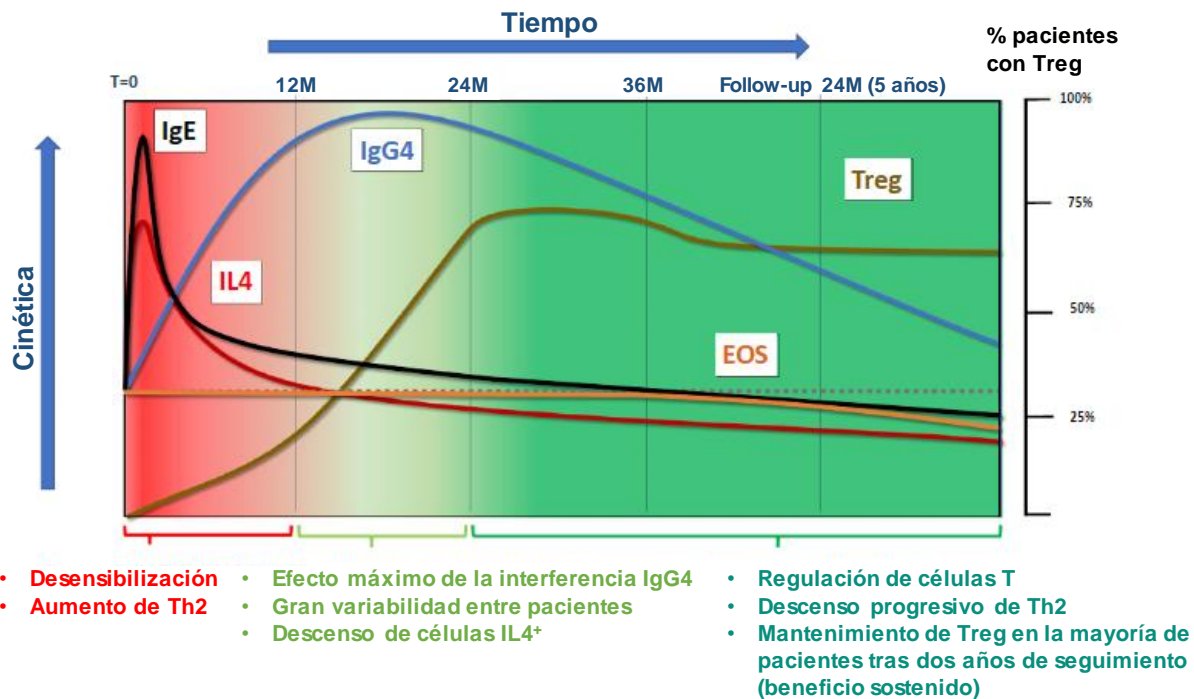


Figura 7. Mecanismos inmunológicos involucrados en el tratamiento con GRAZAX®. EOS: eosinófilos.

A pesar de su eficacia demostrada, es un tratamiento que tiene una baja dosis de cumplimiento por parte de los pacientes, debido a que es un proceso muy largo (de al menos 3 años) y que no resuelve totalmente la alergia, sino que reduce los síntomas y el uso de medicación de rescate. Además, aunque empezamos a entender los mecanismos inmunológicos involucrados en su eficacia, hoy en día no existen biomarcadores de valor predictivo ni de seguimiento del tratamiento, ya que los cambios sistémicos inducidos por ITSL son aún desconocidos.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, son necesarios estudios sobre los efectos sistémicos asociados a la ITSL para entender sus mecanismos subyacentes, la cinética de los mismos y permitir la identificación de biomarcadores que permitan predecir la eficacia de tratamiento.

3. Modelos graves

España reúne las características climáticas y geográficas necesarias para la existencia de una elevada variabilidad en la intensidad de la exposición a diversos alérgenos. En áreas de alta exposición, se ha descrito fenotipos clínicos graves de alergias respiratorias⁴³. Además existen alergias alimentarias muy frecuentes (caso de la alergia mediada por LTPs principalmente)⁴⁴ además de otros tipos como alergia (medicamentos o epitelios animales⁴⁵).

Los fenotipos graves suponen por tanto un reto para su identificación, estratificación y tratamiento, ya que además constituyen un porcentaje importante de los enfermos alérgicos (hasta el 20%)⁶ y conlleva un alto coste tanto personal como económico, con visitas a urgencias recurrentes, mala calidad de vida, mala respuesta a tratamiento y están frecuentemente asociados a comorbilidades. Sin embargo, estos fenotipos suponen un modelo ideal para entender la progresión alérgica y para identificar nuevos biomarcadores que nos permitan ser capaces de estratificar correctamente pacientes, identificar estos fenotipos y diseñar tratamientos personalizados^{46,47}.

Algunos de los fenotipos graves más estudiados en España son el de los pacientes alérgicos al polen de olivo con sensibilización a Ole e7 y gramíneas con sensibilización al panalérgeno profilina^{48,49}. En este trabajo nos centraremos en el modelo de alergia respiratoria a gramíneas con sensibilización concomitante a profilina.

Otro de los factores que contribuye a la gravedad de la respuesta alérgica es la polisensibilización, cada vez más frecuente especialmente en el caso de la alergia a pólenes, ya que el tratamiento aplicado es más complejo y el nivel inflamatorio de estos pacientes es elevado durante todo el año, al tener una exposición alérgica muy prolongada. Por el contrario, los pacientes monosensibilizados en general responden mejor a tratamientos de inmunoterapia, en el caso de la alergia a polen de gramíneas y sus niveles de inflamación suelen ser menores y acotados en el tiempo^{50,51}.

3.2 Alergia al polen de gramíneas ligada a alergia alimentaria: sensibilización a profilina como marcador de gravedad

En el caso de la alergia a gramíneas, se han descrito dos alérgenos que presentan una elevada prevalencia de sensibilización (alérgenos mayores): Phl p 1 y Phl p 5 y

se ha visto que pacientes con una alta exposición a polen de gramíneas, pueden sensibilizarse a alérgenos menores como la profilina, pan-alérgeno presente en distintos alimentos vegetales y algunos de ellos, llegan a desarrollar reacciones alérgicas graves a alimentos mediadas por profilina^{52,53}.

3.2.1 Profilina

Las profilinas son proteínas ubicuas que controlan la polimerización de la actina y están presentes en todas las células eucariotas, siendo considerado un panalérgeno. Se identificaron como alérgenos por primera vez en 1991⁵⁴. Están muy presentes en vegetales y al tener una estructura muy conservada producen múltiples positivos en el diagnóstico basado en IgE, lo que se consideran un factor de confusión en el diagnóstico de la alergia^{55,56}.

Además, algunos estudios previos, han demostrado su capacidad de inducir síntomas respiratorios al hacer una provocación oral⁵⁷. Por otro lado, debido a su labilidad frente a la temperatura y las enzimas digestivas, ha sido considerado habitualmente como un alérgeno alimentario incompleto o secundario que solo produce síntomas locales^{58,59}.

3.2.2 Profilina y alergia respiratoria

Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado que en zonas de alta exposición a polen de gramíneas ha habido aumento de la sensibilización en pacientes con alergia respiratoria a gramíneas a profilina (hasta el 60% en algunas zonas de España) y algunos de estos pacientes llegan a desarrollar reacciones alimentarias graves⁶⁰. En un estudio reciente⁴⁸ se ha visto que la progresión hacia la gravedad en estos pacientes está ligada a un aumento de la sensibilidad de células efectoras, a la infiltración de células inmunes en el epitelio de la mucosa oral y a una remodelación de la mucosa oral, sugiriendo que ésta juega un papel clave en el desarrollo de reacciones alimentarias de gravedad y en la evolución de la alergia respiratoria ligada a la alergia alimentaria (Figura 8). Sin embargo, los mecanismos sistémicos subyacentes a esta progresión alérgica son aún desconocidos.

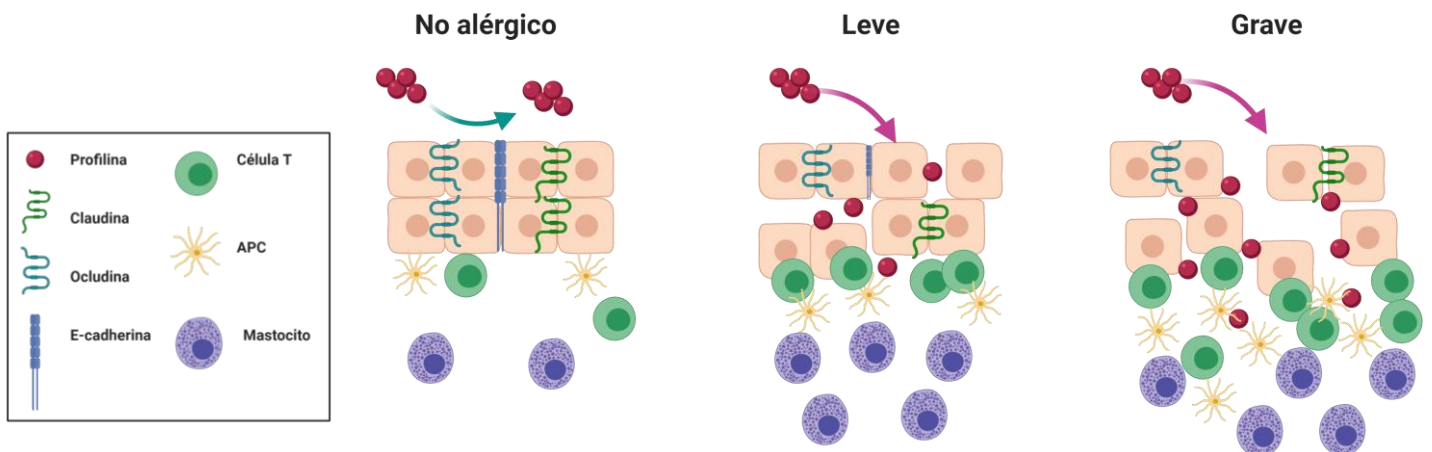


Figura 8. Remodelado de la mucosa oral en alergia respiratoria ligada a alergia alimentaria mediada por profilina. Figura adaptada de *Rosace D, Gomez-Casado C, Fernandez P, et al. Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. J Allergy Clin Immunol. 2019;143(2):681-690.e1.*

Este fenotipo de alergia respiratoria ligada a alergia alimentaria constituye un modelo ideal para entender a nivel sistémico la progresión alérgica y la inflamación de barrera epitelial asociada, pudiendo ser de utilidad para encontrar biomarcadores capaces de mejorar el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes. Estos son objetivos principales en los que nos hemos enfocado en este trabajo.

4. Microbiota y alergia alimentaria

4.1 Definición

La microbiota humana es un ecosistema muy complejo compuesto de bacterias, hongos, virus, archaea y parásitos que cohabitan en el interior del cuerpo humano, siendo las bacterias el microorganismo más abundante. Dentro de los ecosistemas microbianos presentes en el cuerpo humano, el más complejo y diverso es el del tracto gastrointestinal (TG), conteniendo alrededor de 10^9 bacterias y entre 1183 a 3180 géneros bacterianos⁶¹.

La microbiota intestinal cambia a lo largo de nuestra vida. Se cree que alrededor del 70% de la colonización primaria en recién nacidos es por vía materna⁶², es decir, existe una transferencia longitudinal, y que los primeros 1000 días de vida en los que el cuerpo se expone por primera vez a factores externos son claves en su desarrollo. Además, el desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida, se correlaciona con el desarrollo y la maduración del intestino y del sistema inmune.

Desde el momento del nacimiento, se establece una relación simbiótica entre la microbiota y las propias células del cuerpo humano, que evoluciona con el tiempo, adaptándose a los cambios⁶³. Aunque en general, la microbiota intestinal se establece a los dos o tres años de edad, su composición es dinámica y cambia por factores como la edad, la dieta, el uso de antibióticos, el estilo de vida, distintos estados patológicos y factores ambientales⁶⁴ (Figura 9).

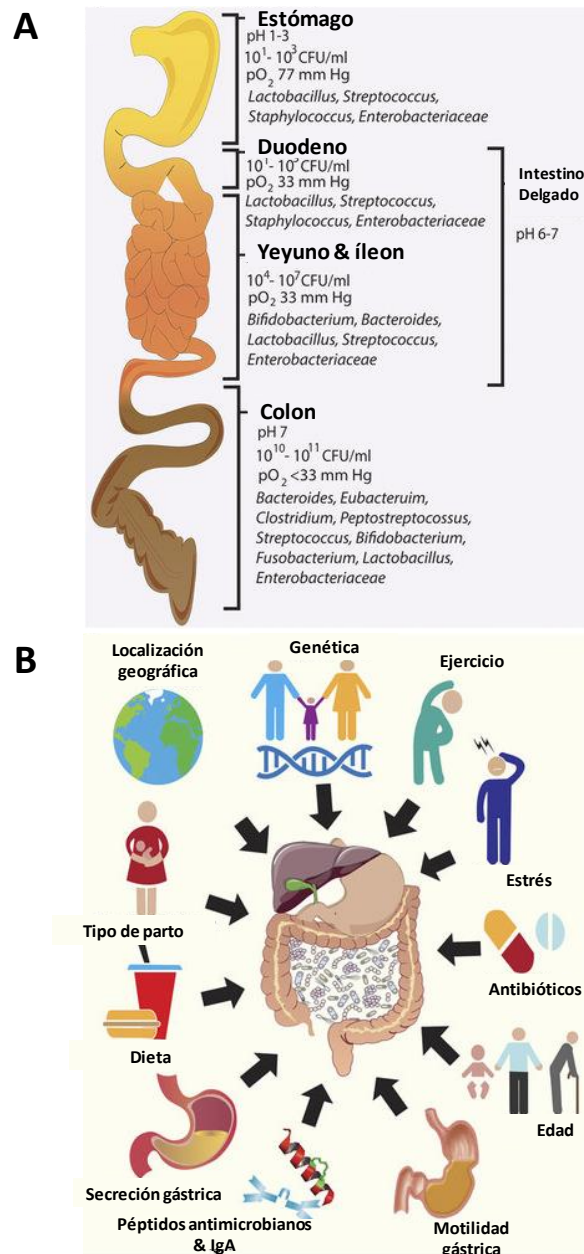


Figura 9. A. Composición de la microbiota humana en el tracto gastrointestinal. CFU: Unidad Formadora de Colonias; pO₂: Presión parcial de oxígeno **B.** Factores que afectan y varían la composición de la microbiota intestinal Figura adaptada de *Clarke, Gerard & Sandhu, Kiran & Griffin, Brendan & Dinan, Timothy & Cryan, John & Hyland, Niall. (2019). Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. Pharmacological Reviews. 71. 198-224.*

4.2 Relación con el sistema inmune

En cuanto a su papel en la respuesta inmune, alrededor del 70-80% de las células del sistema inmunitario se encuentran en el intestino delgado y grueso. La microbiota intestinal estimula y modula el sistema inmunitario mediante una regulación inmunitaria mediada por células dendríticas (CD), promoviendo la diferenciación de los linfocitos TReg mediante la activación de las CD presentes en la mucosa intestinal. Estas células activadas producen IL que activan los linfocitos T vírgenes o Th0 para su maduración hacia un subtipo de linfocito (Th1, Th2, Th17 o TReg)⁶⁵.

En personas sin patologías, existe un equilibrio entre todos los subtipos de linfocitos T y los linfocitos TReg. Varios estudios han demostrado que la aparición de respuestas de tolerancia a los alérgenos está mediada por la presencia de ciertas bacterias en el TG y se han identificado alteraciones en la microbiota intestinal en personas que sufren de rinitis, eccema atópico, asma o alergia alimentaria⁶⁶⁻⁶⁹.

4.3 Disbiosis

Los cambios y desequilibrios en la microbiota intestinal, fenómeno conocido como disbiosis, se han asociado con varias enfermedades con fenotipo inflamatorio como la obesidad^{70,71}, con la enfermedad de Chron y la colitis ulcerosa⁷²⁻⁷⁴, la diabetes tipo II^{75,76} y la alergia^{77,78}, entre otras.

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la prevalencia de las alergias se ha visto muy incrementada en las últimas décadas, siendo la alergia a la leche de vaca una de las más frecuentes en niños. En general, en torno al 80% de los pacientes que la sufren suelen adquirir tolerancia a los 4 años de edad, pero la etiología y los mecanismos de esta enfermedad son hoy en día aun desconocidos.

Además, no está claro si la disbiosis es el desencadenante de la alergia o, por el contrario, es una consecuencia de la enfermedad que altera la composición bacteriana y su funcionalidad y, por lo tanto, son necesarios estudios que aborden esta cuestión.

Por todo lo expuesto anteriormente en este trabajo, nos hemos enfocado en evaluar los cambios a nivel de composición en la microbiota intestinal en lactantes alérgicos a leche de vaca en comparación con lactantes controles y en identificar si existe un patrón disbiótico transferido longitudinalmente a lo largo de tres generaciones (abuela, madre, lactante) mediante el análisis del gen rRNA 16S.

4.4 Técnicas genómicas para el estudio de la microbiota intestinal

En cuanto al estudio de la microbiota intestinal, las heces son la matriz más representativa y además supone un método no invasivo^{79,80}. En cuanto a las técnicas para su estudio, la ómica de elección es la genómica, y más concretamente la secuenciación del gen del rRNA16S y la metagenómica *shotgun*⁸¹ (Figura 10).

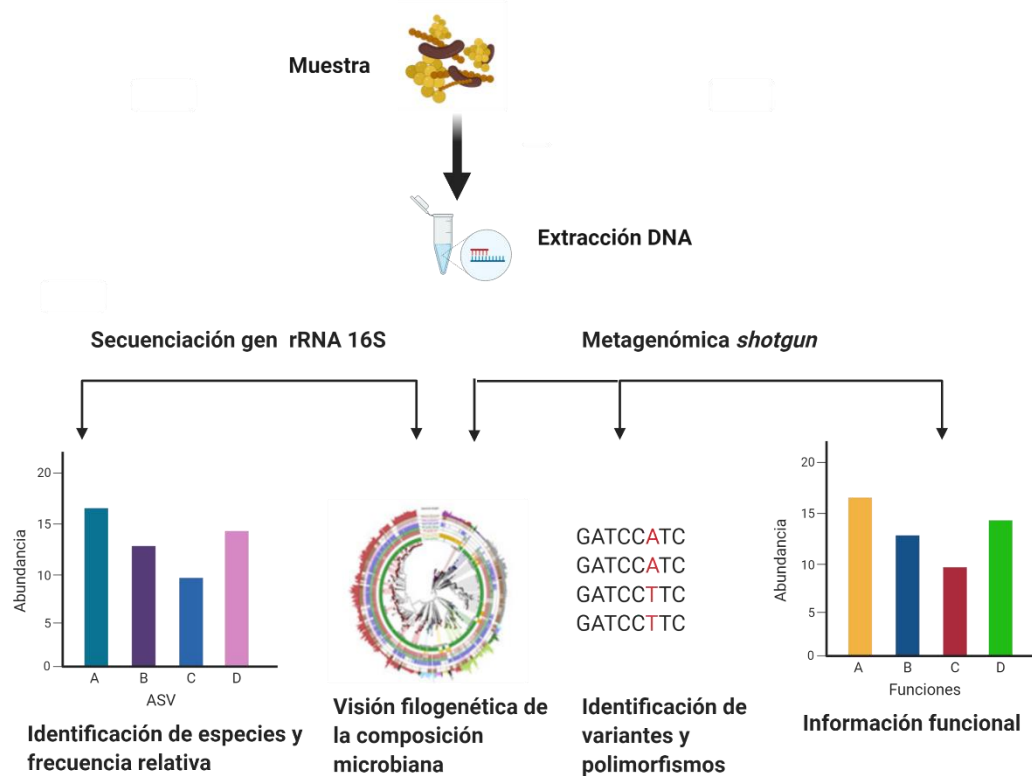


Figura 10. Comparación de las dos técnicas más utilizadas en análisis de microbiota: secuenciación del gen rRNA 16S y la metagenómica *shotgun*.

4.4.1 Secuenciación gen rRNA 16S

El RNA ribosómico (rRNA) en las bacterias tiene ciertas propiedades que lo hace muy característico: su universalidad, su actividad en funciones celulares y que posee una estructura y secuencia de nucleótidos muy conservada⁸².

Dentro del rRNA bacteriano, se distinguen tres tipos: 23S, 16S y 5S. De estos tres tipos, el rRNA 16S se ha convertido en el estándar para la clasificación taxonómica de bacterias porque su secuenciación es más sencilla y rápida y contiene una amplia información filogenética.

En cuanto a su estructura, contiene 8 regiones muy conservadas y 9 regiones variables que son las que caracterizan cada género/especie de bacteria. A estas

características se le suma el hecho de que existen muchas bases de datos que contienen las secuencias del 16S de cada especie bacteriana disponibles públicamente. Por todas estas razones, la secuenciación del gen del rRNA 16S es la aproximación más usada para la identificación taxonómica de especies bacterianas en el estudio de la microbiota⁸³⁻⁸⁶.

En general, el *workflow* a seguir en este procedimiento se compone primeramente de la obtención de la muestra (heces en el caso de la microbiota intestinal), la extracción del DNA de la muestra mediante kits comerciales, posteriormente la selección de los oligos específicos del gen rRNA 16S y por último la secuenciación y el análisis bioinformático. Este último paso incluye la detección de quimeras, el filtrado y la normalización de los datos, la identificación taxonómica de Operational Taxonomic Units (OTUs) o Amplicon Sequence Variants (ASVs) y el análisis de diversidad de la microbiota^{81,87} (Figura 11).

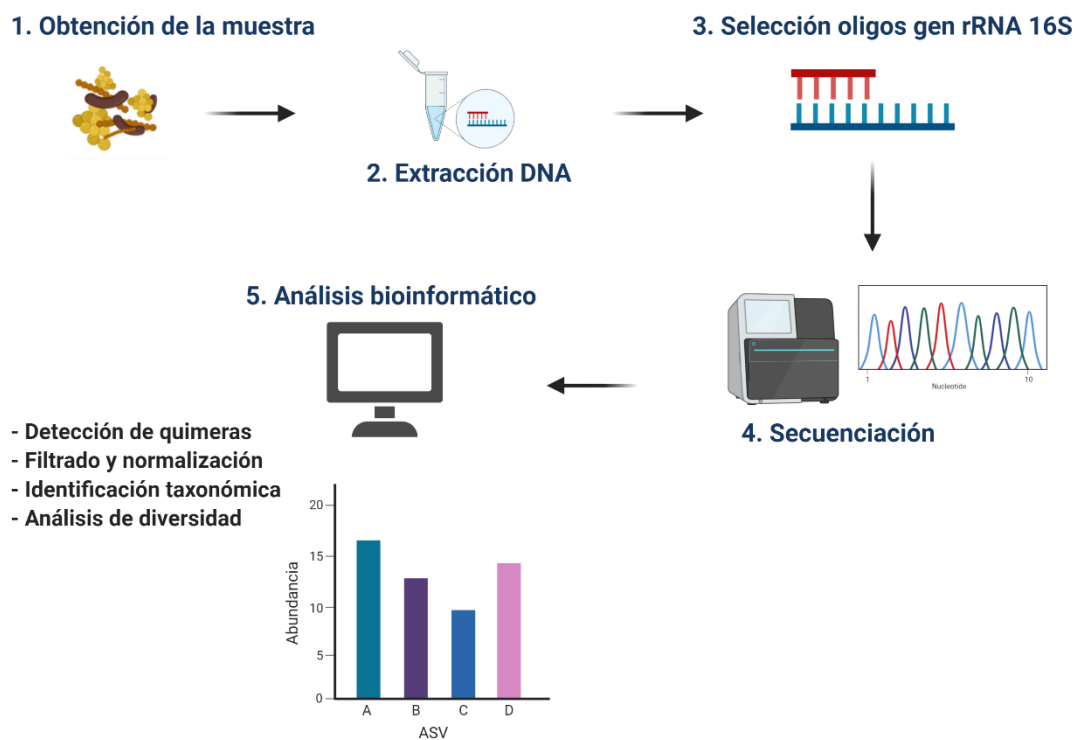


Figura 11. Flujo de trabajo seguido en la técnica de secuenciación del gen rRNA 16S.

5. Biomarcadores en la enfermedad alérgica

Hasta aquí hemos hablado de la enfermedad alérgica, la respuesta inmune asociada, su incidencia, tratamiento y sus distintos fenotipos. Sin embargo, se hace necesario identificación de biomarcadores para diagnosticar y estratificar a los pacientes según su gravedad, evaluar y predecir la respuesta a tratamiento y hacer un seguimiento personalizado de cada caso.

5.1 Medicina personalizada

La medicina personalizada o medicina de precisión se define como la adaptación de la prevención, el diagnóstico y el tratamiento a las características específicas de cada paciente, obteniendo el mejor resultado para cada paciente y además mejorando la rentabilidad de las intervenciones⁸⁸. Para su implementación en la práctica clínica se requiere un profundo conocimiento de los mecanismos subyacentes a la alergia y de la heterogeneidad de los distintos fenotipos y es necesaria la identificación de biomarcadores⁸⁹.

Un biomarcador se define como una entidad biológica (molécula, estructura o proceso biológico) que puede ser utilizada para predecir y/o identificar el estado (sano/enfermo) de células, tejidos o individuos. Hoy en día, la mayoría de los biomarcadores disponibles son marcadores moleculares (genes, metabolitos y proteínas) que pueden ser usados para el diagnóstico, pronóstico y la predicción de respuesta a un determinado tratamiento⁹⁰. Un biomarcador robusto debe ser fácilmente cuantificable y estar respaldado por resultados científicos que demuestren su eficacia.

La identificación de nuevos biomarcadores útiles para la práctica clínica requiere de modelos clínicos con un rango de fenotipos estratificados por gravedad, incluyendo fenotipos graves bien establecidos para poder entender la progresión de la enfermedad y validar la utilidad de los biomarcadores. Además, se debe tener en cuenta la matriz biológica (sangre, plasma, suero, heces, etc.) en la que el biomarcador es cuantificado. Estas matrices deben ser sencillas de obtener, almacenar y manipular. Por último, en el caso de enfermedades multifactoriales como la alergia, es muy improbable que un único biomarcador represente adecuadamente la complejidad de los mecanismos subyacentes, siendo necesario el desarrollo de paneles con varios biomarcadores⁴⁶.

Durante los últimos años muchos grupos de investigación en el campo de la alergia se han centrado en la identificación de biomarcadores aplicables a la práctica clínica. Hoy en día, existen varios marcadores de inflamación alérgica identificados y habitualmente utilizados en la clínica como los niveles de IgE, la eosinofilia o el óxido nítrico espirado, sin embargo, existe cierta controversia respecto a su utilidad en el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento de la alergia^{46,91,92}. Por otro lado, se han identificado también genes, proteínas y metabolitos como candidatos a biomarcadores, pero en general presentan distintas limitaciones como que no son lo suficientemente robustos, requieren una tecnología muy sofisticada y costosa, no disponibles habitualmente, por lo que no son viables en la práctica clínica habitual. Además, la mayoría de las veces los datos se obtienen de modelos clínicos en los que los pacientes no están bien caracterizados y por lo tanto fallan en la validación en cohortes de mayor tamaño, por lo que hoy en día sigue existiendo una clara necesidad de biomarcadores en el campo de la alergia.

5.2 Nuevas aproximaciones para la identificación de biomarcadores: las ciencias ómicas

En las últimas décadas, los avances en bioinformática, así como el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento (*high-throughput*), han contribuido al avance de las ciencias ómicas para el estudio de enfermedades multifactoriales^{93–95}. Dentro de este grupo de ciencias se engloban distintas disciplinas como la genómica (estudio del genoma y su función), la transcriptómica (estudio del mRNA y la expresión génica), la proteómica (estudio de la estructura, función, localización e interacción de las proteínas) y la metabolómica (estudio de los metabolitos y productos metabólicos) (Figura 12).

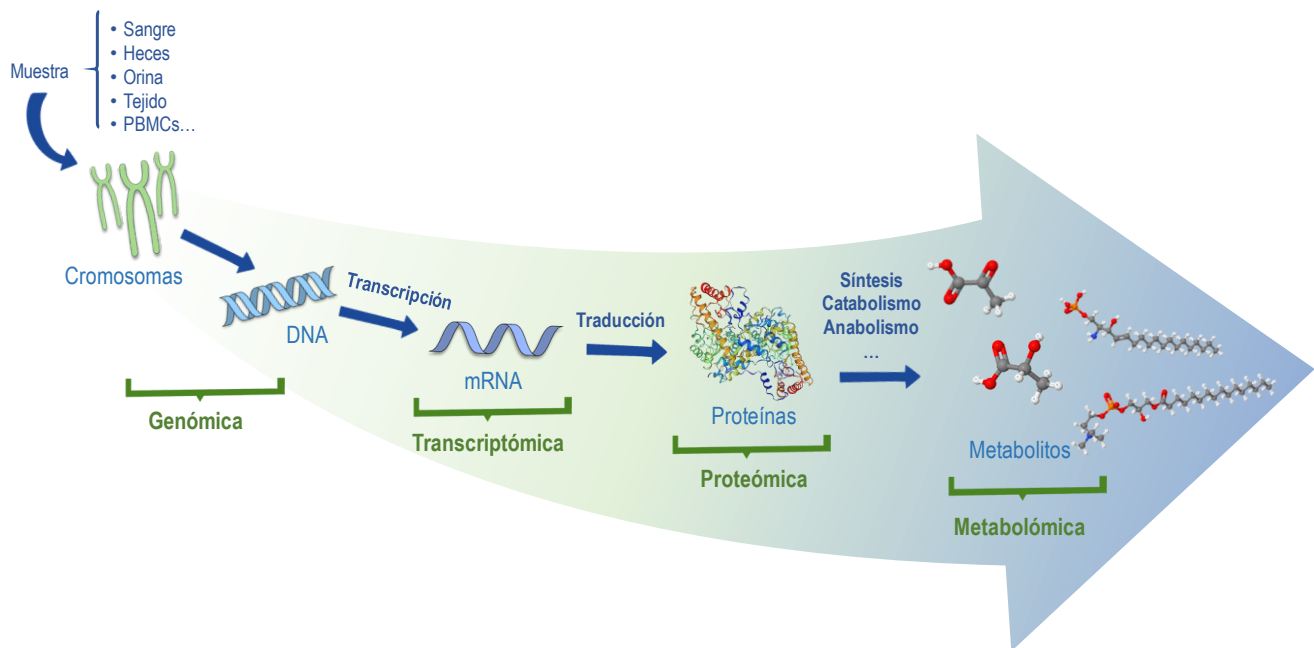


Figura 12. Principales ciencias ómicas: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Figura adaptada del MOOC EAACI sobre ciencias ómicas.

La integración de estas técnicas es lo que se denomina biología de sistemas y se basa en el hecho de que un sistema complejo (como una enfermedad multifactorial) puede ser entendido en profundidad si se considera como un todo compuesto de varias capas. La biología de sistemas, así como los experimentos ómicos se diferencian de los estudios tradicionales basados en hipótesis iniciales en que son métodos holísticos, por lo que no es necesario una hipótesis de partida sino que todos los datos que se obtienen y analizan permiten formular esas hipótesis para ser validadas en experimentos futuros⁹⁶.

5.3 Ciencias ómicas: transcriptómica

La transcriptómica es la ciencia ómica cuyo objetivo es detectar y cuantificar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de genes específicos. En comparación con el genoma, el transcriptoma es mucho más dinámico ya que hay procesos de transcripción continuamente que reflejan la actividad de las células y sus respuestas ante determinados estímulos. Actualmente, gracias al avance de las técnicas analíticas, la transcriptómica es la “capa” ómica con la mejor cobertura analítica. Las técnicas transcriptómicas más usadas a día de hoy son la PCR cuantitativa (qPCR), los microarrays y las secuenciaciones de nueva generación (next generation sequencing, NGS) como el RNA-Seq⁹⁷⁻⁹⁹.

Hipótesis

El uso de estrategias ómicas como la transcriptómica aplicada a distintas matrices biológicas (CMSP, plaquetas, heces...) permite la identificación de nuevos biomarcadores útiles en el campo de las enfermedades alérgicas para la clasificación de pacientes según su gravedad, para la monitorización de tratamiento (respuesta a AIT) o la identificación de procesos biológicos subyacentes (por ejemplo: papel de las plaquetas en la evolución a una alergia grave, o la relación entre la microbiota y la alergia alimentaria)

Objetivos

1. Evaluar mediante técnicas transcriptómicas el papel que juegan las plaquetas en el desarrollo y progresión de la alergia utilizando diferentes modelos de gravedad alérgica: un modelo de alergia respiratoria ligado a alergia alimentaria y un modelo de alergia respiratoria en ausencia de alergia alimentaria.
2. Analizar el perfil transcriptómico asociado al tratamiento con inmunoterapia sublingual a *Phleum pratense* (GRAZAX)
3. Identificar cambios en la microbiota intestinal de lactantes con alergia a proteína de leche de vaca y evaluar si esas alteraciones son transmitidas de manera longitudinal entre madres e hijos.

CAPÍTULO I: BIOMARCADORES ASOCIADOS CON FENOTIPOS ALÉRGICOS GRAVES: EL PAPEL DE LAS PLAQUETAS

Materiales y Métodos

1.Reclutamiento de pacientes

Para este proyecto se incluyeron sujetos de distintas áreas geográficas españolas y con distintas sensibilizaciones alérgicas.

Por un lado, para la primera fase de este estudio (Fase I), 25 sujetos con un rango de edad de 18 a 55 años fueron reclutados el Servicio de Alergia de cuatro hospitales: Hospital Universitario de La Princesa (Madrid), Hospital Universitario Clínico San Carlos (Madrid), Hospital HM Sanchinarro (Madrid) y Hospital Virgen del Puerto (Plasencia, Extremadura), entre enero de 2013 y enero de 2016.

Por otra parte, en una segunda fase (Fase II), se incluyeron un total de 10 sujetos en colaboración con el Servicio de Alergología y el Servicio de Hematología del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda (Madrid) entre octubre de 2018 y marzo de 2020.

Todos los sujetos incluidos en la Fase I y Fase II del proyecto fueron informados de las características del estudio y riesgos potenciales del proyecto y firmaron el consentimiento informado antes de su participación. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de todos los hospitales.

2.Características clínicas de los pacientes

En la Fase 1 de los 25 sujetos reclutados, 6 fueron sujetos sanos sin historial clínico de reacciones alérgicas (controles no alérgicos de ahora en adelante) y 19 pacientes alérgicos. Se reclutaron pacientes de Madrid, expuestos a niveles moderados de polen de gramíneas (*Phleum pratense*), ciprés (*Cupressus sempervirens*), olivo (*Olea europeae*) y plátano de sombra (*Platanus hispánica*) principalmente y pacientes de la zona de Plasencia (Cáceres, Extremadura) expuestos a altos niveles de polen de gramíneas^{49,56,100,101}.

La Fase II consistió en un estudio piloto para la evaluación del papel de las plaquetas en el desarrollo de fenotipos graves de alergia. En él se incluyeron 3 controles no alérgicos y 7 pacientes alérgicos residentes en la Comunidad de Madrid y por lo tanto expuestos a niveles moderados de los pólenes mencionados anteriormente (Figura 13).

La historia clínica de los sujetos se estableció mediante una exhaustiva entrevista personal, recogiendo datos demográficos como la edad y el sexo, datos de sintomatología alérgica incluyendo la época en la que se reportan dichos síntomas y también datos asociados a la medicación administrada habitualmente.

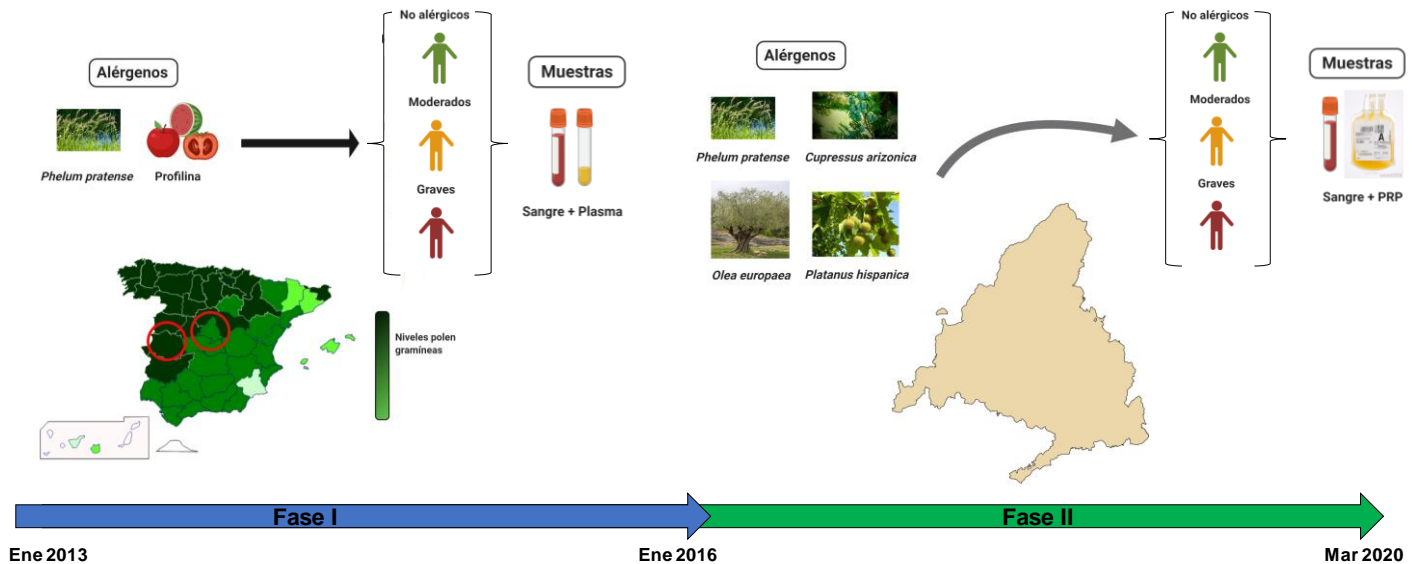


Figura 13. Diseño del estudio. Fase I: pacientes con alergia respiratoria ligada a alergia alimentaria. Fase II: pacientes con alergia respiratoria.

2.1 Criterios de inclusión y de exclusión pacientes alérgicos Fase I

Se incluyeron pacientes con un historial clínico de alergia a polen de gramíneas y que además presentaban sensibilización al pan-alérgeno profilina. Estos pacientes obtuvieron un diagnóstico Skin Prick Test (SPT) positivo para gramíneas y profilina, pero negativo para LTPs, además presentaban IgE específica positiva para profilina (> 0.35 kU / L) y negativa para Pru p 3 y Bet v 1 medida mediante las técnicas ImmunoCAP e ISAC CAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). En cuanto a los criterios de exclusión, no fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes alérgicos que habían recibido tratamiento de inmunoterapia con extracto de polen durante los últimos 5 años o que estaban sensibilizados a LTPs.

2.1.1 Provocación oral con Profilina

Los pacientes reclutados en la Fase I fueron sometidos a una provocación oral con profilina pura, purificada de polen de palmera datilera, entre septiembre y marzo, fuera de la estación polínica de gramíneas, de acuerdo con el protocolo desarrollado por Alvarado et al⁶⁰.

Se utilizaron viales de 2 ml y dosis con concentraciones crecientes de profilina (Pho d 2) de 0.074, 0.74, 7.4, 74 y 740 µg/ml y placebo.

Los pacientes alérgicos recibieron 9 dosis en serie de profilina, mientras que los pacientes no alérgicos recibieron 2 dosis. La provocación se inició administrando una dosis de placebo. Una segunda dosis de placebo fue intercalada con la dosis activa combinada de forma aleatorizada entre las dosis 2 y 7. Se administraron dosis sucesivas cada 20 minutos hasta alcanzar la dosis final o hasta el momento en el que empezaban a manifestar alguna reacción clínica, local o sistémica.

La prueba se consideró positiva cuando se manifestó al menos uno de los siguientes síntomas. Síntomas objetivos: edema de la úvula, urticaria, angioedema, síntomas respiratorios con disminución del volumen espiratorio forzado (FEV1), síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea). Síntomas subjetivos: dolor abdominal, prurito oral y disnea sin disminución asociada del FEV1, o a demanda de los pacientes. Las reacciones secundarias ocasionadas durante las pruebas de provocación se trataron con antihistamínicos, corticoides, medicamentos beta-agonistas o adrenalina. La información de las reacciones producidas durante el procedimiento, así como la medicación utilizada para tratarlas está recogida en la Tabla 3.

2.2 Criterios de inclusión y de exclusión pacientes alérgicos Fase II

En esta fase, se incluyeron pacientes con historial clínico de reacciones alérgicas a aeroalérgenos sin reactividad cruzada con alérgenos alimentarios. Se incluyeron pacientes con SPT positivo a al menos uno de los siguientes aeroalérgenos: *Phleum pratense*, *Olea europaea*, *Cupressus arizonica* o *Platanus hispánica*. No fueron incluidos aquellos sujetos que hubieran sido tratados con inmunoterapia o biológicos en la fecha de inclusión en el estudio.

2.3 Criterios de inclusión para plaquetoaféresis

Los sujetos incluidos en la Fase II eran sometidos a un procedimiento de plaquetoaféresis. Los criterios de inclusión en este protocolo fueron: ser mayor de 18 años, tener un peso mayor o igual a 50 kilogramos, y tener una concentración de plaquetas circulantes y valores de hemoglobina dentro de la normalidad (150 a 400×10^9 plaquetas/L y en el caso de la hemoglobina, 138 a 172 g/L para hombres y 121 a 151 g/L para mujeres).

Se excluyeron de este procedimiento aquellos individuos que hubieran realizado prácticas sexuales de riesgo o tomado medicamentos en la última semana y a aquellos que padecieran alguna enfermedad infecciosa tales como el Virus de la hepatitis C, el virus de hepatitis B, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o Sífilis.

3. Análisis transcriptómico

Se realizó un análisis a nivel transcriptómico de distintos tipos celulares: células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Fase I) y plaquetas (Fase II), utilizando la técnica de microarrays. Brevemente, tras la obtención de las muestras, se extrajo su RNA y se analizó su calidad e integridad. Aquellas muestras consideradas aptas fueron seleccionadas para la hibridación con microarrays. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos y en última instancia se realizó una validación experimental de los mismos mediante PCR cuantitativa (qPCR) (Figura 14).

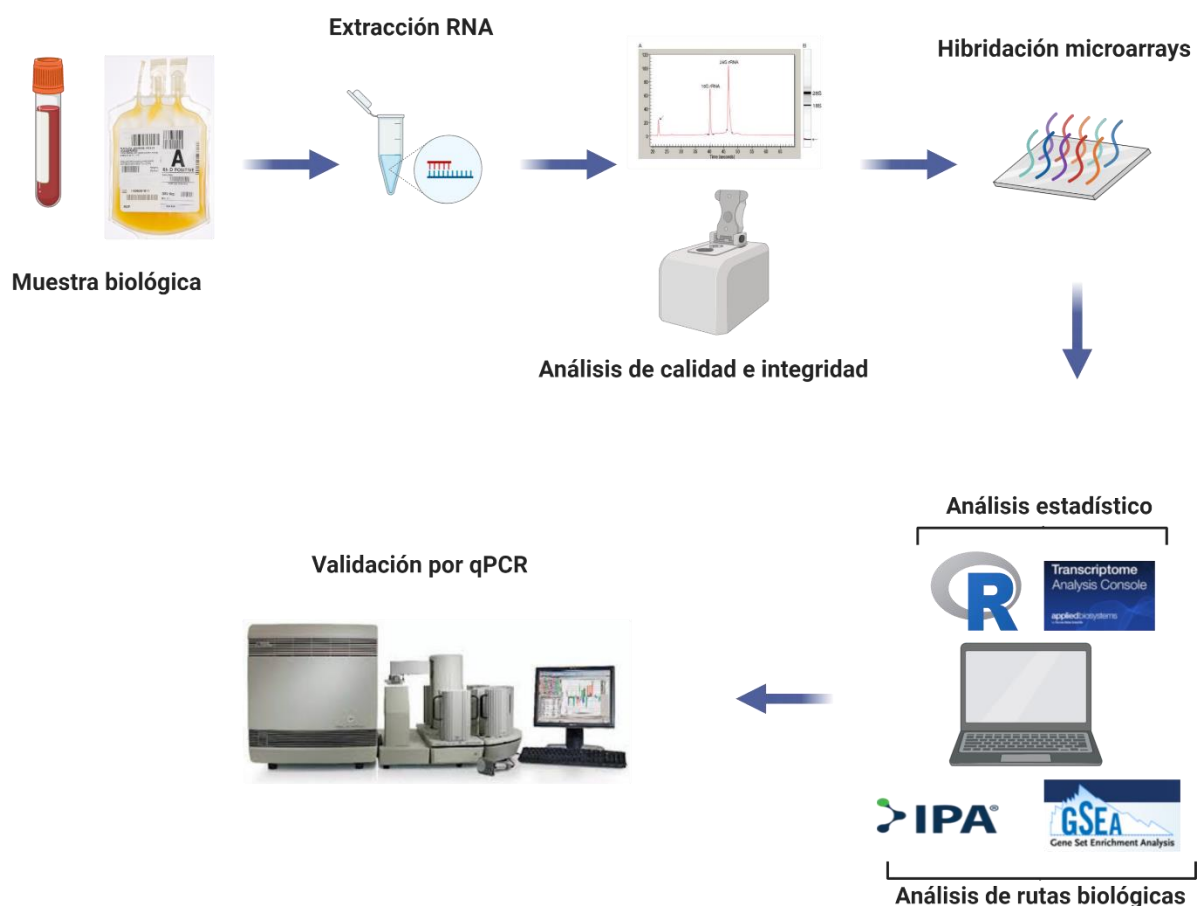


Figura 14. Flujo de trabajo para el análisis transcriptómico mediante la técnica de microarrays.

3.1 Recogida de muestras biológicas Fase I

Previamente a la provocación oral con profilina, se obtuvo una muestra de sangre total de aproximadamente 20 ml de cada uno de los individuos participantes. Esta sangre fue procesada para obtener plasma y CMSP utilizando un gradiente de centrifugación con Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare™).

3.2 Obtención de plasma

Brevemente, el volumen de sangre total destinado a la obtención de plasma (aproximadamente 4 ml) se introdujo en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos. Al terminar la centrifugación, se alicuotó la parte superior correspondiente al plasma en tubos con rosca de 5 ml y se congeló a -80°C hasta los análisis posteriores (análisis metabólico e ImmunoCAP ISAC).

3.3 Obtención de CMSP

El volumen restante de sangre (aproximadamente 16 ml) fue usado para realizar una gradiente de centrifugación con Ficoll.

La sangre se diluyó 1:1 con medio RPMI (Life technologies) en un tubo Falcon de 50 ml. Por otro lado, se prepararon dos tubos Falcon de 50 ml con 1/2V de Ficoll (8 ml aproximadamente). El volumen total de sangre diluida en RPMI se repartió equitativamente en los dos tubos de Ficoll. Para ello, se añadió 1/2V de la sangre diluida, con extremo cuidado (gota a gota, con flujo lento y constante) sobre el Ficoll contenido en cada tubo. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 15 minutos sin aceleración ni deceleración. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió el halo blanquecino conteniendo las CMSP de ambos tubos y se depositó en nuevos tubos Falcon de 15 ml. Posteriormente, se realizaron 3 lavados celulares resuspendiendo el pellet celular en 5 ml de PBS 1x y centrifugación a 1600 rpm durante 5 minutos. De la última resuspensión con PBS, se tomó una muestra y se diluyó 1:1 con el reactivo azul tripán (Sigma-Aldrich) para determinar el número de células total con Cámara de Neubauer.

Finalmente, uno de los pellets (10×10^6 células aproximadamente) se resuspendió en 900 μ l de FBS + 100 μ l de DMSO y se congeló en un criotubo en nitrógeno líquido como reserva para futuros experimentos. Por otro lado, el pellet restante se lisó en 360 μ l de RLT (QIAGEN) con β -mercaptoetanol (número de células $< 10 \times 10^6$) o en

500 μ l (número de células $> 10 \times 10^6$) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que permaneció congelado a -20°C hasta la posterior extracción de RNA.

3.4 Extracción RNA de CMSP

El RNA se extrajo de las muestras lisadas en RLT utilizando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen) con un paso adicional de tratamiento con DNasa para eliminar cualquier contaminación por DNA. (Figura 15).

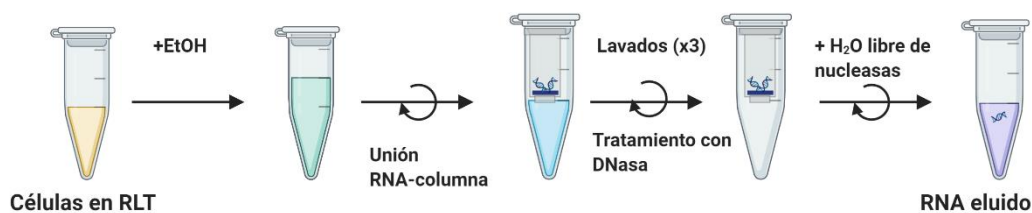


Figura 15. Esquema del proceso de extracción de RNA con RNeasy Mini Kit.

3.5 Recogida de muestras Fase II: plaquetoaféresis

Los sujetos incluidos en el estudio fueron citados para acudir a la Unidad de Hemoterapia no Transfusional (UHNT) del Hospital Universitario Puerta de Hierro – Majadahonda para someterse a un proceso de aféresis plaquetaria. Los individuos se posicionaban en sedestación y se extraía una primera muestra de sangre con la cual se realizaba un hemograma para descartar alteraciones. Una vez se confirmaba que no había contraindicaciones, se procedía a conectarlos al equipo de aféresis Trima Accel (Terumo BCT), que se programó para obtener un volumen final de 50 ml de PPP y 85 ml de PRP en bolsas Transfer pediátricas (Grifols) con conector estéril (TCS, Terumo BCT) mediante un proceso clásico de plaquetoaféresis usando como anticoagulante ACD-A (Ácido-Citrato-Dextrosa-Adenina). El procedimiento tenía una duración aproximada de 30 minutos, obteniéndose como resultado una bolsa con 80 ml de Plasma Rico en Plaquetas (PRP), una bolsa de 60 ml de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) y un cono leucocitario. Tanto el PRP como el PPP se dejaron reposar a temperatura ambiente 2 horas y se les realizó el correspondiente control de calidad para asegurar que no existía contaminación por otros grupos celulares no deseados y que la concentración de plaquetas en el caso del PRP era de al menos 1×10^9 plaquetas/ml.

Para los análisis transcriptómicos únicamente se utilizó el PRP.

3.6 Obtención de plaquetas

Se trasvasó un total de 42 ml de PRP a tres tubos Falcon de 15 ml previamente numerados y pesados en balanza de precisión (14 ml de PRP por tubo). Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y sin deceleración. Al finalizar la centrifugación, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover el pellet formado y se pesaron nuevamente los tubos para calcular el peso del pellet obtenido. Finalmente, se resuspendió el pellet plaquetario en TRIzol (Invitrogen), añadiendo 1 ml de TRIzol por cada 100 mg de pellet.

El pellet ya resuspendido en TRIzol se almacenó en tubos de 2 ml a -80°C hasta la posterior extracción de RNA.

3.7 Extracción de RNA plaquetario

Para la obtención de RNA se adaptó el protocolo descrito por Amisten¹⁹.

Brevemente, se llevó a cabo una extracción TRIzol/Cloroformo, añadiendo 200 µl a cada tubo con TRIzol y centrifugando a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Al finalizar la centrifugación, se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo glucógeno puro, que se utilizó como carrier de RNA. Finalmente, se añadieron 500 µl de Isopropanol y se dejó toda la noche congelado a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron nuevamente los tubos a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C, se retiró todo el líquido, quedándonos únicamente con el pellet de RNA y los pellets de RNA del mismo sujeto se combinaron haciendo pool de todos los pellets en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con un volumen total de 1 ml de Etanol 75%. Se realizó una nueva centrifugación a 7.500 g durante 10 min a 4°C y se retiró el sobrenadante al máximo, dejando el pellet de RNA lo más seco posible. Una vez el pellet estaba seco, se disolvió en 30 µl de agua libre de nucleasas y se procedió a su purificación con el kit MinElute Cleanup (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8 Cuantificación y calidad del RNA

La concentración del RNA se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c.

La calidad del RNA se determinó de acuerdo a los siguientes parámetros. Los ratios 260/280 y 260/230 obtenidos con NanoDrop que indican contaminación por proteínas y por sales respectivamente. Además, el resultado de un análisis adicional realizado

con Experion RNA StdSens analysis kit (Bio-Rad). Este análisis consiste en una electroforesis capilar que te permite determinar la integridad y pureza de tu RNA mediante el Rna Quality Indicator (RQI), calculado mediante un algoritmo que compara el electroferograma de las muestras de RNA con electroferogramas estándar de muestras de RNA degradadas, devolviendo un número que va desde 1 (RNA degradado) a 10 (RNA totalmente íntegro) para cada muestra. Solamente se consideraron muestras íntegras y, por lo tanto, aptas para los siguientes experimentos con microarrays, aquellas que obtuvieron un RQI ≥ 7 .

3.9 Hibridación con microarrays

Se analizó el perfil transcriptómico de todas las muestras usando los arrays GeneChip Human Gene 2.1 ST de Affymetrix (Thermo Fisher Scientific). Se siguió el procedimiento descrito en el GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit manual: Se mezclaron 100 ng de RNA de cada muestra con un control de RNA Poly-A. Posteriormente, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) de doble cadena y éste sirvió como base para generar el RNA complementario (cRNA) mediante una reacción de transcripción *in vitro* (IVT). Una vez obtenido el cRNA, se generó a partir de él un cDNA de cadena simple por transcripción reversa (RT). Después, este cDNA de cadena simple se fragmentó con las enzimas UDG y APE1 y se marcó con TdT utilizando el reactivo "DNA labeling Reagent" que estaba unido covalentemente a biotina. Este cDNA fragmentado y marcado es el que finalmente se hibridó durante 20 horas a 48°C en los strips GeneChip Human Gene 2.1 ST (4 muestras por cada strip). Tras la hibridación, los strips se lavaron para eliminar uniones inespecíficas y se tñieron para obtener los archivos finales .CEL y .DAT. Todo esto se realizó utilizando el escáner y la estación de lavado incluidos en el GeneAtlas System (Thermo Fisher Scientific). El protocolo se describe en la Figura 16. Los datos en crudo de los resultados obtenidos en la Fase I del estudio se pueden encontrar en la base de datos del NCBI GEO con los número de acceso GSE114707. Los datos en crudo de los resultados obtenidos en la Fase II se depositarán una vez realizada su validación.

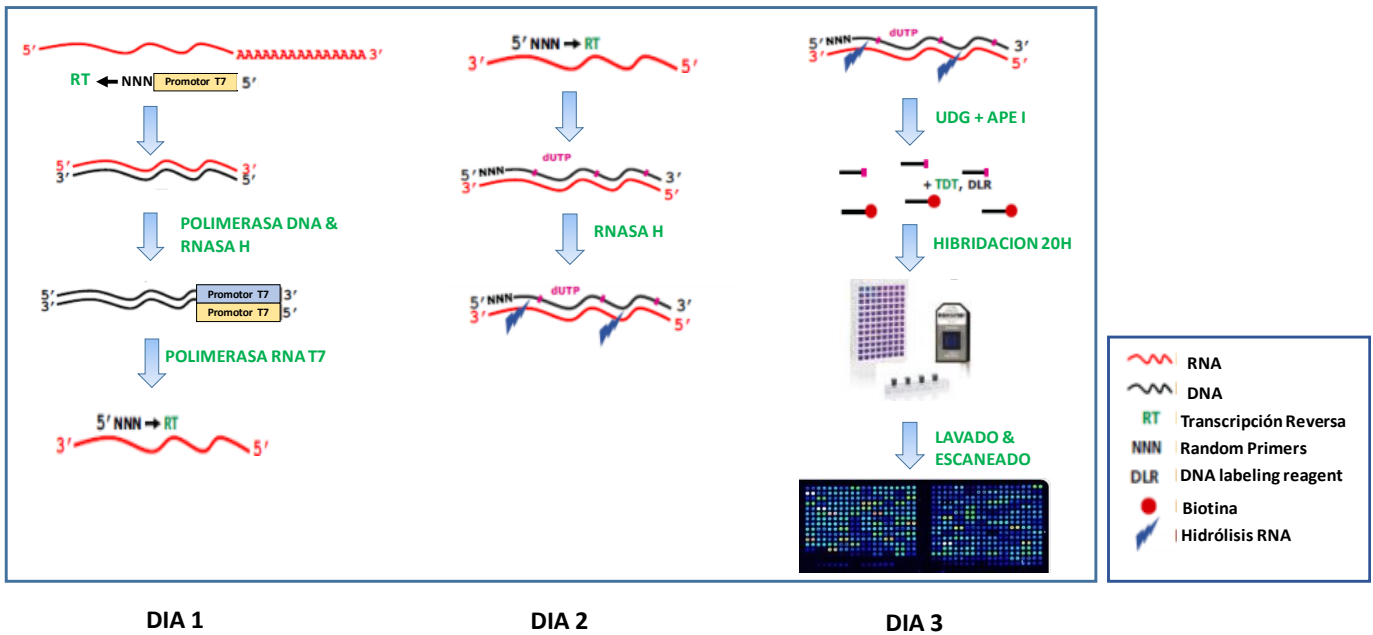


Figura 16. Procedimiento de amplificación y marcate WT Plus. Figura adaptada del manual: *GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit Manual Target Preparation for GeneChip™ Whole Transcript (WT) Expression Arrays.*

3.10 Análisis estadístico

3.10.1 Preprocesamiento

Con el objetivo de hacer comparables las distintas muestras hibridadas, se realiza un preprocesamiento de los datos. Este preprocesamiento involucra distintos pasos de entre los cuales los más importantes son la corrección del fondo, la normalización y sumarización de los datos. En nuestro caso, se llevó a cabo aplicando el algoritmo Robust Multi-Array Average (RMA)¹⁰² implementado en el software comercial Transcriptome Analysis Console 4.0 (TAC) (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific).

Este algoritmo se centra en las sondas PM (Perfect Match) y no tiene en cuenta las sondas MM (Mismatched Match) ya que mezclan fondo y señal de hibridación, añaden variación y efectos de secuencia específicos. El RMA hace una corrección de fondo ajustando el nivel cero de intensidad de todos los arrays, normaliza mediante cuantiles las señales PM ajustadas, consiguiendo que todos los arrays tenga la misma distribución de intensidad y, por último, transforma la intensidad de señal de cada gen en logaritmos de base 2 y ajusta por el método median polish. El resultado final es un fichero de texto conteniendo el valor de la expresión media en escala logarítmica en base 2 de cada gen en las diferentes muestras.

3.10.2 Análisis de expresión diferencial

El análisis de genes diferencialmente expresados (GDEs) entre los distintos grupos experimentales se realizó con el software TAC y usando el paquete *limma* implementado en R. En ambos casos, el análisis se basa en un t-test en el cual la estimación de las varianzas de cada gen se hace mediante un modelo e-Bayes y se utiliza el *False Discovery Rate* (FDR) para ajustar el *p*-valor¹⁰³.

Los genes con un *Fold Change* (FC) mayor de 2 o menor de -2 y con un *p*-valor < 0.05 fueron considerados GDEs.

3.10.3 Análisis de rutas biológicas

Se llevó a cabo un análisis de rutas biológicas con el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN) y además un *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) con el software R.

En ambos análisis, se identificaron como significativas, aquellas rutas biológicas con un *p*-valor <0.05.

3.11 Validación de resultados por qPCR

3.11.1 qPCR resultados Fase I

20 genes diferencialmente expresados entre la comparación “Controles no alérgicos vs Pacientes con alergia grave a profilina” fueron seleccionados para estudios de validación por qPCR (Tabla 2). Los oligos para dichos genes fueron diseñados con el software OligoArchitect™ (Sigma Aldrich) y la herramienta Primer-BLAST (NCBI).

Tabla 2. Información oligos para validación por RT-PCR de los resultados obtenidos en la Fase I del estudio. Ta: temperatura de anillamiento.

| Gen | Oligos | Secuencia | Amplicon | TM | %GC | Ta Producto | Fold Change |
|------------------|-------------|------------------------|----------|------|------|----------------|-------------|
| CXCL5 | SENTIDO | TGCGTTGCGTTTGTTCACAGA | 75 | 65.7 | 42.9 | 56.9 | 5.52 |
| | ANTISENTIDO | CTATGGCGAACACTTGCAGATT | 75 | 65.4 | 45.5 | | |
| HIST1H2BH | SENTIDO | GTTTACAAGGTGCTGAAG | 86 | 57.3 | 44.4 | 56.4 | 5.46 |
| | ANTISENTIDO | ATATCGTTGACAAAAGGAATT | 86 | 56.7 | 30 | | |
| MYL9 | SENTIDO | ATCCAATGTCTTCGCAATG | 82 | 60.1 | 42.1 | 55.7 | 4.65 |
| | ANTISENTIDO | ATCACGGTCTGGTCAAT | 82 | 60 | 44.4 | | |
| TREML1 | SENTIDO | TAATCCAATGTCCTAACT | 112 | 53.3 | 33.3 | 56.1 | 4.5 |
| | ANTISENTIDO | TGTGTAATGGTAGAAGAA | 112 | 53.6 | 33.3 | | |
| GNG11 | SENTIDO | TTAAGCACCATATAGATAGG | 164 | 55 | 35 | 54 | 4.49 |
| | ANTISENTIDO | GAAGCATCAAGCAATATAC | 164 | 55.4 | 36.8 | | |

| | | | | | | | |
|---------------|-------------|------------------------|-----|------|------|------|-------|
| NRGN | SENTIDO | CCGAAAGGTTTCTGATCT | 79 | 58 | 44.4 | 55.4 | 4.12 |
| | ANTISENTIDO | CACTTGGACATTCCTCTT | 79 | 57.9 | 44.4 | | |
| SELP | SENTIDO | ATAAGCCAATAGCGATGA | 103 | 57.2 | 38.9 | 56.1 | 3.95 |
| | ANTISENTIDO | GCAGAGCCATTAAGTAAC | 103 | 56.9 | 44.4 | | |
| RAB27B | SENTIDO | TAGCCAAGATATGTCCTGTTA | 155 | 59.8 | 38.1 | 55.4 | 3.7 |
| | ANTISENTIDO | ACCGAGTTAGAGCAATGT | 155 | 59.7 | 44.4 | | |
| ELOVL7 | SENTIDO | TTCCGACCTTCATCATACAA | 120 | 60.5 | 40 | 55 | 3.35 |
| | ANTISENTIDO | GGCTCTCCACTTCTATTCCATA | 120 | 60.5 | 42.9 | | |
| CLU | SENTIDO | CAGTGGCTAAGATGGTATAG | 101 | 58.6 | 45 | 54.8 | 3.27 |
| | ANTISENTIDO | AGCAATTCTTGAAGTGGAT | 101 | 58.5 | 36.8 | | |
| LTBP1 | SENTIDO | AATGAATGCGATGAGTTG | 82 | 57.2 | 38.9 | 54.5 | 3.19 |
| | ANTISENTIDO | AACACTTGTAGGAACCAT | 82 | 57 | 38.9 | | |
| ITGA2B | SENTIDO | ATCTCAACACTACAGAATATG | 88 | 56.6 | 33.3 | 57.1 | 3.18 |
| | ANTISENTIDO | CTCTGGTAGTAGGAATCC | 88 | 56.5 | 50 | | |
| CA2 | SENTIDO | GGATGGCACTTACAGATTGA | 76 | 61.5 | 45 | 55.6 | 2.99 |
| | ANTISENTIDO | CACAGTATGCTCTGAACCTT | 76 | 61.4 | 45 | | |
| CLEC1B | SENTIDO | AACTGGAGATATTATGGAGAT | 104 | 57.1 | 33.3 | 55.5 | 2.46 |
| | ANTISENTIDO | TTCAGGAGAGTAGCATTC | 104 | 57 | 44.4 | | |
| ABLIM3 | SENTIDO | AACAACCAGACAGACAAC | 82 | 58.8 | 44.4 | 55.3 | 2.45 |
| | ANTISENTIDO | AGAGGCATAGACCAAGAA | 82 | 58.6 | 44.4 | | |
| MMD | SENTIDO | CTTCATTGCTGCTTCTTA | 149 | 56.3 | 38.9 | 56.4 | 2.43 |
| | ANTISENTIDO | AGAGTTCAACCACCTTAT | 149 | 56.4 | 38.9 | | |
| GNAZ | SENTIDO | TACGAGGATAACCAGACA | 82 | 58 | 44.4 | 56.2 | 2.25 |
| | ANTISENTIDO | TGTTGATGAACCAGTTGT | 82 | 58.1 | 38.9 | | |
| SPARC | SENTIDO | GAGTGTATGGTTCCTGTAAG | 96 | 59 | 45 | 54.9 | 2.14 |
| | ANTISENTIDO | GTCTGGTGCTGATAATGG | 96 | 58.9 | 50 | | |
| PTGS1 | SENTIDO | GGAGGAGAGCACATACTG | 86 | 60.3 | 55.6 | 55.1 | 2.13 |
| | ANTISENTIDO | GATTATACCACGCACTTCAC | 86 | 60.4 | 45 | | |
| TMEM40 | SENTIDO | AAGATGTAGACTATGGAGAG | 98 | 56.8 | 40 | 55.1 | 2.11 |
| | ANTISENTIDO | GGAGGAAGAAGACTTGTT | 98 | 57.5 | 44.4 | | |
| ZNF100 | SENTIDO | CACTTGATTGTAGGTAAGGTAA | 93 | 59.3 | 36.4 | 53.7 | -2.01 |
| | ANTISENTIDO | GTGAAGGTGTGAGCATTAG | 93 | 59.7 | 47.4 | | |

Para la síntesis del cDNA mediante retrotranscripción (RT-PCR) se utilizó el kit High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems). Las muestras se prepararon de acuerdo a la Tabla 3 y la reacción se llevó a cabo en un termociclador incubando la reacción a 37°C durante 60 min y parándola con un paso de 95°C 5 minutos. El cDNA sintetizado fue diluido 1:10 y congelado a -40°C hasta su uso.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes reacción RT-PCR.

| Reactivo | Volumen | |
|-------------------------|----------------------|-----------|
| | Muestra | Control - |
| 2X RT Buffer Mix | 10 µL | 10 µL |
| 20X RT Enzyme Mix | 1 µL | 1 µL |
| RNA | hasta 9 µL* | - |
| Agua libre de nucleasas | rellenar hasta 20 µL | 9 µL |
| TOTAL | 20 µL | 20 µL |

*Volumen necesario para 1 µg de RNA total

La qPCR se llevó a cabo utilizando SYBR Premix Ex TaqTli RNaseH Plus (Takara Clontech - RR420A) como sonda fluorescente para la cuantificación de DNA bicatenario en el equipo Real Time HT 7900 (Applied Biosystems). La reacción se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial 95° 10 min, 40 ciclos compuestos de tres pasos (desnaturalización 95° 15s, hibridación 60° 15s y elongación 72° 15s) y por último el paso de finalización (95° 0s, 60° 15s, 95° 0s y 40° 30s).

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen de referencia microglobulina β2 (*B2M*). Los resultados fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁰⁴.

3.11.2 qPCR resultados Fase II

Debido a la baja concentración de las muestras y a no poder finalizar el reclutamiento como consecuencia de la crisis del Covid-19 no ha sido posible realizar la validación hasta el momento. En cuanto sea posible continuar con el reclutamiento se realizarán los experimentos de qPCR.

Resultados

1. Estratificación clínica de pacientes alérgicos

1.1 Clasificación clínica de los pacientes Fase I

La estratificación clínica de los pacientes se realizó de acuerdo a los resultados de la provocación oral con profilina pura de palma además de valorando su historia clínica. Según los resultados (Tabla 4) se clasificaron como “pacientes con alergia moderada a profilina” (n=13) a aquellos sujetos que desarrollaron reacciones locales objetivas durante la provocación oral, tales como el síndrome de alergia oral (SAO), angioedema o prurito oral. Por otro lado, aquellos pacientes que sufrieron reacciones sistémicas afectando a varios órganos (urticaria, asma, edema de úvula...) se clasificaron como “pacientes con alergia grave a profilina” (n=6). Por lo tanto, se establecieron tres grupos experimentales: el grupo “No alérgico”, el grupo “Moderado” y el grupo “Grave”.

Tabla 4. Información y clasificación clínica de los pacientes Fase I. **Alimentos:** M: Manzana; Al: Albaricoque; B: Berejena; Ag: aguacate; P: Plátano; Ce: Cereza; An: Anacardo; Pe: Pepino; H: Higo; K: Kiwi; L: Lechuga; Li: Limón; M: Melón; Ma: Mandarina; Na: Naranja; Me: Melocotón; Pr: Pera; Pi: Piña; Ca: Cacahuete; Mm: membrillo; F: Fresa; T: Tomate; S: Sandía; Nu: Nuez. **Reacciones:** DA: Dolor abdominal; BE: Broncoespasmo; DSF: Disfagia; DF: Disfonía; DG: Dolor epigástrico; ERI: Eritema; EU: Edema de úvula; HT: Hipotensión; AL: Angioedema labial; NA: Náuseas; SAO: Síndrome de alergia oral; PO: Prurito Oral; GF: Globo Faríngeo; RESP: Síntomas respiratorios; RI: Rinitis; UR: Urticaria; EM: Emesis; T: Tos; AF: Aftas.

| Paciente | Edad/Sexo | Reacciones alérgicas a alimentos | Reacciones alérgicas | Reacciones provocación oral | Medicación de rescate [#] | Clasificación clínica* |
|----------|-----------|--|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|---|
| P.1 | 36/M | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.2 | 34/H | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.3 | 29/M | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.4 | 35/M | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.5 | 27/M | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.6 | 38/M | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | No alérgico |
| P.7 | 47/M | P, T | SAO, EM | Ninguna | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.8 | 19/M | M, Pr, F | SAO | SAO | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.9 | 41/M | Me, Pr, Al, Ce, K, P, Ag, Pi, Ma, Ca, M, S | SAO, RESP | RESP | Salbutamol | Paciente con alergia moderada a profilina |

| | | | | | | |
|-------|------|---|--------------------------------------|-------------------|--|---|
| P.10 | 53/H | Ninguna | Ninguna | PO (2/10) | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.11 | 29/H | Ninguna | Ninguna | PO | Cetirizina | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.12 | 34/M | F, M | ERI | SAO | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.13 | 37/H | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.14 | 44/M | Me, Ca, F, Mm, K, P, Ag, Pi, An, Na, H, Nu, B, T, Pe, M | SAO | PO (8/10) | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.15 | 44/M | L | BE, DG, HT, NA, RI, UR, EM | DSF, SAO | Antihistamínicos IV y corticoides | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.16 | 28/M | M, S, Ce | SAO, DF | AF, SAO | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.17 | 38/H | K, Li, Ma, M, Pi, F | SAO | PO, T, DSF | Cetirizina | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.18 | 25/M | M, S | DA, SAO, DF, DSF, DG, EU, GF, NA, EM | SAO, DSF, AL, NA | Antihistamínicos IV, Corticoides, Adrenalina IM | Paciente alérgico grave a profilina |
| P.19 | 44/M | M | SAO, ERI, T, GF, DG | AL, SAO, DSF, NA | Adrenalina IM, Antihistamina IV | Paciente alérgico grave a profilina |
| P.20* | 26/M | L, M, T | BE, EU | No llevada a cabo | | Paciente alérgico grave a profilina |
| P.21 | 31/M | M, S | SAO | AL | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.22 | 26/H | M, S, P | SAO, AL | Ninguna | Ninguna | Paciente con alergia moderada a profilina |
| P.23 | 20/M | Ma, T | SAO | EU, DSF | Adrenalina IM, Actocortina IV, Dexclorfeniramina maleato | Paciente alérgico grave a profilina |
| P.24 | 22/H | M, F | BE, SAO | BE, EU, DSF | Adrenalina IM, Actocortina IV, Dexclorfeniramina maleato | Paciente alérgico grave a profilina |
| P.25* | 41/M | M | BE, EU, UR | No llevada a cabo | | Paciente grave alérgico a profilina |

Nota: Los pacientes alérgicos graves a profilina sufrieron reacciones sistémicas durante el test de provocación oral con profilina.

#: Medicación utilizada para controlar las reacciones durante la provocación con profilina.

.*: La provocación oral con profilina no se llevó a cabo debido a la gravedad de las reacciones reportadas por los pacientes.

1.2 Clasificación metabólica pacientes Fase I

La estratificación clínica generada según la respuesta a la provocación oral con profilina además del análisis de la historia clínica permitió clasificar de manera muy clara a aquellos pacientes que manifestaban unas reacciones graves (sistémicas) durante la provocación o que aquellos en los que la provocación no estaba indicada debido a anafilaxias o reacciones graves previas reportadas en su historial clínico. Sin embargo, la clasificación de los del grupo "Moderado" en los que por motivos éticos la provocación oral no se continuaba en el momento en el que se empezaban a manifestar las primeras reacciones, los resultados resultaban ambiguos, con lo que no se podía concluir si esos pacientes tenían reacciones moderadas o simplemente no se había continuado la provocación para demostrar su perfil grave.

Como se detalla en la publicación de Obeso et al¹⁰⁵ utilizando el perfil metabólico del plasma de los pacientes obtenido mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MC) se estableció una nueva clasificación de los pacientes moderados. Los perfiles metabólicos de los individuos con una clasificación clínica clara (grupo "No alérgico" y grupo "Grave") se utilizaron para la construcción de un modelo de clasificación supervisado OPLS-DA. Este modelo mostró parámetros de buena calidad, con una capacidad de ajuste (R^2) = 0.99 y una capacidad de predicción de nuevas muestras (Q^2) = 0.75, se validó utilizando el enfoque de "1/3-out", obteniendo una precisión del 92% y se utilizó para asignar una clase a los pacientes incluidos en el grupo "Moderado". Los pacientes con score superior a 0.75, más próximos a los sujetos no alérgicos, se clasificaron como grupo "Leve". Aquellos con una puntuación inferior a 0.2, más cerca de los pacientes del grupo "pacientes con alergia grave a profilina", fueron asignados al grupo "Grave", mientras que el resto de los sujetos fueron incluidos en el grupo "Moderado" (Tabla 5).

Esta nueva clasificación fue la que se utilizó para el análisis transcriptómico, y permitió entender mejor la progresión de la alergia desde los sujetos no alérgicos hasta aquellos pacientes que desarrollaban una alergia grave.

Tabla 5. Clasificación según el perfil metabólico de los pacientes.

| Sujeto | Clasificación clínica | Grupo asignado | Score | Nueva clasificación |
|--------|---|----------------|--------|---------------------|
| P.1 | No alérgico | 1 | 1.006 | No alérgico |
| P.2 | No alérgico | 1 | 1.026 | No alérgico |
| P.3 | No alérgico | 1 | 1.024 | No alérgico |
| P.4 | No alérgico | 1 | 0.904 | No alérgico |
| P.5 | No alérgico | 1 | 1.024 | No alérgico |
| P.6 | No alérgico | 1 | 0.994 | No alérgico |
| P.7 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.756 | Leve |
| P.8 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.740 | Leve |
| P.9 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.912 | Leve |
| P.10 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.864 | Leve |
| P.11 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.812 | Leve |
| P.12 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.260 | Moderado |
| P.13 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.531 | Moderado |
| P.14 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.580 | Moderado |
| P.15 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.516 | Moderado |
| P.16 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.358 | Moderado |
| P.17 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.651 | Moderado |
| P.21 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.080 | Grave |
| P.22 | Paciente con alergia moderada a profilina | — | 0.116 | Grave |
| P.18 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | -0.042 | Grave |
| P.19 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | -0.054 | Grave |
| P.20 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | 0.035 | Grave |
| P.23 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | 0.043 | Grave |
| P.24 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | -0.008 | Grave |
| P.25 | Paciente con alergia grave a profilina | 0 | 0.048 | Grave |

1.3 Clasificación clínica pacientes Fase II

La estratificación clínica de estos pacientes se estableció según su historial clínico, teniendo en cuenta las reacciones alérgicas reportadas durante las estaciones polínicas, la medicación asignada y los resultados de SPT.

Aquellos pacientes que reportaron reacciones locales (SAO, prurito oral, angioedema...) y tenían SPT positivo a aeroalérgenos fueron incluidos en el grupo de “pacientes con alergia respiratoria moderada” (n=3). Por otro lado, los pacientes que reportaron reacciones sistémicas (urticaria, asma, anafilaxia...), tenían SPT positivo a aeroalérgenos y normalmente también a algún alérgeno perenne (*Alternaria alternata*, gato, perro...), se consideraron “pacientes con alergia respiratoria grave” (n=4), debido a su difícil manejo y a la ausencia de respuesta frente a tratamiento. Los datos de todos los sujetos están recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Información de los pacientes Fase II. **Síntomas:** RC: Rinoconjuntivitis; A: asma. **Medicación:** CTO: corticoides orales; AH: antihistamínicos; BD: broncodilatadores; ADRE: adrenalina; CI: corticoides inhalados, LABA: agonista β 2 adrenérgico de larga acción; CINS: corticoides intranasales, MONTELUKAST: inhibidor de leucotrienos. **Alérgenos:** D. pt: Dermatophagoides pteronyssinus; D. far: Dermatophagoides farinae; Ole: olivo; Phl: gramíneas; Ariz: arizonica; Pla: platanus; Alt: alternaria; Cyn: cynodon; Mal: malezas; Prof: profilina.

| Paciente | Edad/Sexo | Reacciones alérgicas reportadas | Medicación | Skin Prick Test | Clasificación |
|----------|-----------|---------------------------------|---------------------------|---|--|
| P.1 | 27/M | RC+A | AH, CINS | Ole, Phl, Pla, Cyn, Mal | Paciente con alergia respiratoria moderada |
| P.2 | 27/M | RC+A | CI+LABA, CTO, BD | D. pt, D. far, Ariz | Paciente con alergia respiratoria grave |
| P.3 | 40/M | RC+A | AH, CINS, BD, CI+LABA | D. pt, D. far, Phl, Ariz, Cyn, Prof | Paciente con alergia respiratoria grave |
| P.4 | 24/H | - | - | Negativo | No alérgico |
| P.5 | 19/M | RC+A | CI+LABA, CTO, BD | Phl, D. pt, D. far, perro, gato | Paciente con alergia respiratoria grave |
| P.6 | 26/M | RC+A | CI+LABA, MONTELUKAST, CTO | gato, perro, Ariz | Paciente con alergia respiratoria grave |
| P.7 | 20/M | RC + A | AH, CINS, BD, CI+LABA | Ole, Phl, Ariz, Alt, Cyn, Prof, Mal, Pla, gato, perro | Paciente con alergia respiratoria moderada |
| P.8 | 49/H | RC | AH | Ole, Phl, Ariz, Alt, Cyn, Prof, Mal | Paciente con alergia respiratoria moderada |
| P.9 | 41/M | - | - | Negativo | No alérgico |
| P.10 | 24/M | - | - | Negativo | No alérgico |

2. Perfil transcriptómico de pacientes alérgicos Fase I

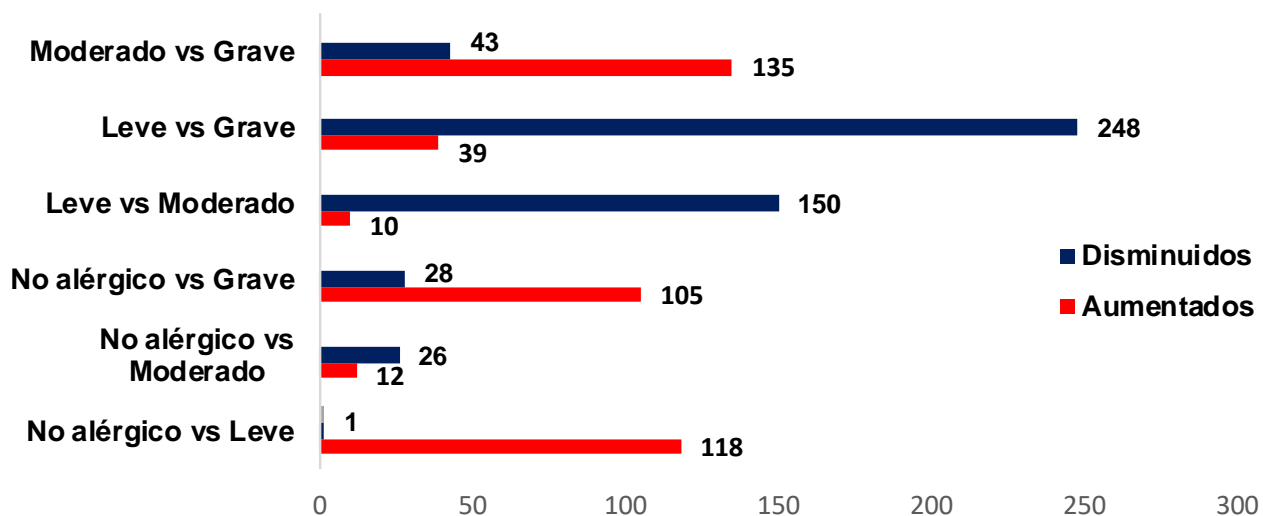
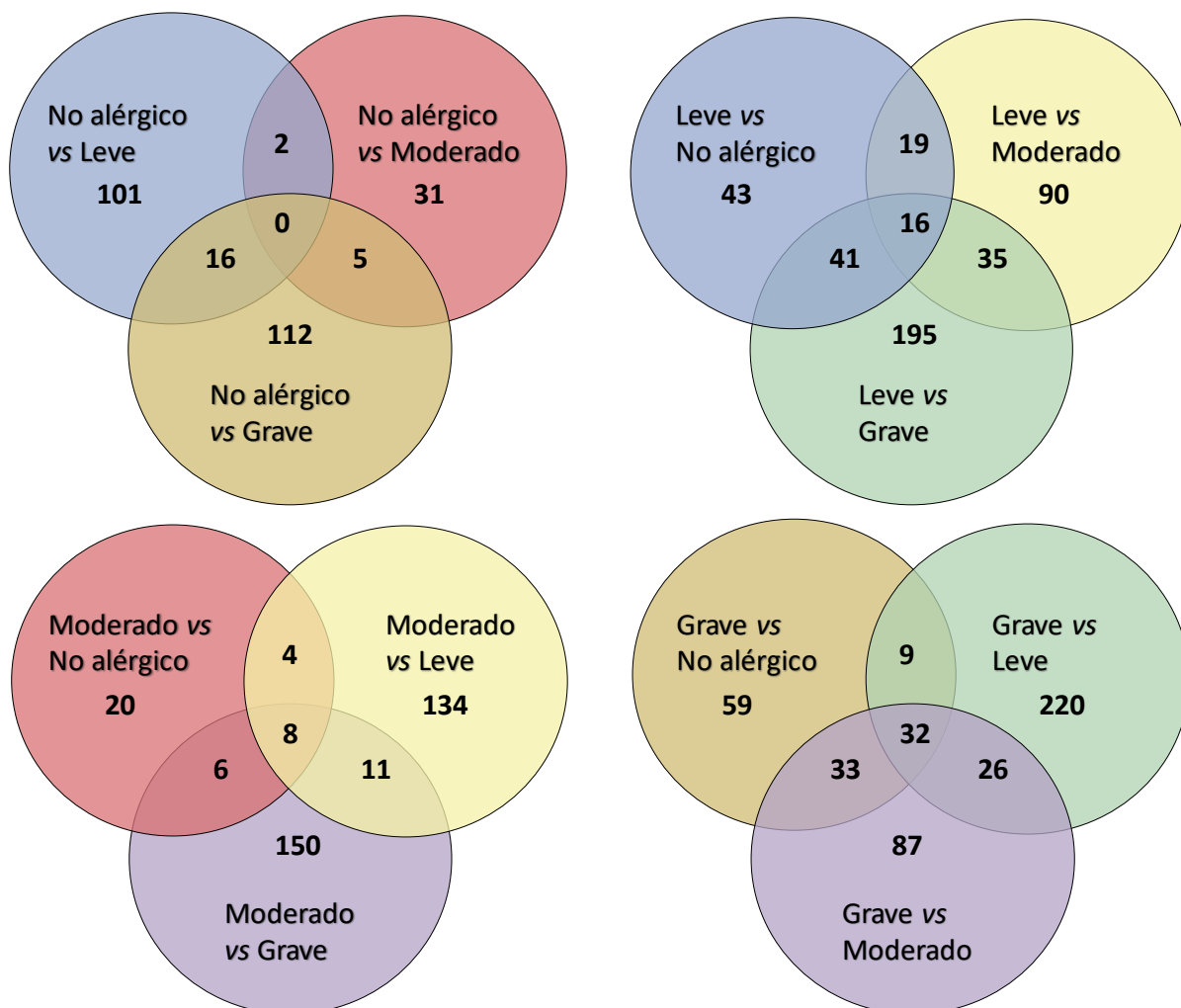
Se identificaron 596 GDEs entre los grupos experimentales del total de 48226 transcritos analizados (Figura 17A). Estas diferencias se representaron con diagramas de Venn, observándose un mayor número de transcritos diferentes entre los grupos alérgicos, especialmente en las comparaciones “Grave vs Leve” con 220 transcritos y “Grave vs Moderado” con 87 (Figura 17B). Además, se utilizaron los 100 transcritos más diferencialmente expresados para la construcción de un *heatmap* (Tabla 7). En este heatmap se puede observar que los transcritos se dividen en cuatro *clusters* de acuerdo a su perfil de expresión (Figura 17C). En el *Cluster 1*, aumentado en los pacientes “Graves” y disminuido en el grupo “Leve”, se encontraban esencialmente H/ACA box snoRNAs (SNORA). Por otro lado, el *Cluster 2*, disminuido también en el grupo “Leve”, incluía un grupo muy heterogéneo de transcritos. El *Cluster 3*, incluía principalmente genes relacionados con coagulación y modificación de histonas que podrían ser posibles candidatos a biomarcadores de gravedad alérgica al estar su expresión disminuida en el grupo “Grave” con respecto al resto de grupos experimentales. Finalmente, el *Cluster 4* contenía small nucleolar RNAs (snRNA), sus variantes, y transcritos relacionados con la biosíntesis proteica y factores de crecimiento cuya expresión estaba disminuida en el grupo “Grave” con respecto al grupo “Leve”.

Tabla 7. Los 100 transcritos con un mayor FC entre todos los grupos experimentales ordenados por *p*-valor.

| Comparación | Fold Change | <i>p</i> -valor | Gene Symbol |
|----------------------|-------------|-----------------|---|
| No alérgico vs Grave | 4.97 | 0.000003 | <i>DDX11L2; DDX11L9; DDX11L10; DDX11L1; DDX11L5; DDX11L12; DDX11L16; DDX11L11</i> |
| No alérgico vs Grave | 3.94 | 0.000008 | <i>SELP</i> |
| Leve vs Grave | -4.72 | 0.000016 | <i>GUSBP3</i> |
| No alérgico vs Grave | 4.23 | 0.000024 | <i>NRGN</i> |
| Leve vs Grave | -3.14 | 0.000041 | <i>NPIP3</i> |
| No alérgico vs Grave | 4.58 | 0.000042 | <i>TREML1</i> |
| Moderado vs Grave | 5.99 | 0.000044 | <i>HIST1H2BH</i> |
| No alérgico vs Grave | 4.58 | 0.000054 | <i>MYL9</i> |
| No alérgico vs Grave | 4.43 | 0.000074 | <i>SDPR</i> |
| Leve vs Grave | -4.51 | 0.000075 | <i>SPDYA</i> |
| Moderado vs Grave | 10.68 | 0.000091 | <i>RNU5E-4P</i> |
| No alérgico vs Grave | 6.65 | 0.000098 | <i>HIST1H2BH</i> |
| Leve vs Grave | -9.20 | 0.000138 | <i>SCARNA5</i> |

| | | | |
|-------------------------|--------|----------|--|
| No alérgico vs Grave | 3.68 | 0.000163 | TUBB1 |
| No alérgico vs Grave | 3.58 | 0.000241 | RAB27B |
| No alérgico vs Grave | 3.82 | 0.00026 | DDX11L10 |
| No alérgico vs Grave | 3.72 | 0.00029 | C15orf54 |
| Moderado vs Grave | 3.50 | 0.000301 | GPR97 |
| No alérgico vs Grave | 3.60 | 0.000313 | CXCR2P1 |
| Leve vs Grave | -3.53 | 0.000644 | RP11-33B1.3 |
| Moderado vs Grave | -7.55 | 0.000672 | SCARNA5 |
| Leve vs Grave | -4.80 | 0.000699 | RNA5SP85 |
| No alérgico vs Grave | 3.46 | 0.000719 | SH3BGRL2 |
| Leve vs Grave | -13.45 | 0.000737 | RNA5SP199 |
| Moderado vs Grave | 3.51 | 0.000775 | NRGN |
| Moderado vs Grave | 4.53 | 0.000809 | MT-TG |
| Leve vs Grave | -9.78 | 0.00096 | SNORA38B |
| Leve vs Grave | -4.16 | 0.001124 | MIR644A |
| Moderado vs Grave | 3.92 | 0.001144 | MYL9 |
| Leve vs Grave | -3.17 | 0.001169 | RNU7-181P |
| Moderado vs Grave | 7.90 | 0.001208 | MIR3945 |
| Moderado vs Grave | 3.95 | 0.001228 | TREML1 |
| Leve vs Grave | -4.69 | 0.001242 | SNORA14A |
| No alérgico vs Grave | 4.90 | 0.001296 | CXCL5 |
| Moderado vs Grave | 6.65 | 0.001315 | RNVU1-19 |
| Leve vs Grave | -3.76 | 0.001347 | SNORA9; SNHG15; LOC101928927 |
| No alérgico vs Grave | 4.86 | 0.001475 | ITGB3; RP11-290H9.2 |
| No alérgico vs Grave | 4.36 | 0.001694 | MT-TR |
| No alérgico vs Grave | 5.86 | 0.001763 | MT-TG |
| Leve vs Grave | -3.73 | 0.001884 | LOC100272216; GUSBP1 |
| Leve vs Grave | -3.57 | 0.001946 | SNORA16B |
| Moderado vs Grave | -9.54 | 0.002237 | RNA5SP199 |
| Leve vs Grave | -3.30 | 0.00233 | RNU6-341P |
| Leve vs Grave | -3.52 | 0.00237 | SNORA20 |
| Moderado vs Grave | 3.46 | 0.002509 | GP1BA |
| Leve vs Grave | -4.39 | 0.002641 | RNA5SP19 |
| Moderado vs Grave | 3.86 | 0.002918 | PPBP |
| No alérgico vs Leve | 3.92 | 0.002966 | TRAJ14 |
| No alérgico vs Grave | 4.37 | 0.003249 | HIST1H3H; HIST1H3A; HIST1H3D; HIST1H3C; HIST1H3E; HIST1H3I; HIST1H3G; HIST1H3J; HIST1H3B; HIST1H3F |
| Moderado vs Grave | 3.54 | 0.003439 | CXCL8; IL8 |
| Leve vs Grave | -3.86 | 0.003466 | APOLD1 |
| Leve vs Moderado | -4.86 | 0.003774 | RNU5E-4P |
| Leve vs Grave | -4.10 | 0.00391 | SNORA84; MIR3651 |
| Leve vs Moderado | -3.80 | 0.004318 | RASA4B; RASA4 |
| Moderado vs Grave | 3.56 | 0.004614 | RNU1-59P |
| No alérgico vs Moderado | -4.74 | 0.004885 | RNU5D-1 |

| | | | |
|--------------------------------|-------|----------|-------------------------|
| No alérgico vs Grave | -3.28 | 0.005002 | <i>SNORA14A</i> |
| Leve vs Grave | 3.69 | 0.00533 | <i>MYL9</i> |
| Leve vs Moderado | -3.24 | 0.00631 | <i>RNVU1-3</i> |
| No alérgico vs Grave | 3.84 | 0.006352 | <i>AP001189.4</i> |
| Leve vs Grave | -3.06 | 0.006363 | <i>MIR548C; MIR548Z</i> |
| Leve vs Grave | -3.42 | 0.006621 | <i>RNU4ATAC11P</i> |
| Leve vs Grave | 4.07 | 0.00722 | <i>HIST1H2BH</i> |
| Leve vs Grave | -3.19 | 0.007274 | <i>RNU6-135P</i> |
| Moderado vs Grave | 6.68 | 0.007498 | <i>RNU5F-1</i> |
| No alérgico vs Leve | 5.90 | 0.008348 | <i>TRAJ19</i> |
| No alérgico vs Moderado | -3.83 | 0.008493 | <i>RNU5F-1</i> |
| Leve vs Grave | 3.87 | 0.009201 | <i>TREML1</i> |
| Leve vs Grave | -3.50 | 0.009239 | <i>SNORA14B</i> |
| No alérgico vs Leve | 3.59 | 0.00967 | <i>C15orf54</i> |
| No alérgico vs Moderado | -8.23 | 0.010158 | <i>MIR3945</i> |
| Moderado vs Grave | 3.58 | 0.01208 | <i>GNG11</i> |
| Leve vs Grave | -3.08 | 0.012093 | <i>SNORA80A</i> |
| Leve vs Moderado | -3.30 | 0.012454 | <i>SNORA31</i> |
| Moderado vs Grave | 3.71 | 0.012704 | <i>EMR3</i> |
| Moderado vs Grave | 5.83 | 0.013441 | <i>RNU2-63P</i> |
| No alérgico vs Moderado | -7.99 | 0.013635 | <i>RNU2-63P</i> |
| No alérgico vs Grave | 4.13 | 0.014025 | <i>TRAV26-2</i> |
| Leve vs Moderado | -4.40 | 0.014371 | <i>SNORD99</i> |

A**596 transcritos diferencialmente expresados****B**

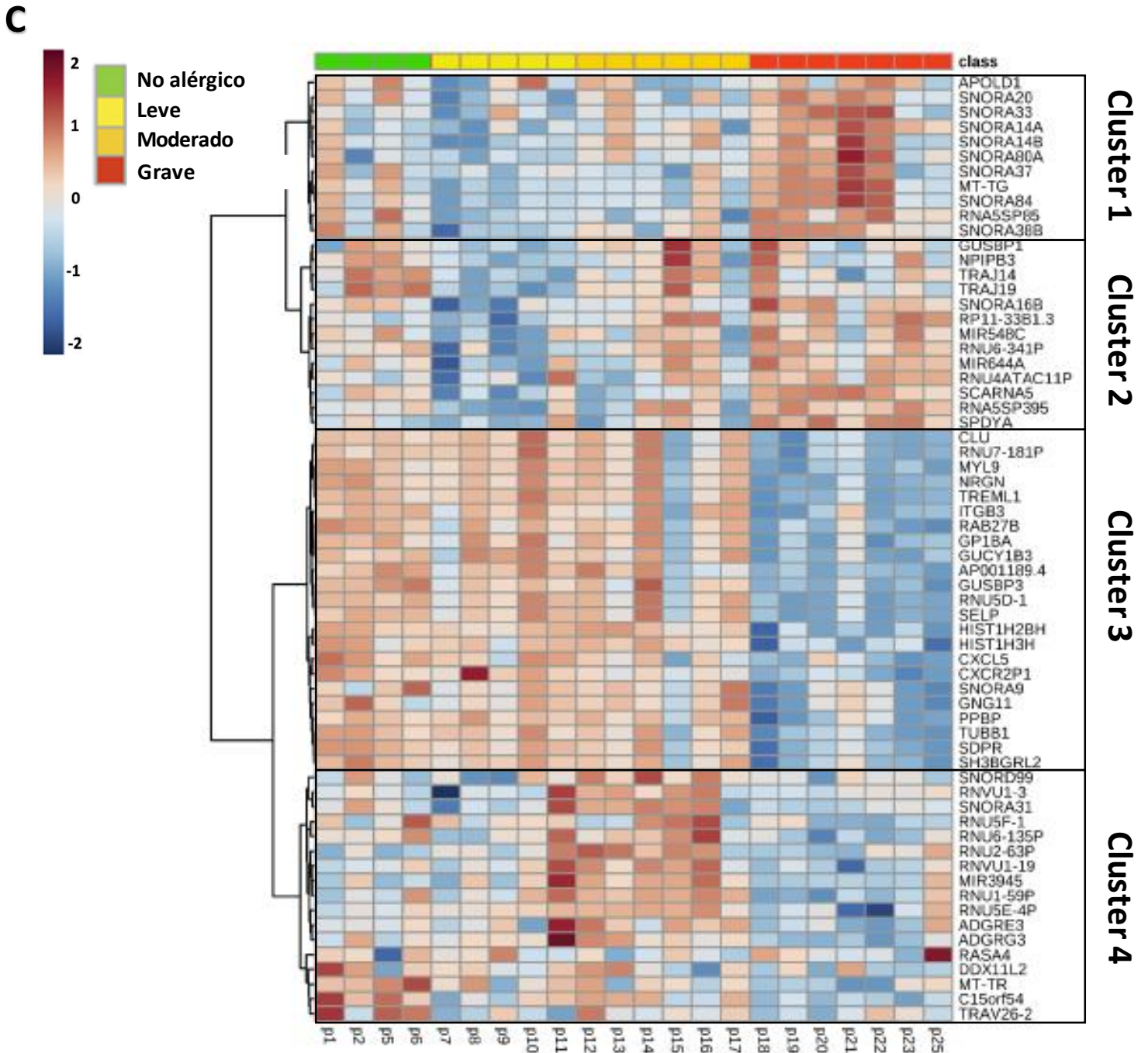


Figura 17. Diferencias transcriptómicas estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. **A.** Genes expresados diferencialmente. Las barras rojas y azules representan, respectivamente, transcritos aumentados y disminuidos con respecto al primer grupo de la comparación. **B.** Diagramas de Venn representando las diferencias de expresión génica en todas las comparaciones: "No alérgico vs Leve" (azul), "No alérgico vs Moderado" (rojo), "No alérgico vs Grave" (marrón), "Leve vs Moderado" (amarillo) y "Moderado vs Grave" (morado). **C.** *Heatmap* de los 100 genes más diferencialmente expresados creado con MetaboAnalyst. Los genes cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul. p -valor < 0.05.

2.1 Perfil transcriptómico característico del fenotipo “Grave”

Con el objetivo de relacionar con un proceso biológico los transcritos característicos del grupo “Grave” identificados en el *Cluster 3*, se llevó a cabo un análisis de rutas biológicas utilizando el software IPA y realizando un GSEA. En el caso del análisis con IPA, se trata de un software comercial capaz de identificar reguladores clave y predecir efectos derivados de una determinada condición biológica a partir de los GDEs identificados. Analiza los genes en el conjunto de datos proporcionado por el usuario que están involucrados en una determinada ruta biológica y compara su FC con lo esperado según la literatura, realizando una predicción del estado de activación mediante el cálculo de un estadístico denominado *Activation Z-Score* para cada función biológica. Cuando el *Activation Z-Score* es >2 quiere decir que el estado probable de esa ruta biológica es “Activado”. Por el contrario, cuando el número es <-2 esa función biológica se considera “Inactiva”.

Por otro lado, el GSEA¹⁰⁶ es un método computacional que determina si un set de genes (*Gene Set*) predeterminado está significativamente diferencialmente expresado en dos condiciones biológicas distintas (fenotipos). El principal resultado de este análisis es el *Enrichment Score* (ES), que refleja el grado de correlación (positivo o negativo) de un set de genes con los distintos grupos experimentales.

En una primera comparación se analizaron las diferencias entre el grupo “Grave” vs el grupo “Leve” y el grupo “Moderado” utilizando GSEA y, posteriormente, se realizó el mismo análisis con IPA (Tabla 8). Los resultados del GSEA mostraron que los *Gene Sets* de reparación de DNA, respuesta inflamatoria, fosforilación oxidativa, el metabolismo de ácidos grasos y las rutas del sistema del complemento y coagulación estaban correlacionadas negativamente con el fenotipo “Grave”. Los resultados obtenidos con IPA indicaron que las rutas relacionadas con células endoteliales, fagocitosis y funciones plaquetarias como la activación, la unión y adhesión a células endoteliales estaban inactivadas en el grupo “grave” con respecto a los otros dos grupos de pacientes alérgicos, al tener un valor de *Activation Z-Score* negativo (Tabla 8).

Este análisis sugiere que la coagulación y las rutas asociadas con las funciones plaquetarias se encuentran afectadas en los pacientes de fenotipo grave, y podrían definir los mecanismos subyacentes. Además, las rutas y los transcritos asociados con el metabolismo de ácidos grasos y la reparación de DNA se encontraban

aumentadas en los fenotipos “Leve” y “Moderado” en comparación con el grupo “Grave”.

Tabla 8. Resultados del análisis rutas biológicas significativos obtenidos con GSEA e IPA ordenados por *p*-valor para las comparaciones ‘Grave vs Leve’ y ‘Grave vs Moderado’.

| Grave vs Leve | | | | |
|--|----------|-----------------|-----------------------|--------------------|
| Ruta biológica | Análisis | <i>p</i> -valor | Enrichment Score (ES) | Activation Z-Score |
| Respuesta inflamatoria | GSEA | 0.00E+00 | -0.669 | - |
| Activación de células sanguíneas | IPA | 1.01E-05 | - | -1.091 |
| Unión de plaquetas | IPA | 1.07E-04 | - | -1.019 |
| Unión de células endoteliales | IPA | 2.15E-04 | - | -1.095 |
| Fagocitosis de células sanguíneas | IPA | 2.58E-04 | - | -1.103 |
| Adhesión de células endoteliales | IPA | 3.85E-04 | - | -1.079 |
| Activación de células sanguíneas | IPA | 1.22E-03 | - | -2.021 |
| Angiogénesis | IPA | 1.43E-03 | - | -1.294 |
| Movimiento de células endoteliales | IPA | 1.63E-03 | - | -1.404 |
| Sistema del complemento | GSEA | 2.10E-02 | -0.428 | - |
| Señalización TGF-β | GSEA | 5.90E-02 | -0.436 | - |
| Coagulación | GSEA | 7.00E-02 | -0.469 | - |
| Metabolismo grupo Hemo | GSEA | 8.40E-02 | -0.464 | - |
| Grave vs Moderado | | | | |
| Ruta biológica | Análisis | <i>p</i> -valor | Enrichment Score (ES) | Activation Z-Score |
| Fosforilación oxidativa | GSEA | 0.00E+00 | -0.502 | - |
| Metabolismo de ácidos grasos | GSEA | 0.00E+00 | -0.432 | - |
| Unión de plaquetas | IPA | 3.19E-12 | - | -2.369 |
| Unión de células sanguíneas | IPA | 6.75E-11 | - | -3.219 |
| Adhesión de células sanguíneas | IPA | 1.44E-10 | - | -2.932 |
| Adhesión de plaquetas | IPA | 1.52E-10 | - | -1.632 |
| Agregación de células sanguíneas | IPA | 3.20E-10 | - | -2.521 |
| Agregación plaquetaria | IPA | 5.19E-10 | - | -2.298 |
| Hemostasis | IPA | 4.38E-09 | - | -2.107 |
| Activación de plaquetas | IPA | 1.75E-08 | - | -1.318 |
| Unión de células endoteliales vasculares | IPA | 2.29E-06 | - | -2.620 |
| Unión de células endoteliales | IPA | 2.68E-06 | - | -2.170 |
| Adhesión de células endoteliales | IPA | 3.31E-06 | - | -1.563 |
| Infiltración de neutrófilos | IPA | 3.39E-06 | - | -2.159 |
| Quimiotaxis de células endoteliales vasculares | IPA | 3.67E-06 | - | -1.934 |
| Movimiento celular de neutrófilos | IPA | 8.91E-06 | - | -2.541 |
| Reparación DNA | GSEA | 1.80E-02 | -0.507 | - |
| Adipogénesis | GSEA | 1.90E-02 | -0.371 | - |
| Metabolismo grupo Hemo | GSEA | 3.60E-02 | -0.476 | - |

2.2 Alteración de las funciones plaquetarias en los pacientes del grupo “Grave”

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente mediante el análisis de rutas biológicas, decidimos enfocarnos en los transcritos relacionados con coagulación y con funciones plaquetarias, concretamente en los transcritos relacionados con las rutas biológicas significativas identificadas con IPA y aquellos que se encontraban en el *Cluster 3* de la Figura 17C. Se dibujaron las trayectorias de todos ellos con el fin de confirmar que estos genes tienen una expresión diferente en el grupo “Grave” (Figura 18). Las trayectorias mostraron nuevamente que hay un descenso significativo de la expresión de estos transcritos en el grupo “Grave” comparado con el resto. Entre ellos había genes relacionados con la adhesión plaquetaria (*GP1BA*, *GP9*, *GP6*, and *SELP*); su activación (*P2RY12*, *ALOX12*, and *PTGS2*); el cambio de forma y la secreción de gránulos (*MYL9* and *SDPR*); la agregación plaquetaria (*ITGB3*, *ITGA2B*, and *TREML1*); y otros genes relacionados con sus funciones (*PPBP*, *CLU*, and *NRGN*).

Estos resultados observados en transcriptómica se complementaron con los obtenidos en metabolómica¹⁰⁵, de entre los cuales destaca el incremento de esfingosina-1P y lisofosfolípidos y la disminución de esfingosina en el fenotipo “grave” en comparación con los grupos intermedios “Leve” y “Moderado”. Estos metabolitos están también asociados con la activación plaquetaria. Todos estos cambios en conjunto se representaron en la Figura 19 con el fin de tener una imagen global de la afectación de las funciones plaquetarias en el fenotipo “Grave”.

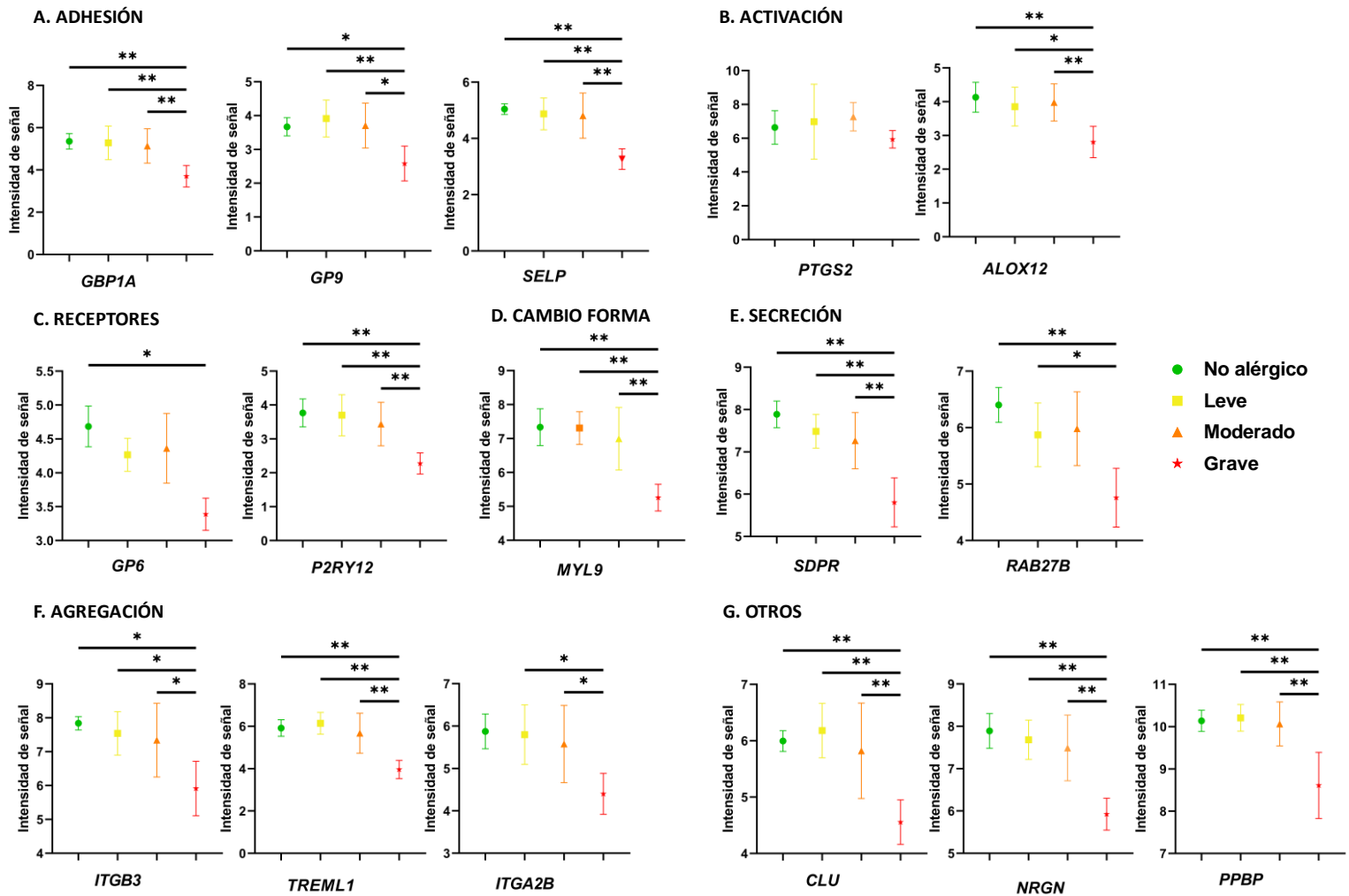


Figura 18. Trayectorias de los transcritos significativos asociados con funciones plaquetarias. **A.** Adhesión, **B.** Activación, **C.** Receptores, **D.** Cambio de forma, **E.** Secreción, **F.** Agregación, **G.** Otros (“No alérgico”: círculo verde, “Leve”: cuadrado amarillo, “Moderado”: triángulo naranja, “Grave”: estrella roja). ** p -valor < 0.001. * p -valor < 0.05.

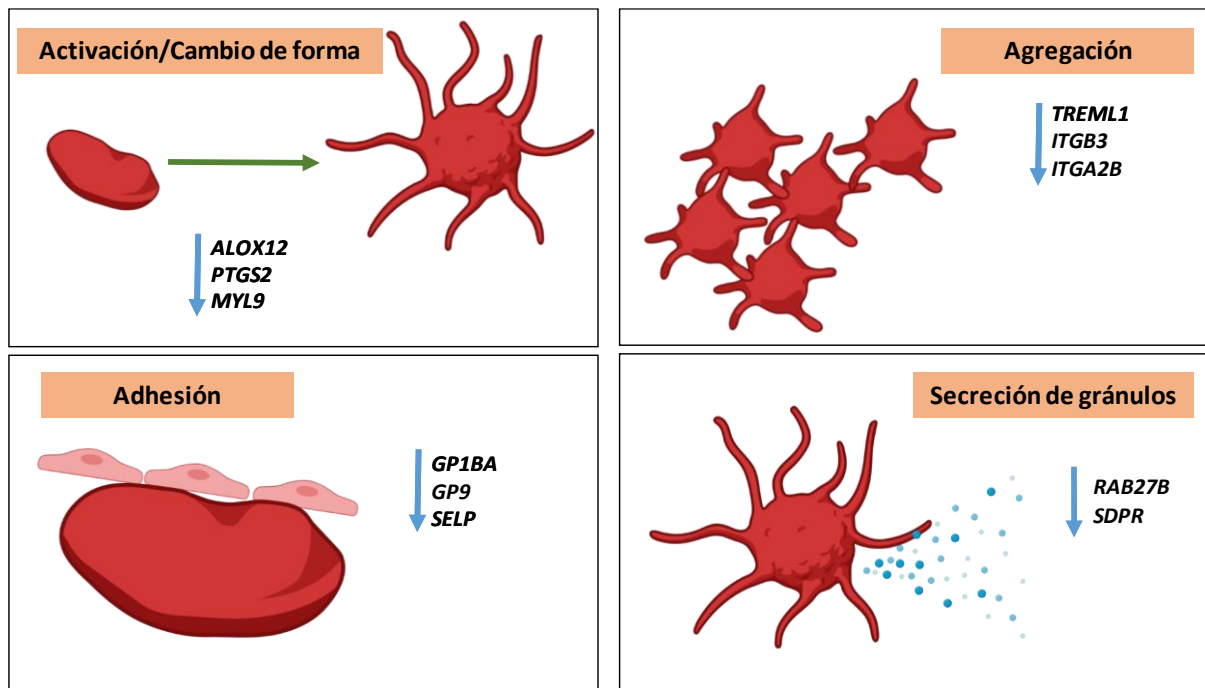


Figura 19. Transcritos disminuidos en el grupo “Grave” y sus principales funciones plaquetarias asociadas

2.3 Validación de resultados Fase I por qPCR

La validación de los resultados se llevó a cabo mediante qPCR. El 95% de los genes seleccionados mostró el mismo patrón de expresión observado en el análisis con microarrays, por lo que los resultados obtenidos se consideraron validados (Figura 20).

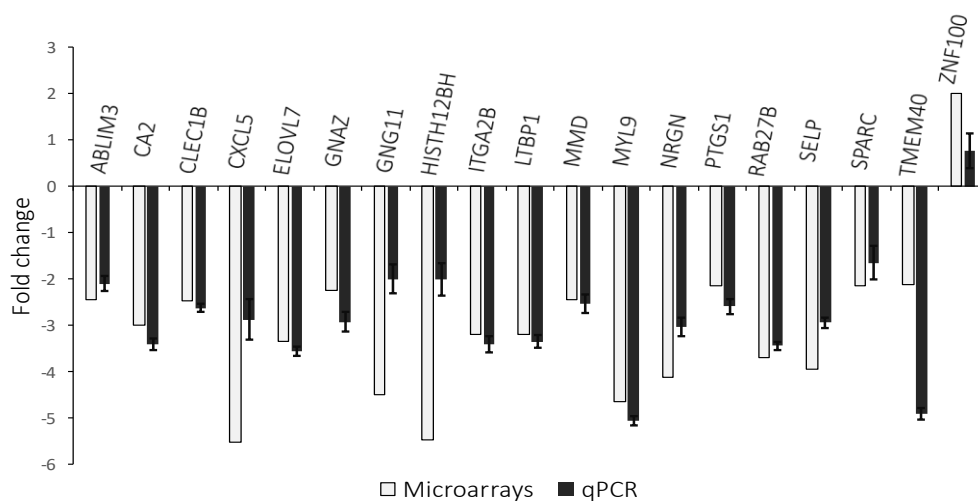


Figura 20. Validación de los datos obtenidos por microarrays mediante la técnica de qPCR. Se muestran los resultados obtenidos por microarrays (blanco) en comparación con los resultados obtenidos por qPCR (negro).

3. Perfil transcriptómico de pacientes alérgicos Fase II

Puesto que la alteración de funciones plaquetarias asociada a fenotipos alérgicos graves vista en CMSP nos resultó sorprendente, decidimos validar estos resultados en otro modelo de gravedad alérgica respiratoria a gramíneas centrándonos en dicha población celular. Para ello, los pacientes reclutados por el Hospital Universitario Puerta de Hierro se sometieron al proceso de aféresis plaquetaria, obteniendo el PRP del cual se aisló RNA plaquetario que fue utilizado para el análisis transcriptómico mediante microarrays. Tras los experimentos de microarrays y los posteriores análisis bioinformáticos, 283 transcritos fueron identificados como diferencialmente expresados entre los sujetos no alérgicos (grupo “No alérgico” de ahora en adelante), los pacientes que presentaban una alergia respiratoria moderada a gramíneas (grupo “Moderado”) y los pacientes que tenían una alergia respiratoria grave a gramíneas (grupo “Grave”). Las diferencias en el número de genes entre grupos fueron representadas utilizando un diagrama de Venn (Figura 21A) en el cual se puede observar que las mayores diferencias se encontraban al comparar los fenotipos alérgicos “Grave” y “Moderado” con el grupo “No alérgico”, con 117 y 142 transcritos diferenciales, respectivamente. Por otro lado, se seleccionaron los 70 transcritos más diferencialmente expresados, es decir, con un mayor FC entre los distintos grupos, para la construcción de un *heatmap* en el que tanto las muestras como los transcritos fueron clasificados mediante un algoritmo de *hierarchical clustering*. Como se puede observar, todas las muestras fueron correctamente clasificadas en su grupo experimental, demostrando que existe un perfil transcriptómico diferencial asociado al estado alérgico de los pacientes. Además, se diferencian tres *Clusters* característicos de los fenotipos alérgicos. Por un lado, los *Clusters* 1 y 3 contienen transcritos característicos del grupo “Grave”, estando el primero de ellos disminuido y el segundo aumentado en este grupo de pacientes, y por otro lado el *Cluster* 2 que se encuentra aumentado en los pacientes del grupo “Moderado”. Este segundo *cluster* resulta interesante ya que, al estar disminuido en el grupo “No alérgico”, aumentado en el grupo “Moderado” y disminuido nuevamente en el grupo “Grave”, puede ser clave para entender la progresión alérgica en este modelo de alergia respiratoria (Figura 21B).

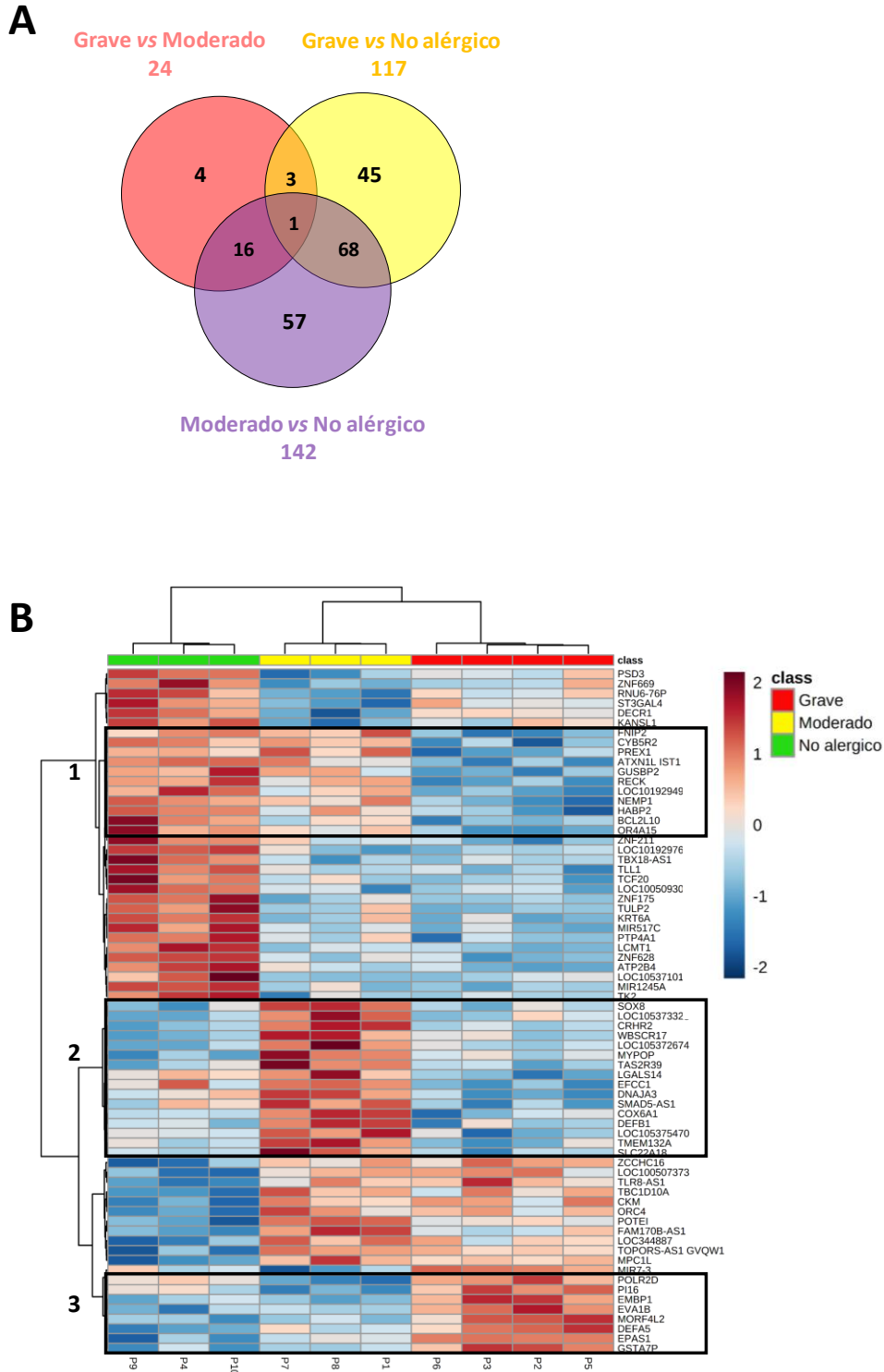


Figura 21. A. Diagrama de Venn Heatmap representando las diferencias de expresión génica en todas las comparaciones: "Grave vs Moderado" (rosa), "Grave vs No alérgico" (amarillo) y "Moderado vs No alérgico" (morado). **B.** Heatmap generado con MetaboAnalyst de los 70 transcritos significativos (p -valor <0.05) más diferencialmente expresados entre los grupos experimentales usando hierarchical clustering como método de agrupación. Los transcritos cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul.

Posteriormente, con el fin de asociar estos transcritos identificados con una ruta biológica concreta, se realizó el análisis con IPA y GSEA, comparando todos los grupos experimentales entre sí. De estos dos análisis únicamente se obtuvieron rutas biológicas significativas con IPA, que quedan recogidos en la Tabla 9.

Primeramente, se analizaron las diferencias entre los pacientes graves y los sujetos no alérgicos. Los resultados indicaron que rutas relacionadas con el metabolismo energético como el transporte de D-glucosa y la concentración de triacilglicerol se encontraban inactivadas en los pacientes del grupo “Grave” con respecto al grupo “No alérgico” al igual que rutas asociadas con la respuesta inflamatoria tales como la proliferación de células endoteliales, el flujo de calcio, la activación de linfocitos y la cantidad de linfocitos Th. Por otro lado, la proliferación de linfocitos B se encontraba activada en los pacientes de fenotipo grave.

De la misma manera, se compararon los grupos “Moderado” y “No alérgico”, encontrando nuevamente rutas significativas asociadas a inflamación (proliferación de células endoteliales, vasculogénesis) y de metabolismo energético (hiperglicemia) con un *Activation Z-Score* positivo, es decir, activadas en el grupo “Moderado”, al contrario de lo que ocurría en la comparación anterior.

Por último, se compararon los dos fenotipos alérgicos “Grave” y “Moderado”, entre los cuales se encontró un menor número de rutas asociadas significativas, debido a que el número de transcritos diferencialmente expresados entre ellos también era menor. Estas rutas se asociaban principalmente con alteraciones hematológicas (trombocitopenia inmune) e inflamación (fibrosis pulmonar, fibrosis celular). En este caso, no fue posible computar el *Activation Z-Score* por lo que no fue posible conocer el estado de activación de esas rutas en los distintos grupos experimentales.

Todos estos resultados sugieren que existe un perfil transcriptómico diferencial asociado al estado alérgico de los pacientes y que la progresión alérgica en este modelo se asocia fundamentalmente con procesos inflamatorios y una alteración del metabolismo energético, concordando con los resultados obtenidos previamente en la Fase I.

Tabla 9. Resultados del análisis rutas biológicas significativos obtenidos con IPA ordenados por *p*-valor para las comparaciones ‘Grave vs No alérgico’, ‘Moderado vs No alérgico’ y ‘Grave vs Moderado’.

| Grave vs No alérgico | | |
|--|-----------------------|---------------------------|
| Ruta biológica | <i>p</i>-valor | Activation Z-Score |
| Proliferación de células endoteliales | 9,52E-04 | -1,018 |
| Concentración de triacilglicerol | 4,87E-03 | -1,144 |
| Transporte de D-glucosa | 3,42E-03 | -1,982 |
| Flujo de Ca ²⁺ | 2,94E-03 | -1,109 |
| Respuesta inflamatoria | 2,55E-03 | -1,527 |
| Proliferación de linfocitos B | 2,49E-03 | 1,461 |
| Cantidad de linfocitos Th | 1,54E-03 | -1,111 |
| Activación de linfocitos | 1,54E-03 | -1,115 |
| Proliferación de células endoteliales vasculares | 1,48E-03 | -1,231 |
| Moderado vs No alérgico | | |
| Ruta biológica | <i>p</i>-valor | Activation Z-Score |
| Cantidad de células mieloides | 7,75E-03 | 1,240 |
| Hiperglicemia | 6,46E-03 | 1,964 |
| Proliferación de células endoteliales | 5,49E-03 | 1,416 |
| Vasculogénesis | 2,95E-03 | 1,075 |
| Proliferación de células endoteliales vasculares | 1,68E-03 | 1,187 |
| Grave vs Moderado* | | |
| Ruta biológica | <i>p</i>-valor | Activation Z-Score |
| Trombocitopenia | 9,77E-04 | - |
| Trombocitopenia inmune | 5,72E-04 | - |
| Movimiento de células precursoras de miocitos | 5,51E-04 | - |
| Fibrosis celular | 1,88E-04 | - |
| Inicio de la traducción proteica | 1,42E-03 | - |
| Transporte de aminas biogénicas | 1,25E-03 | - |
| Fibrosis en pulmones | 1,10E-03 | - |

* Debido al bajo n de transcritos diferencialmente expresados no se pudo computar el *Activation Z-Score*.

Discusión

Encontrar modelos clínicos adecuados que permitan entender la progresión alérgica no es sencillo. Particularmente, identificar fenotipos alérgicos graves homogéneos es una tarea complicada. En este trabajo, hemos utilizado un modelo único conformado por pacientes que presentan una alergia respiratoria a gramíneas residentes en zonas de alta exposición a este polen y que evolucionan a fenotipos graves, sensibilizándose a alérgenos menores como la profilina, que desencadena reacciones alérgicas alimentarias graves, para intentar entender la evolución de la enfermedad alérgica. Estas reacciones graves a la profilina permiten estratificar claramente a un grupo de pacientes “Grave” que parecen no tolerar el alérgeno.

Por lo tanto, es importante poder identificar las características asociadas a estos fenotipos graves con el fin de encontrar posibles biomarcadores que sirvan para facilitar su clasificación y además implementar un tratamiento personalizado y efectivo. Por ello, nuestro objetivo principal durante la Fase I de este proyecto era tanto identificar biomarcadores potenciales asociados a este fenotipo grave como entender las causas subyacentes de la progresión a fenotipos graves. Para ello, se utilizó la combinación de dos ciencias ómicas, la metabolómica y la transcriptómica, siendo la última el núcleo de este trabajo.

En estudios previos, se ha demostrado que el uso de modelos matemáticos basados en parámetros objetivos (como el perfil transcriptómico) es de utilidad para mejorar la clasificación de los pacientes^{107,108}. En nuestro caso, la clasificación de los pacientes se estableció utilizando la historia clínica de los mismos junto con las reacciones sufridas (locales y sistémicas) durante una provocación oral con profilina pura de palmera (ALK-Abelló), y posteriormente aplicando un modelo matemático basado en su perfil metabolómico¹⁰⁵. Esto permitió una clasificación más objetiva en los fenotipos moderados o intermedios en los cuales a provocación oral debía ser detenida por cuestiones clínicas y éticas en el momento en el que se producían reacciones locales intensas¹⁰⁹ sin saber cuál sería el resultado (Grave o Moderado) si hubiéramos continuado la provocación. Esta clasificación nos permitió establecer cuatro grupos experimentales: “No alérgico”, “Leve”, “Moderado” y “Grave” útiles para analizar la progresión alérgica. Además, es destacable que todos los pacientes que fueron incluidos en el grupo “Grave” tenían un perfil metabolómico y transcriptómico común,

confirmando que existe una correlación entre la clasificación clínica y la clasificación ómica.

Una vez establecida la clasificación de los pacientes se llevó a cabo el análisis de los datos transcriptómicos obtenidos de sus CMSP para identificar candidatos a biomarcadores y rutas biológicas asociadas al fenotipo grave.

Se identificaron varios transcritos disminuidos en el grupo “Grave”, entre ellos, *DDX11L2* y *MT-TR* (Cluster 4, Figura 17C), involucrados en el inicio de la traducción proteica, el *splicing* nuclear y mitocondrial y la formación del complejo ribosoma-esplíceosoma¹¹⁰, indicando alteraciones a nivel de metabolismo proteico en este fenotipo. Esto concuerda con lo observado en estudios previos con pacientes asmáticos, en los que se sugiere que las alteraciones de genes de tRNAs mitocondriales pueden llevar a una disfunción de las células epiteliales de las vías aéreas y a un remodelado de las mismas¹¹¹. Además, otros estudios sugieren un papel de las helicasas tipo DEAD/DEAH-Box como es el caso de *DDX11L2* en enfermedades inflamatorias y autoinmunes en el contexto de inmunidad innata¹¹².

Por otro lado, se observaron cambios a nivel de metabolismo energético celular, identificándose rutas biológicas tales como la fosforilación oxidativa, el metabolismo de ácidos grasos y la adipogénesis disminuidas en el grupo “Grave” (Tabla 8). Además, esto se correlaciona con lo observado en estudios previos basados en ciencias ómicas, en los que se ha demostrado que las células inmunes en pacientes con asma o un elevado estado de inflamación cambian su metabolismo a glucólisis aeróbica (también conocida como “Metabolismo de Warburg”) para hacer frente a la demanda de síntesis de precursores biológicos, aumentando la producción de lactato en presencia de oxígeno¹¹³. Esta regulación positiva de la glucólisis ocurre tras la activación inflamatoria de las células de origen mieloide y linfoide. Por el contrario, los grupos de células inmunes reguladoras y / o antiinflamatorias tienen más activado el metabolismo oxidativo¹¹⁴ (Figura 22).

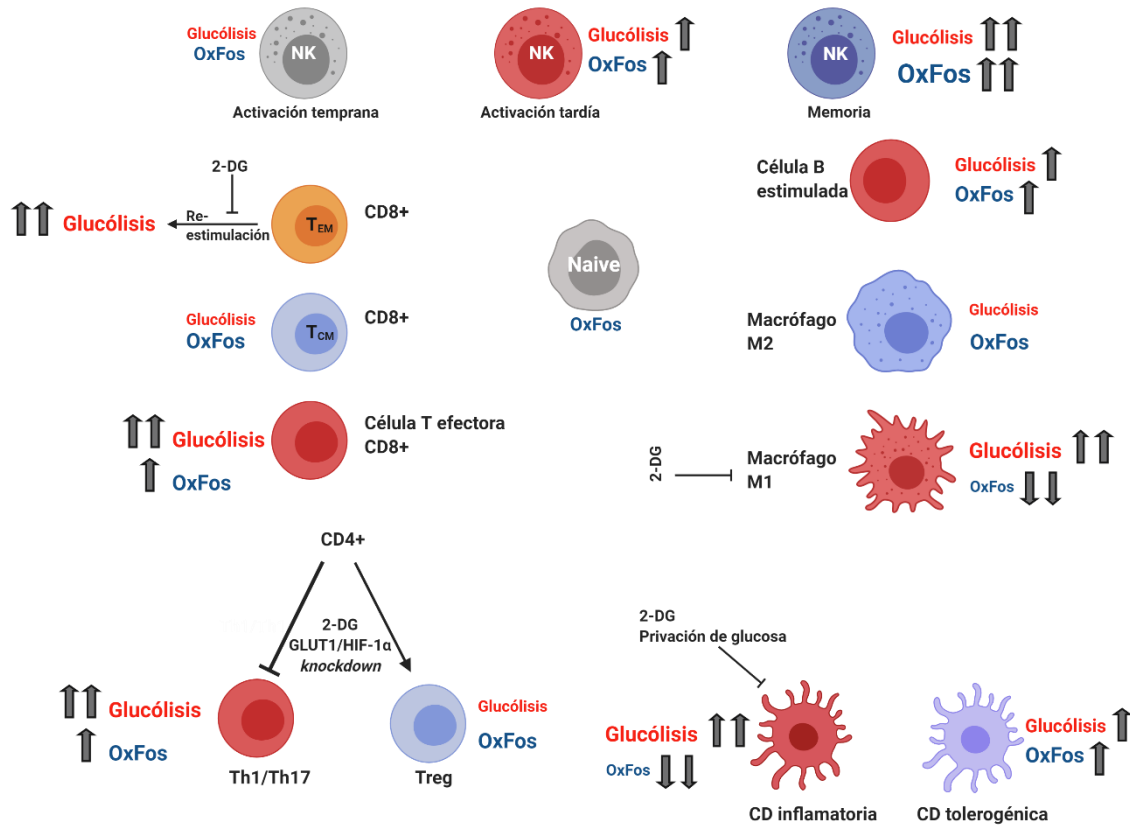


Figura 22. Metabolismo de Warburg inmunológico. T_{EM}: célula T de memoria efectora; T_{CM}: célula T de memoria central; OxFos: oxidación fosforilativa; NK: célula natural killer; CD: célula dendrítica; 2-DG: 2-deoxy-D-glucosa; GLUT1: transportador de glucosa 1; HIF-1α: subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia. Figura adaptada de Kornberg MD. *The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. WIREs Syst Biol Med.* 2020;e1486.

Además, se observó también una disminución en genes relacionados con la modificación de histonas (*HIST1H2BH* y *HIST1H3H*) y además en el análisis de rutas biológicas, la reparación de DNA estaba negativamente correlacionada con el grupo “Grave”, sugiriendo modificaciones en rutas de regulación, coincidiendo con lo observado en otros estudios de asma, atopia y alergia, en los que se sugiere que la modificación de histonas juega un papel importante en la regulación de células implicadas en la inflamación alérgica (células T y macrófagos) y aquellas que participan en la remodelación de las vías aéreas (miofibroblastos) y además existe una relación directa entre dicha modificación y los fenotipos alérgicos^{115,116}.

Por último y sorprendentemente al tratarse de CMSP, identificamos un grupo de transcritos disminuidos en el fenotipo grave relacionado con las plaquetas y sus funciones (*Cluster 3*, Figura 17C). Entre ellos se encontraban *GP1BA*, *GP9* y *SELP*,

involucrados en la formación de complejos de adhesión con el endotelio, varios receptores presentes en las plaquetas como *GP6* y *P2RY12*¹¹⁷, transcritos asociados a la agregación plaquetaria (*ITGB4*, *ITGA2B*)¹¹⁸, a la síntesis de HETE-12 y Tromboxano A2 (*ALOX12*, *PTGS2*)¹¹⁹ y también transcritos involucrados tanto en el cambio de forma producido por la activación plaquetaria como la secreción de gránulos asociada a este proceso (*MYL9*, *SDPR*, *RAB27B*)^{120,121}. Además, cuando se llevó a cabo el análisis de rutas biológicas, los resultados obtenidos por GSEA e IPA mostraron varias rutas asociadas a esta población celular y a la coagulación. En consonancia con estos resultados, a nivel metabolómico se encontró una disminución de esfingosina en el grupo “Grave”. La esfingosina es precursora de la esfingosina 1-fosfato (S1P), por lo que su disminución sugiere una síntesis continua de S1P. Diversos estudios han demostrado el papel de la S1P en inflamación y además se ha visto que las plaquetas son capaces de producirla, almacenarla y liberarla por un receptor ABC^{122–124}. Además, las plaquetas son capaces de degradarla mediante su receptor LPP1¹²⁵ (Figura 23).

Todos estos resultados en conjunto sugieren que el grupo “Grave” tiene unas características transcriptómicas que los hace diferentes al resto de grupos alérgicos y a los sujetos no alérgicos. Entre estas características destacan una alteración del metabolismo energético y de la regulación epigenética y especialmente, una alteración de las funciones plaquetarias, que se encontraban disminuidas en estos pacientes, sugiriendo un posible agotamiento plaquetario.

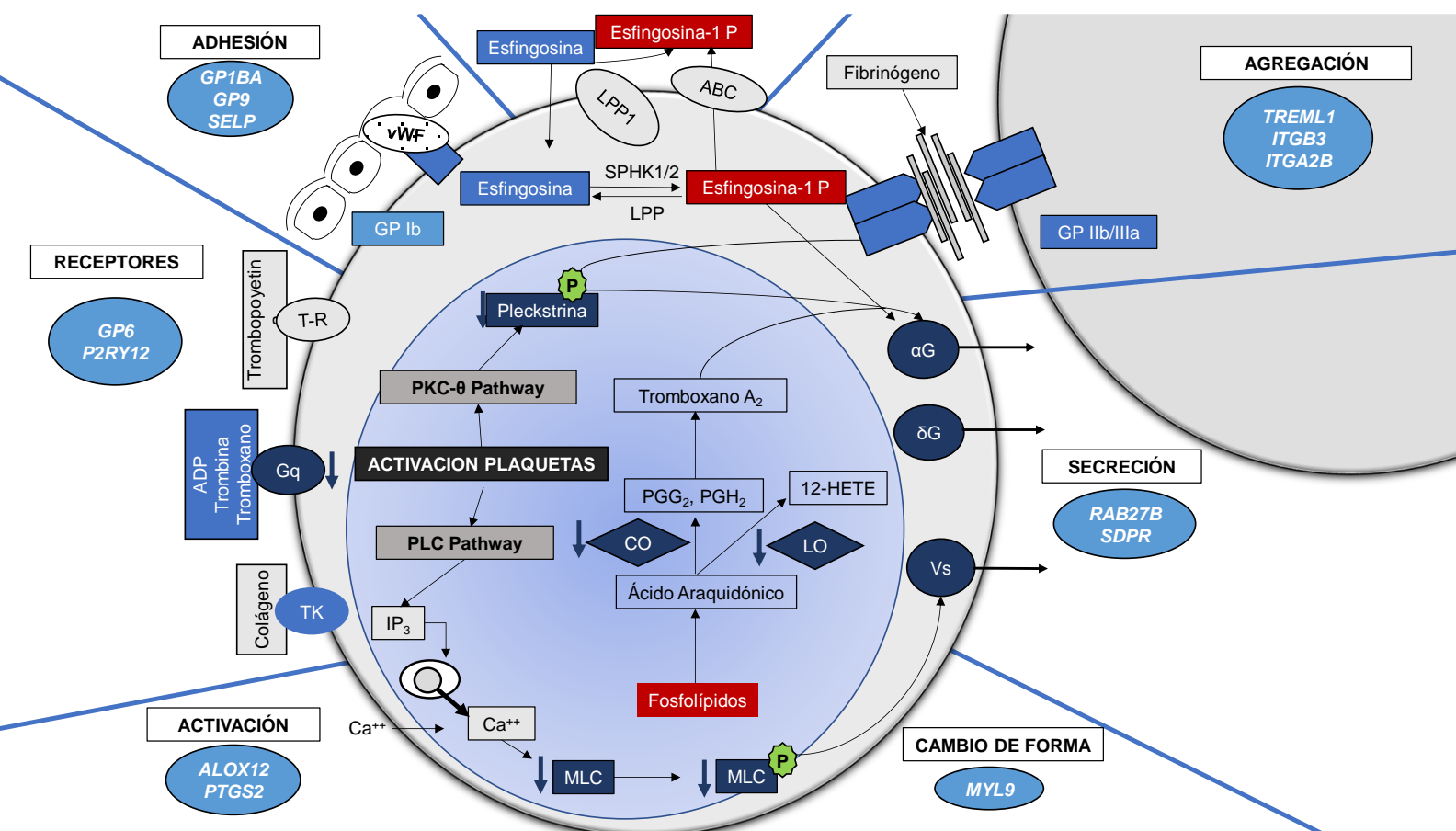


Figura 23. Representación esquemática del mecanismo de disfunción plaquetaria propuesto en el fenotipo "Grave". Las moléculas y funciones representadas en azul están disminuidas: los metabolitos y transcritos con una expresión disminuida se representan en azul claro. Las moléculas asociadas indirectamente con una disminución en los transcritos se representan en azul oscuro y se marcan con una flecha hacia abajo. Los metabolitos aumentados están marcados en rojo. Todas las funciones están divididas por líneas azules y los transcritos involucrados disminuidos asociados se muestran dentro de la elipse azul. Las vías de activación plaquetaria están representadas dentro de círculo azul claro. 12-HETE: ácido 12-hidroxi-eicosatetraenoico; ABC: transportador ABC; CO: ciclooxigenasa; GP: glicoproteína; Gq: receptor de proteína G; IP3: inositol trifosfato; LO: lipoxigenasa; LPP: fosfatasa de fosfato lipídico; MLC: proteína de cadena ligera de miosina; PGG2: prostaglandina G2; PGH2: prostaglandina H2; PKC - θ : proteína quinasa C θ ; PLC: fosfolipasa C; SPHK1/2: esfingosina quinasa 1/2; TK: receptor de tirosina quinasa; T-R: receptor de trombopoyetina; Vs: vesículas; vWF: factor von Willebrand; α G: gránulos alfa; δ G: gránulos densos.

Nos resultó especialmente sorprendente identificar transcritos de plaquetas en CMSP aisladas por gradiente de Ficoll, ya que, aunque puede existir cierta contaminación plaquetaria, ésta es mínima según las indicaciones del fabricante (Ficoll-Paque, GE Healthcare™), al tener las plaquetas una densidad mucho menor que las CMSP. Sin embargo, por multitud de estudios se conoce que las plaquetas interactúan con otros tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos y monocitos, lo que podría explicar

su presencia en la capa de CMSP¹²⁶⁻¹²⁸. Sin embargo, es posible que estas diferencias que observamos pudieran ser debidas a la variabilidad técnica al llevar a cabo el gradiente de Ficoll. Por esta razón, nos propusimos en la Fase II de este estudio analizar específicamente la población plaquetaria en otro modelo de progresión de alergia respiratoria utilizando el mismo enfoque ómico. En este caso, se utilizó un modelo de alergia a gramíneas sin alergia alimentaria, donde la gravedad de la misma se estableció en función de la polisensibilización de los pacientes y la respuesta a tratamiento, considerándose como graves aquellos pacientes que presentaban varias sensibilizaciones y que no respondían adecuadamente al tratamiento de la clínica habitual. Se establecieron por lo tanto tres grupos de experimentales: “No alérgico”, “Moderado” y “Grave”. Dichos pacientes se sometieron a un procedimiento de aféresis el cual nos permitió obtener la población de plaquetas sin contaminación de otros tipos celulares y realizar su análisis transcriptómico.

Los cambios más significativos a nivel de GDEs se encontraron en plaquetas entre los grupos alérgicos con respecto al grupo “No alérgico” y en concordancia con los resultados obtenidos en la Fase I de este estudio se observó que la mayoría de transcritos plaquetarios diferencialmente expresados se encontraban disminuidos en el grupo “Grave” (Figura 21B). Se identificaron también *clusters* característicos del fenotipo “Grave” (*Clusters 1 y 3*, Figura 21B). En el *Cluster 1* se identificó una disminución de transcritos relacionados con la regulación de la agregación plaquetaria (*FNIP2, PREX1*)¹²⁹, del transcrito *GUSBP2*, que interacciona con genes relacionados con la inflamación y ha sido descrito como alterado en pacientes con asma^{130,131} y también de genes relacionados con la coagulación y la angiogénesis (*RECK, HABP2*)^{132,133}. Por el contrario, el *Cluster 3* contenía transcritos aumentados en el grupo “Grave” con respecto a los otros dos fenotipos e incluía transcritos relacionados con la activación plaquetaria como *GSTA7P*^{134,135} y *EPAS1*, también conocido como *HIF-1 α* , cuyo aumento se relaciona con el Metabolismo de Warburg¹³⁶. Además se llevó a cabo un análisis de rutas biológicas con IPA, que indicó que rutas relacionadas con el metabolismo energético (Transporte de D-glucosa, concentración de triacilglicerol), la respuesta inflamatoria, la proliferación linfocitos B y de células endoteliales y la activación de linfocitos, entre otras, se encontraban disminuidas en el grupo “Grave” con respecto al grupo “No alérgico”, apoyando los resultados previamente obtenidos durante la Fase 1 y estudios previos que describen

alteraciones de funciones plaquetarias en pacientes alérgicos asmáticos^{21,137}, sugiriendo un papel fundamental del metabolismo energético y apuntando a una disminución de la agregación y activación plaquetaria así como de la respuesta inflamatoria en los pacientes graves (Tabla 9). Esta disminución de transcritos plaquetarios podría sugerir que existe alguna alteración en el sistema de reparación en los pacientes graves como se ha visto en algunos estudios, en los que se describe un fenómeno de agotamiento por una continua activación plaquetaria^{138,139}.

Por otro lado, en el caso de los pacientes moderados, las rutas de proliferación de células endoteliales, la vasculogénesis y de la hiperglicemia se encontraban aumentadas en comparación con el grupo “No alérgico”, sugiriendo que estos pacientes tienen un estado inflamatorio mayor (Tabla 9), lo cual es lógico ya que la exposición alérgica aumenta el estado inflamatorio a nivel sistémico¹⁴⁰.

En cuanto a las diferencias entre el grupo “Grave” y el grupo “Moderado”, se identificaron 24 DEGs, principalmente relacionados con alteraciones hematológicas (trombocitopenia inmune) e inflamación (fibrosis pulmonar, fibrosis celular), pero sin ser posible identificar en que grupo experimental aumentaban o disminuían al ser un número muy pequeño de transcritos y no poder computarse el *Activation Z-Score*.

Una de las limitaciones de la Fase II de este estudio, fue sin duda el número de pacientes incluidos, que se vio limitado al no poder finalizar el reclutamiento por la crisis del Covid-19. Además, dentro de este proyecto en el laboratorio se están realizando estudios metabolómicos y proteómicos de plaquetas que ayudarían a ampliar y entender mejor los resultados obtenidos.

En resumen, en este trabajo, se han descrito tanto nuevos posibles biomarcadores que pueden ser útiles para la identificación de fenotipos alérgicos graves, como nuevos mecanismos que apuntan a una disfunción de las plaquetas junto con un metabolismo proteico alterado y un cambio a Metabolismo de Warburg en pacientes que presentan un fenotipo alérgico inflamatorio grave, abriéndose la posibilidad de nuevas estrategias de intervención. Una posibilidad sería la estabilización del sistema inflamatorio y de reparación, utilizando suplementos que sirvan para reponer precursores metabólicos que se consumen rápidamente en estos fenotipos graves y que otros estudios ya señalan¹⁴¹⁻¹⁴³. Otro posible tratamiento podría ser la administración del PRP de sujetos sanos para reponer o mejorar las funciones

plaquetarias en los pacientes graves. Este tratamiento ya se utiliza en otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide¹⁴⁴.

Además, el metabolismo energético podría constituir una nueva diana farmacológica, ya que en otros estudios de pacientes con fenotipos alérgicos graves como en el caso de la alergia a ácaros así como en modelos animales de alergia alimentaria se han observado resultados similares^{145,146}, sugiriendo que esta firma no es algo particular del modelo utilizado en este trabajo sino que es común a los mecanismos inflamatorios subyacentes a los fenotipos de alergia grave.

Sin embargo, son necesarios más estudios en otros modelos de gravedad alérgico así como estudios funcionales de la población plaquetaria para entender el papel que juegan en la progresión alérgica y plantear nuevas estrategias de intervención que las involucren.

CAPÍTULO II: BIOMARCADORES TRANSCRIPTÓMICOS ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON INMUNOTERAPIA SUBLINGUAL

Materiales y Métodos

1. Reclutamiento de pacientes

Se reclutaron un total de 47 pacientes de los cuales 31 continuaron durante todo el proyecto. Los pacientes alérgicos fueron reclutados por el Hospital Universitario La Princesa y el Hospital Clínico Universitario San Carlos (Madrid, España). Se realizó un estudio exploratorio aleatorizado de fase IV, doble ciego y controlado con placebo. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética de los hospitales involucrados.

1.1 Criterios de inclusión y de exclusión del estudio

Los criterios de inclusión fueron una historia clínica de rinitis o rinoconjuntivitis mediada por IgE inducida por polen de gramíneas con o sin asma de al menos un año antes de la entrada al ensayo (temporada de polen 2012), una IgE específica positiva contra *Phleum pratense* (sIgE \geq Clase 2) \geq 0,70 kU / l), y SPT positivo (Soluprick SQ, ALK) a *Phleum pratense*. Se excluyeron del estudio a aquellos sujetos que habían recibido previamente inmunoterapia o tenían un historial clínico de rinitis alérgica o asma perenne.

2. Diseño del estudio

Para la realización de este estudio, se trataron a los 47 pacientes durante dos años con tratamiento (GRAZAX® (*Phleum pratense*, 75,000SQ-T tablets ALK, Hørsholm, Denmark) o placebo. El estudio doble ciego controlado por placebo se dividió en 8 visitas (V) al correspondiente servicio de alergia para la extracción de diferentes muestras: En la primera visita (V1) se realizó el cribado y la aleatorización de los pacientes en dos grupos según el tratamiento a recibir -Activo y Placebo-. Durante la V2 (T0 de ahora en adelante) se inició el tratamiento y se extrajo una primera muestra de sangre total. De la V3 a la V8 se extrajo una muestra de suero además de la muestra de sangre total a cada paciente. Se obtuvieron muestras fuera de la estación polínica de gramíneas (EPG) en V3, V4, V6 y V8, correspondientes a 1 mes, 4 meses, 12 meses y 24 meses después del inicio del tratamiento. Las muestras extraídas en V5 y V7 se obtuvieron durante dos estaciones polínicas consecutivas de polen de gramíneas (EPG I y EPG II) (Figura 24). De los 47 pacientes incluidos al inicio del

estudio solamente completaron todas las visitas 31 de ellos. De estos 31 pacientes, 14 fueron incluidos en el grupo de tratamiento activo con IT mientras que los 17 restantes se incluyeron en el grupo placebo. En ambos casos, la posología era de una dosis diaria durante dos años.

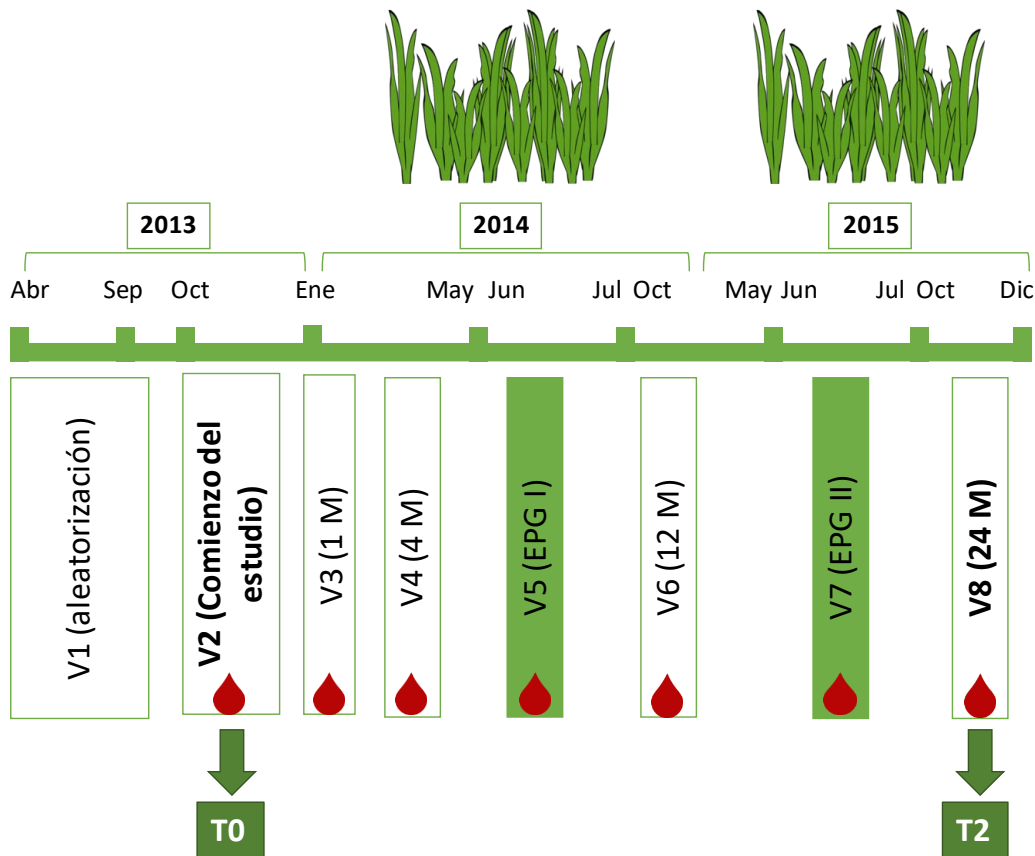


Figura 24. Diseño del estudio de inmunoterapia sublingual. V: visita; M: mes; EPG: estación polínica de gramíneas

2. Análisis transcriptómico

Se siguieron los protocolos para CMSP descritos en el Capítulo I Apartado 3 de la sección Materiales y Métodos (“Análisis transcriptómico”).

2.1 Recogida de muestras

El estudio consistió en 8 visitas (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 y V8). Para este trabajo, se utilizaron muestras de sangre total (20 ml) de la V2 (momento previo antes de iniciar el tratamiento, T0) y la V8 (después de dos años de tratamiento, T2) para obtener tanto CMSP como plasma.

2.2 Validación de resultados por qPCR

Se seleccionaron 11 genes diferencialmente expresados en las comparaciones “Monosensibilizados vs Polisensibilizados T0” y “Monosensibilizados T2 vs Monosensibilizados T0”. Tanto el diseño de los oligos, como la RT-PCR y los experimentos de qPCR se realizaron siguiendo los mismos protocolos descritos en el Capítulo I apartado 4.11 (Tabla 10).

Tabla 10. Información oligos para validación por RT-PCR de los resultados obtenidos en la Fase I del estudio. Ta: temperatura de anillamiento.

| Gen | Oligos | Secuencia | Amplicon | TM | %GC | Ta Producto | Fold Change |
|---------------|-------------|-------------------------|----------|------|------|----------------|-------------|
| GBP5 | SENTIDO | GCCATAATCTCTTCATTCA | 84 | 56.2 | 36.8 | 54.4 | -2.16 |
| | ANTISENTIDO | CTTCTTCAGCCTGTATTC | 84 | 56.1 | 44.1 | | |
| ABLIM1 | SENTIDO | GCTCCTTGTCTCTACTG | 101 | 58.1 | 50 | 54.9 | 2.22 |
| | ANTISENTIDO | CATTCTGTTCCCTTCTCTT | 101 | 58.2 | 42.1 | | |
| CAPN3 | SENTIDO | TTCATCTGCTGCTTCGTTA | 75 | 60.9 | 42.1 | 55.7 | 2.69 |
| | ANTISENTIDO | GATACCATCTCCATCCTTGT | 75 | 60.3 | 45 | | |
| PPBP | SENTIDO | TTCTATTCTAACACAACCTTGGT | 193 | 59.2 | 31.8 | 54.8 | 3.12 |
| | ANTISENTIDO | AGGACTAAGACACTGAGAG | 193 | 58.9 | 47.4 | | |
| GBP1 | SENTIDO | CAGAGGAAGGTGGAAGAA | 95 | 59.6 | 50 | 55.2 | -3.17 |
| | ANTISENTIDO | GGATGAACTGAACAATAAGAGA | 95 | 59.7 | 36.4 | | |
| IDO1 | SENTIDO | GAGCAGACTACAAGAATG | 146 | 56.1 | 44.4 | 55.7 | -2.31 |
| | ANTISENTIDO | TTAGCAATGAACATCCAG | 146 | 56 | 38.4 | | |
| SPP1 | SENTIDO | AATGATGAGAGCAATGAG | 114 | 55.7 | 38.9 | 55.4 | -3.37 |
| | ANTISENTIDO | GTCTACAACCAGCATATC | 114 | 55.9 | 44.4 | | |
| PLIN3 | SENTIDO | GCCTCATTGTAGAGTAGAA | 98 | 57.4 | 42.1 | 55.5 | -2.37 |
| | ANTISENTIDO | AGTTGTGGGTGAAGTTTA | 98 | 57.3 | 38.9 | | |
| HTRA1 | SENTIDO | CCTTCTGTATCCTATGTA | 139 | 52.8 | 38.9 | 55.4 | -3.59 |
| | ANTISENTIDO | CTATCTACGCATTGTATC | 139 | 53.1 | 38.9 | | |
| PAPSS2 | SENTIDO | TGGCTCACATCAAGATTCT | 91 | 60.3 | 42.1 | 54.8 | -2.48 |
| | ANTISENTIDO | CCAGTCAGGTCTTCAACA | 91 | 60.3 | 50 | | |
| KRT72 | SENTIDO | ACTACAAGAAGAGGTATG | 144 | 53.8 | 38.9 | 56.9 | 2.66 |
| | ANTISENTIDO | TAATCTCATCTGTCAAGG | 144 | 54.2 | 38.9 | | |

Resultados

1. Clasificación de pacientes

Los pacientes involucrados en el estudio fueron clasificados según el tratamiento asignado. Aquellos pacientes que recibieron el tratamiento con ITSL fueron clasificados como “activo” (n=14) mientras que los sujetos que recibieron placebo se clasificaron como “placebo” (n=17).

Además de esta clasificación, los participantes se estratificaron según su perfil de sensibilización alérgica generado mediante la técnica ImmunoCAP ISAC: aquellos pacientes que presentaban únicamente sensibilización a *Phleum pratense* fueron clasificados como Monosensibilizados (Mono) y los pacientes que tenían sensibilizaciones adicionales a alérgenos alimentarios, epitelios, ácaros u otro tipo de pólenes fueron considerados Polisensibilizados (Poli). Todos los datos referidos a estos pacientes están recogidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Información de los pacientes incluidos en el estudio a dos años de ITSL con Grazax®. Mono: Monosensibilizados; Poli: Polisensibilizados; Ced: Cedar; Cip: Ciprés; Ole: Olea; Pla: Platanus; Sal: Salsola; Plan: Plantago; Phl: Phleum pratense; D. f: Dermatophagoides farinae; D. pt: Dermatophagoides pteronyssinus; Lep: Lepidoglyphus destructor; SAO: Síndrome de Alergia Oral; SL: Sublingual. &: Reacciones reportadas durante los dos años de tratamiento.

| ImmunoCAP ISAC | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-------------|------|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|--------|--------------|--|
| Paciente | Edad/Sexo | Tratamiento | Asma | Perfil de sensibilización | Phleum pratense | Estacional múltiple | Perennes | | | Reacciones adversas ^{&} |
| | | | | | | | Epitelio animal | Ácaros | Panalérgenos | |
| P.1 | 31/M | Activo | No | Mono | Phl | | | | | Picor en la garganta |
| P.2 | 47/M | Activo | Sí | Poli | Phl | | Perro | | | Picor en la garganta |
| P.3 | 35/H | Placebo | Sí | Poli | Phl | | | D. pt | Profilina | Dolor epigástrico |
| P.4 | 39/M | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Cip | | | Profilina | No |
| P.5 | 51/M | Activo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole | Perro | Blomia | | Prurito oral, edema labial y SL |
| P.6 | 22/M | Activo | | Poli | | Phl, Cip, Ole | Gato | | | Picor en la garganta, disfagia, disnea |
| P.7 | 33/H | Placebo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole | Gato | Lep | Profilina | Prurito oral |

| | | | | | | | | | | |
|------|------|---------|----|------|-----|------------------------------|-------|---------|-----------------------|---|
| P.8 | 50/M | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Pla, Sal | | | Profilina | No |
| P.9 | 28/M | Placebo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip, Pla, | | | | Edema SL |
| P.10 | 25/M | Activo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Plan | Perro | | Profilina | Edema SL, disnea, sensación de cuerpo extraño |
| P.11 | 37/M | Activo | Sí | Poli | Phl | | | D. pt | | disfagia, dificultad respiratoria |
| P.12 | 32/H | Activo | Sí | Poli | | Phl, Cip | | | | No |
| P.13 | 25/H | Activo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip, Pla | | | | Edema SL, prurito faríngeo, prurito lingual, prurito oral |
| P.14 | 38/M | Placebo | No | Poli | | Phl, Cip | | | | No |
| P.15 | 30/M | Activo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole | | | | Prurito oral |
| P.16 | 41/H | Placebo | No | Mono | Phl | | | | Polcalcina, Profilina | No |
| P.17 | 59/H | Activo | No | Mono | Phl | | | | | Prurito oral, comezón lingual |
| P.18 | 34/H | Activo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Pla, Sal | Perro | | | Prurito oral, dolor abdominal |
| P.19 | 19/M | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Pla, | Gato | D. f/pt | | No |
| P.20 | 28/H | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Pla | | | | No |
| P.21 | 21/M | Placebo | Sí | Mono | Phl | | | | | Prurito |
| P.22 | 39/M | Placebo | No | Mono | Phl | | | | | No |
| P.23 | 36/M | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Ole | | | | SAO |
| P.24 | 24/H | Placebo | No | Poli | | Phl, Ced, Cip | | | | No |
| P.25 | 47/M | Placebo | Sí | Mono | Phl | | | | LTP | No |
| P.26 | 43/M | Placebo | No | Mono | Phl | | | | | Sed |
| P.27 | 53/H | Activo | No | Mono | Phl | | | | | Prurito oral y facial, sensación de cuerpo extraño, edema faríngeo, dificultad respiratoria |
| P.28 | 53/H | Activo | No | Mono | Phl | | | | | No |
| P.29 | 38/H | Activo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Pla, | Perro | | | Prurito faríngeo |
| P.30 | 33/M | Placebo | Sí | Mono | Phl | | | | | No |
| P.31 | 34/H | Placebo | Sí | Poli | | Phl, Ced, Cip, Ole, Pla, | Perro | | | No |

2. Perfil transcriptómico inducido por tratamiento con ITSL en pacientes alérgicos a gramíneas

Con el objetivo de analizar los mecanismos subyacentes al tratamiento de inmunoterapia sublingual, se comparó el perfil transcriptómico de los pacientes pertenecientes que recibieron tratamiento activo con inmunoterapia sublingual (grupo “Activo”) frente a los pacientes que recibieron placebo (grupo “Placebo”) tras dos años de tratamiento. Cómo se observa en la Figura 25, se encontraron únicamente 6 transcritos diferencialmente expresados entre los dos grupos. Además, la clasificación de los pacientes mediante el algoritmo de *hierarchical clustering* no mostraba ninguna separación entre “Activo” y “Placebo”. Por otro lado, debido al poco número de transcritos diferenciales entre los dos grupos, no fue posible asociarlos a rutas biológicas.

Este resultado muestra que tras dos años de ITSL, no existen cambios significativos a nivel transcriptómico.

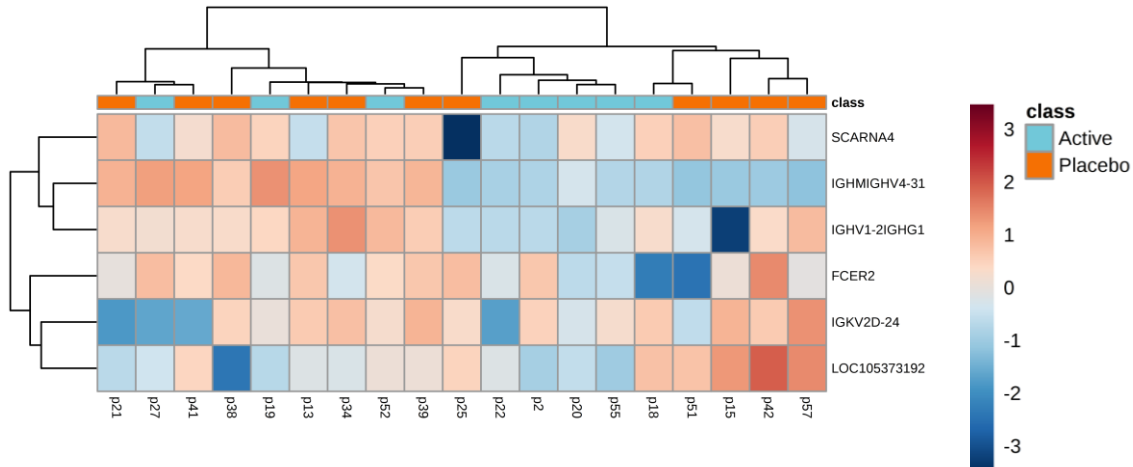
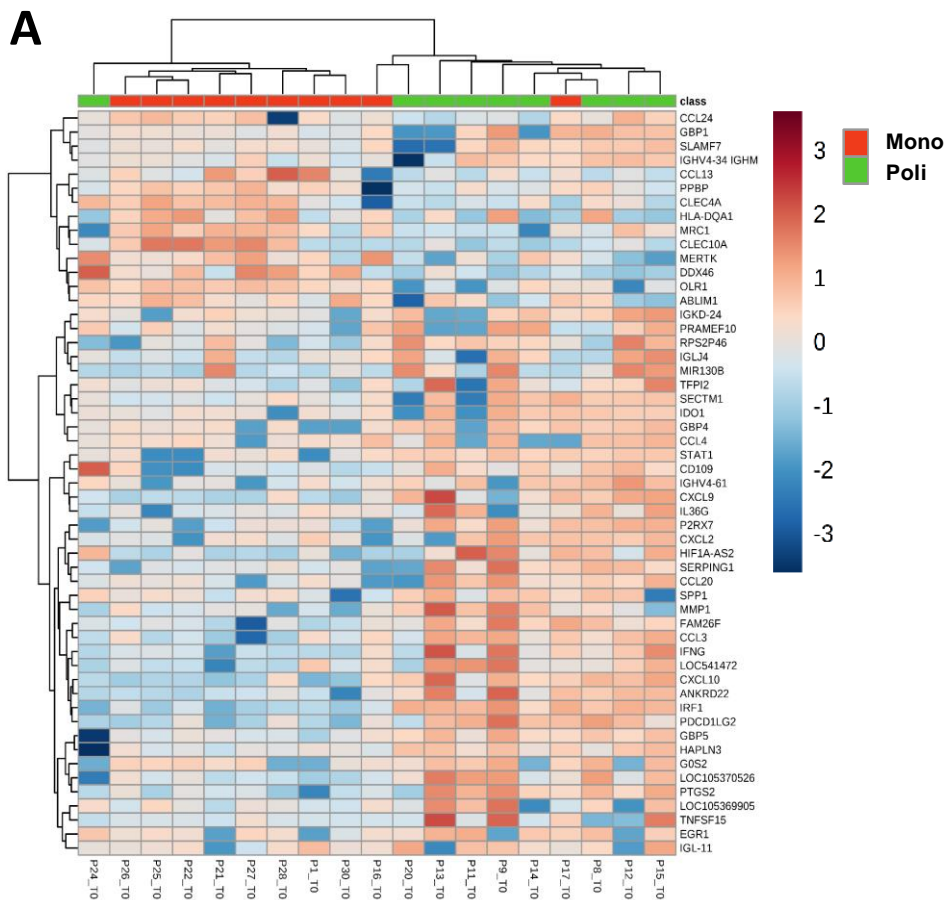


Figura 25. Heatmap de los transcritos diferencialmente expresados (p -valor <0.05) generado con MetaboAnalyst, usando *hierarchical clustering* como método de agrupación de transcritos y muestras. Los transcritos cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul.

3. Los pacientes Mono y Polisensibilizados presentan un perfil transcriptómico diferente

Los pacientes del estudio tenían inicialmente perfiles de sensibilización alérgica distintos, tal y como se ha explicado en el punto 1 de esta misma sección. En la población de estudio había pacientes con sensibilización únicamente a *Phleum pratense* (Monosensibilizados) y pacientes que presentaban sensibilizaciones adicionales a otros alérgenos (Polisensibilizados), principalmente al polen de *Cupressus arizonica* y *Olea europaea* y a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y/o *Dermatophagoides farinae*). Estos últimos, al tener varias sensibilizaciones, sufrían una mayor exposición alérgica a lo largo del año, por lo que se esperaba que su perfil de marcadores sistémicos de inflamación fuese distinto al de los pacientes Monosensibilizados. Por esta razón, se analizó el perfil transcriptómico de los pacientes previamente al tratamiento (T0).

Del total de transcritos analizados, se identificaron 53 diferencialmente expresados y con ellos se llevó a cabo un *hierarchical clustering* de las muestras (Figura 26A), mostrando una buena clasificación entre Mono y Polisensibilizados ya que el 85% de los pacientes eran correctamente incluidos en su grupo experimental. De estos 53 transcritos encontrados, en torno al 74% se encontraban disminuidos en el grupo "Mono". Además, se llevó a cabo el análisis de rutas biológicas utilizando los programas GSEA e IPA con el objetivo de asociar estos transcritos con cambios a nivel sistémico (Figura 26B). Los resultados de este análisis indicaron que rutas ligadas a procesos inflamatorios como la activación de leucocitos y células sanguíneas, respuesta inflamatoria, TLR y la ruta de la IL17 estaban negativamente correlacionadas (*Enrichment Score* negativo en GSEA) o inactivadas (*Activation Z-Score* negativo en IPA) en el fenotipo "Mono", apuntando a que estos sujetos presentaban un menor grado de inflamación que los pacientes "Poli" previamente al tratamiento.



B

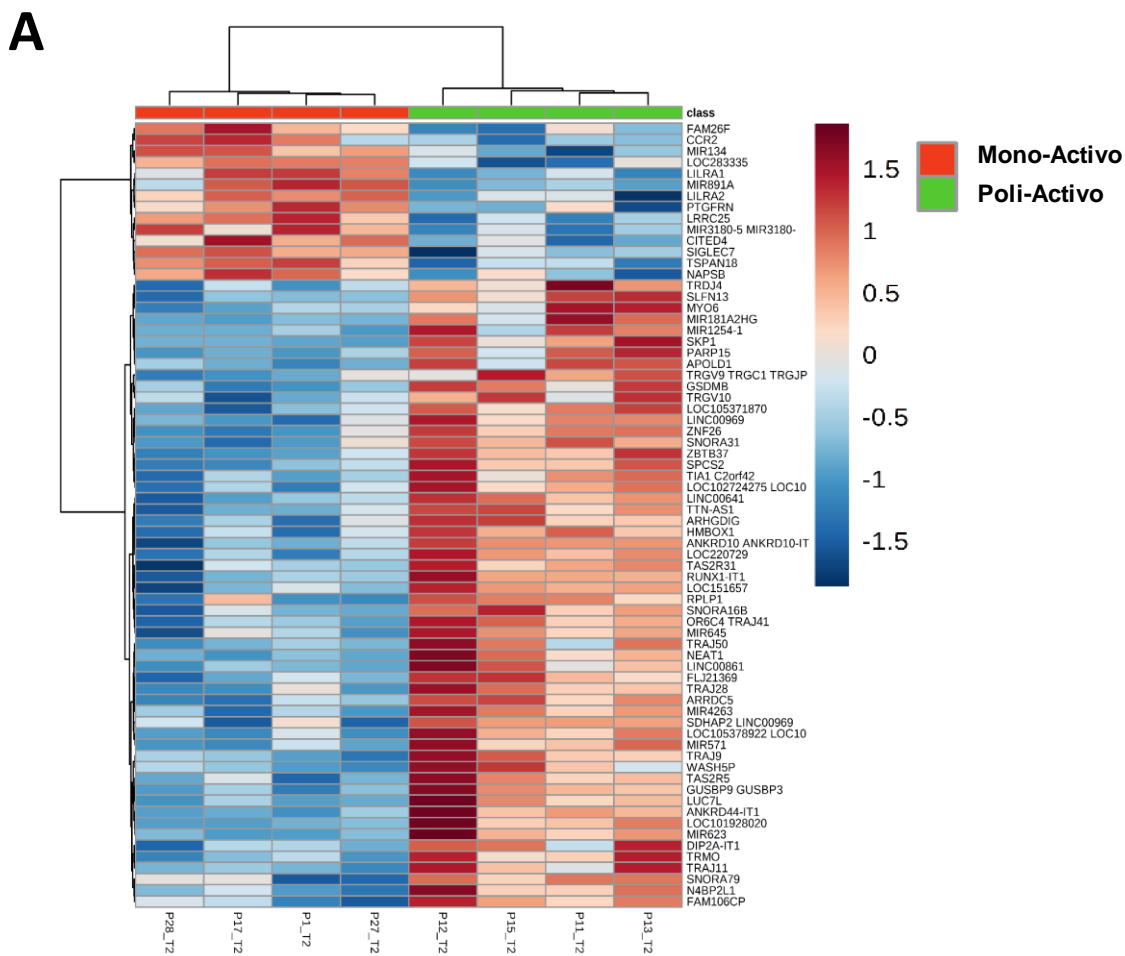
| Ruta biológica | Análisis | p-valor | Enrichment Score (ES) | Activation Z-Score |
|--|----------|----------|-----------------------|--------------------|
| Respuesta inflamatoria | IPA | 2.10E-14 | - | -2.349 |
| Activación de células sanguíneas | IPA | 1.32E-11 | - | -2.959 |
| Activación de leucocitos | IPA | 2.64E-11 | - | -2.827 |
| Migración de células presentadoras de antígeno | IPA | 5.77E-08 | - | -2.791 |
| Ruta de señalización receptor Toll-like (TLR) | GSEA | 1.60E-03 | -0.899 | - |
| Ruta de señalización IL17 | GSEA | 1.03E-02 | -0.818 | - |

Figura 26. A. Heatmap generado con MetaboAnalyst de los transcritos significativos (p -valor < 0.05) para la comparación “Mono vs Poli” a T0 usando *hierarchical clustering* como método de agrupación. Los transcritos cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul. **B.** Resultados significativos del análisis de rutas biológicas con IPA y GSEA para la comparación “Mono vs Poli” a T0 (p -valor < 0.05).

4. Los pacientes Mono y Polisensibilizados responden diferencialmente al tratamiento con ITSL

Con el objetivo de ver si la respuesta al tratamiento era diferente entre los grupos “Mono” y “Poli”, se compararon los pacientes que recibieron tratamiento activo de ambos grupos, es decir, pacientes Mono-Activos frente a Poli-Activos tras dos años de tratamiento. Los transcritos diferencialmente expresados fueron representados en la Figura 27A. Tanto muestras como transcritos se agruparon mediante el algoritmo de *hierarchical clustering*, mostrando una clara separación entre el grupo Mono-Activo frente a Poli-Activo. En cuanto al análisis de rutas biológicas, los resultados obtenidos con IPA mostraron que rutas ligadas a la infiltración y migración de linfocitos T y leucocitos, así como la polarización de células sanguíneas estaban activadas (*Activation Z-Score* positivo) en los pacientes Mono-Activos. Por otro lado, el GSEA mostraba una correlación positiva con el grupo Mono-Activo de la señalización mediada por calcio (Figura 27B).

Estos resultados en conjunto sugieren que el perfil de sensibilización alérgica influye en la respuesta al tratamiento después de dos años, apuntando a que los pacientes Mono-Activos presentan un estado de inflamación alérgica mayor que los Poli-Activos. Es necesario mencionar que la recogida de muestra a los dos años de tratamiento se llevó a cabo en septiembre, es decir, fuera de la estación polínica de gramíneas, olivo o ciprés, por lo que la aparente mejoría de los pacientes Poli-Activos podría deberse a la falta de exposición alérgica.



B

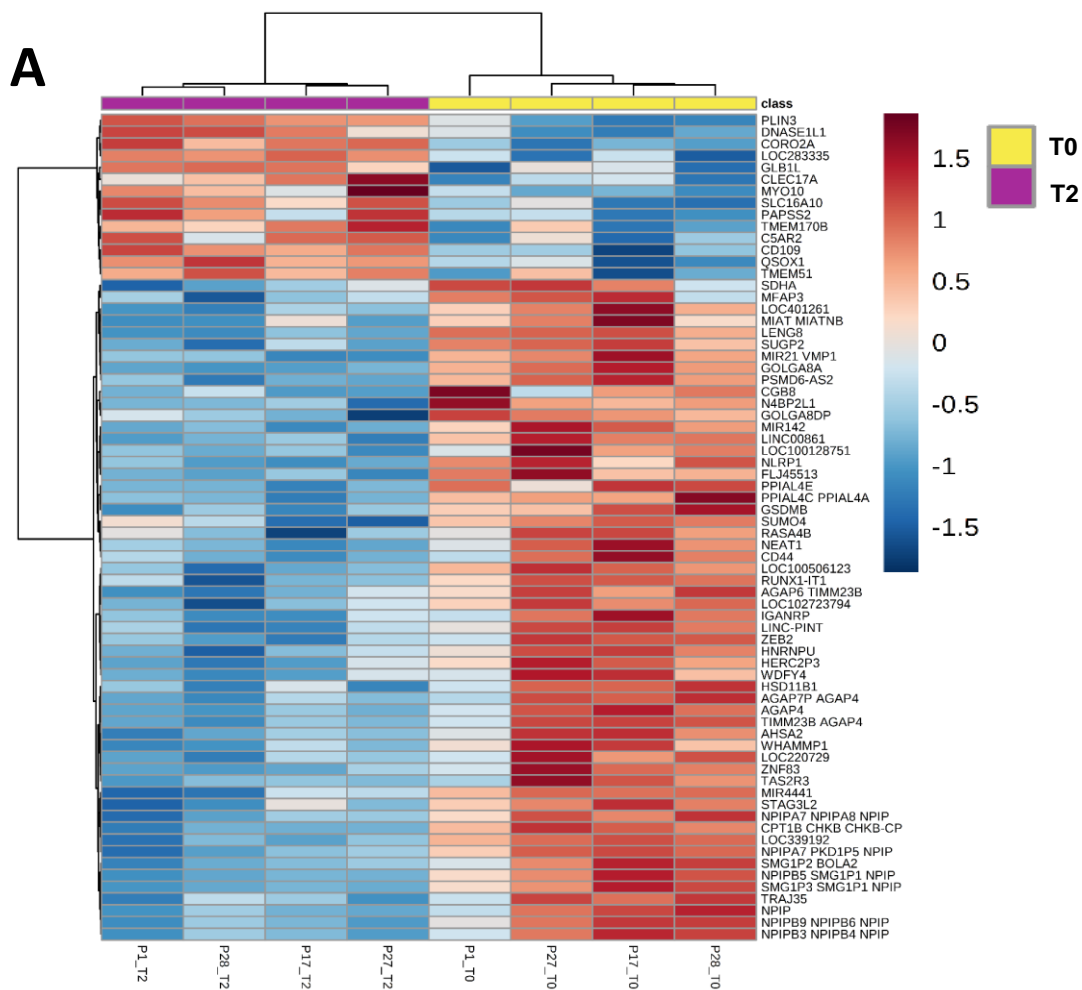
| Mono-Activo vs Poli-Activo T2 | | | | |
|---|----------|----------|-----------------------|--------------------|
| Ruta biológica | Análisis | p-valor | Enrichment Score (ES) | Activación Z-Score |
| Reclutamiento de leucocitos | IPA | 3.11E-06 | - | 2.109 |
| Migración células T | IPA | 1.23E-04 | - | 2.118 |
| Movimiento celular de leucocitos | IPA | 2.80E-04 | - | 2.162 |
| Infiltración linfocitos T | IPA | 3.57E-04 | - | 2.019 |
| Migración de linfocitos | IPA | 6.40E-04 | - | 2.035 |
| Quimiotaxis de leucocitos mononucleares | IPA | 1.07E-03 | - | 2.224 |
| Polarización de células sanguíneas | IPA | 2.31E-03 | - | 2.387 |
| Ruta de señalización del calcio | GSEA | 4.60E-03 | 0.937 | - |

Figura 27. A. Heatmap generado con MetaboAnalyst de los transcritos significativos (p -valor < 0.05) entre los grupos Mono-Activo y Poli-Activo a T2 usando *hierarchical clustering* como método de agrupación. Los transcritos cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul. **B.** Resultados significativos del análisis de rutas biológicas con IPA y GSEA para la comparación “Mono-Activo vs Poli-Activo” a T2 (p -valor < 0.05).

5. Dos años de ITSL disminuyen la activación de células efectoras en pacientes monosensibilizados

Puesto que resultados de estudios anteriores^{147,148} muestran que los pacientes monosensibilizados tienen una mejor respuesta al tratamiento con ITSL, decidimos analizar las diferencias asociadas al tratamiento en estos pacientes, comparando los pacientes Mono-Activos antes del tratamiento (T0) frente a sí mismos tras el tratamiento con inmunoterapia (T2) (Figura 28A). Como se puede observar en el heatmap de la Figura 28A se ve una clara separación entre T0 y T2, indicando que existen cambios a nivel transcriptómico asociados al tratamiento en estos pacientes. Además, la mayoría de los transcritos diferencialmente expresados se encontraban disminuidos tras los dos años de ITSL. Para identificar que rutas se habían visto afectadas por el tratamiento, se realizó el análisis de rutas biológicas, mostrando que el metabolismo de la glucosa y del ácido araquidónico estaban positivamente correlacionados con T2 mientras que rutas como la desgranulación de mastocitos y fagocitos estaban inactivadas a T2 (Figura 28B).

Estos resultados sugieren que la inmunoterapia sublingual tiene un efecto significativo a nivel de respuesta de células efectoras en los pacientes Mono-Activos.



B

| Mono-Activo T2 vs Mono-Activo T0 | | | | |
|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|--------------------|
| Ruta biológica | Análisis | p-valor | Enrichment Score (ES) | Activation Z-Score |
| Función de células sanguíneas | IPA | 2.91E-05 | - | - |
| Desgranulación de mastocitos | IPA | 8.74E-04 | - | -2.000 |
| Desgranulación de fagocitos | IPA | 1.39E-03 | - | -2.000 |
| Enfermedad metabolismo glucosa | IPA | 3.17E-03 | - | -1.982 |
| Metabolismo de purinas | GSEA | 4.29E-03 | 0.957 | - |
| Rutas metabólicas | GSEA | 5.80E-03 | 0.536 | - |
| Metabolismo del ácido araquidónico | GSEA | 4.93E-02 | 0.872 | - |

Figura 28. A. Heatmap generado con MetaboAnalyst de los transcritos significativos (p -valor < 0.05) entre los grupos Mono-Activo T0 y Mono-Activo T2 usando hierarchical clustering como método de agrupación. Los transcritos cuya expresión está aumentada se representan en rojo y los disminuidos se muestran en azul. **B.** Resultados significativos del análisis de rutas biológicas con IPA y GSEA para la comparación “Mono-Activo T2 vs Mono-Activo T0” (p -valor < 0.05).

6. Validación de resultados por qPCR

La validación de los resultados obtenidos con la técnica de microarrays se llevó a cabo mediante qPCR. El 80% de los genes seleccionados mostró el mismo patrón de expresión observado en el análisis con microarrays, por lo que los resultados obtenidos se consideran validados (Figura 29).

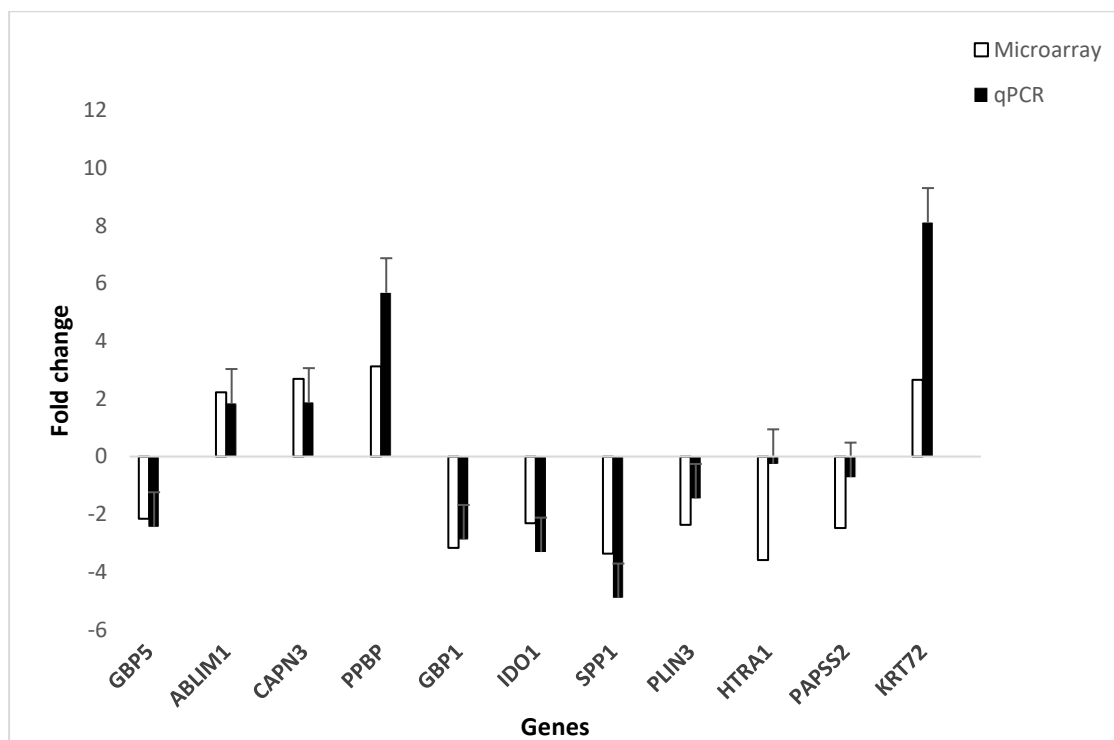


Figura 29. Validación de los datos obtenidos por microarrays mediante la técnica de qPCR. Se muestran los resultados obtenidos por microarrays (blanco) en comparación con los resultados obtenidos por qPCR (negro).

Discusión

Entender los efectos sistémicos inducidos por la ITSL es clave por diversas razones. En primer lugar, para el correcto posicionamiento de la ITSL dentro del tratamiento farmacológico en alergia. En segundo lugar, para seleccionar candidatos adecuados para este tratamiento, que tengan una alta probabilidad de responder correctamente y por ello se promueva el cumplimiento y el éxito de la intervención. Por último, esta comprensión de los efectos es necesaria para identificar posibles biomarcadores útiles para seleccionar candidatos adecuados, así como para monitorizar sus efectos y demostrar el valor de la ITSL como único tratamiento capaz de modificar la marcha de la enfermedad alérgica.

En este trabajo realizamos el análisis transcriptómico de las CMSP de pacientes incluidos en un ensayo prospectivo a dos años doble ciego y controlado por placebo, utilizando Grazax® como tratamiento activo, al ser el producto de ITSL mejor documentado y con tres ensayos clínicos prospectivos a cinco años⁴¹. Además, por estudios anteriores se conoce que su beneficio se mantiene durante dos años tras la interrupción del tratamiento al ser administrado durante tres años consecutivos, sin embargo, si se administra únicamente durante dos años, su efecto se pierde rápidamente³⁹ al igual que ocurre en el caso de la inmunoterapia subcutánea, y no hay una explicación clara para ello¹⁴⁹ (Figura 30).

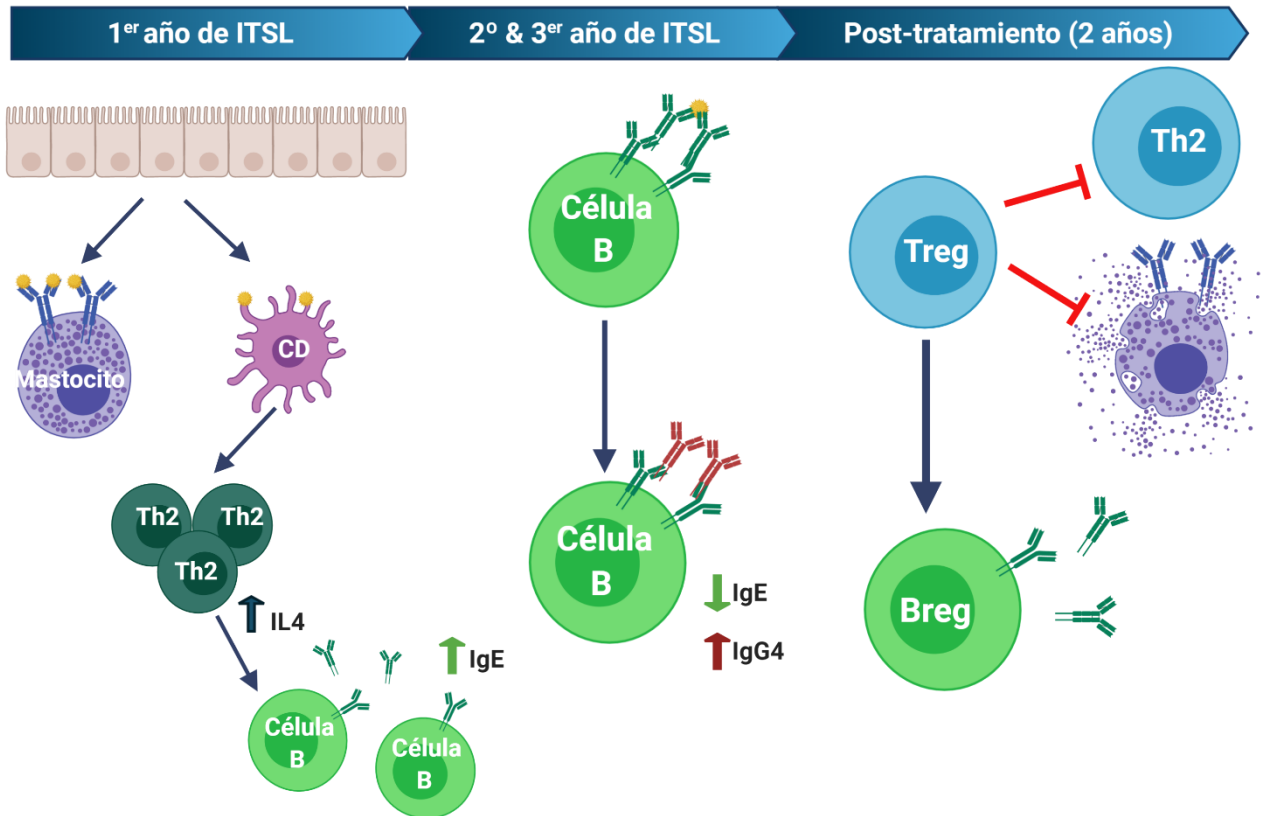


Figura 30. Esquema de la respuesta inmunológica frente al tratamiento de ITSL en un estudio a 5 años. Figura adaptada de Barber D, Rico P, Blanco C, Fernandez-Rivas M, Ibañez MD, Escríbese MM. GRAZAX®: a sublingual immunotherapy vaccine for Hay fever treatment: from concept to commercialization. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(12):2887-2895.

En un estudio prospectivo de este mismo producto publicado recientemente, se demostró una desensibilización de células efectoras y una regulación de células T tras dos años de tratamiento, sin embargo, la secuencia de estos mecanismos no estaba clara³⁸. La regulación de células T parecía establecerse en el segundo año mientras que firmas sistémicas asociadas al tratamiento como los niveles de sIgE y el recuento de eosinófilos mejoraban en el tercer año de intervención, concordando con datos de otro ensayo clínico de hiperreactividad bronquial⁴². Además, el estudio llevado a cabo por JAMA, Scadding et al basado en la administración de ITSL durante 2 años y un posterior seguimiento de 3 años, demostró que la administración durante dos años con ITSL no era suficiente para conseguir un beneficio significativo⁴¹. En línea con estos resultados, otros estudios como el ECRIT también coinciden en que son necesarios al menos 3 años de tratamiento con ITSL para obtener un beneficio sostenido¹⁵⁰. Todos estos datos apuntan a que el segundo año de intervención puede ser clave para entender los mecanismos subyacentes al efecto de la ITSL y por ello

nos propusimos en este trabajo realizar por primera vez un estudio exploratorio sobre los efectos sistémicos inducidos por ITSL tras dos años de tratamiento.

Se comparó el perfil transcriptómico de los grupos Activo y Placebo tras dos años de ITSL (T2), así como el de los pacientes monosensibilizados frente a los polisensibilizados antes (T0) y después de los dos años de tratamiento (T2).

En la comparación Activo vs Placebo no se identificaron apenas diferencias significativas tras dos años de tratamiento a nivel transcriptómico, con únicamente 6 GDEs entre los grupos y sin una separación clara entre los grupos (Figura 25), por lo que no parece existir una huella transcriptómica asociada al tratamiento.

Por otro lado, quisimos ver las diferencias existentes entre los pacientes según su perfil de sensibilización antes del tratamiento, comparando los pacientes polisensibilizados (Poli) y monosensibilizados (Mono) a T0 y encontramos que la activación de células sanguíneas, la ruta de la IL-17 y otras rutas como la activación de leucocitos, la ruta de señalización de TLR, la migración de células presentadoras de antígeno así como la respuesta inflamatoria estaban inactivadas en los pacientes monosensibilizados, sugiriendo que los pacientes polisensibilizados tienen un mayor estado inflamatorio en el momento previo a iniciar el tratamiento con ITSL, probablemente debido a que su exposición alérgica es mayor durante todo el año (Figura 26).

Además, para ver como respondían los pacientes al tratamiento según su sensibilización se analizó el perfil transcriptómico de los pacientes del grupo Mono-Activo frente a Poli-Activo a T2, observándose una huella transcriptómica clara de cada grupo (Figura 27). Rutas como la infiltración y migración de linfocitos T y leucocitos, así como la polarización de células sanguíneas y la vía de señalización del calcio se encontraban activas en los pacientes monosensibilizados tras el tratamiento, sugiriendo que tras dos años de ITSL el nivel de inflamación de estos pacientes es mayor.

Por último, se analizó la evolución de los pacientes monosensibilizados que habían recibido tratamiento activo a lo largo del año. En este caso, el análisis de rutas evidenció que las células efectoras, concretamente mastocitos y fagocitos, presentaban niveles más bajos de actividad a T2, sugiriendo que la ITSL es capaz de

inducir la desensibilización de estas células y que ésta se mantiene durante toda la fase de tratamiento activo. Estos resultados van en línea con los obtenidos en otros estudios del efecto de la ITSL llevados a cabo no solo en el caso de la alergia gramíneas sino también en modelos de alergia a ácaros, en pacientes con asma alérgico, en modelos de alergia a venenos de insectos y en modelos de otras alergias respiratorias como el polen de ambrosía¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Todos estos estudios coinciden en que existe una desensibilización temprana de mastocitos y basófilos, clave para inducir la respuesta tolerogénica asociada al tratamiento, pero que no existe apenas información acerca de los mecanismos por los cuales la inmunoterapia es capaz de disminuir la actividad de estas células efectoras. Una de las hipótesis es que los receptores de histamina (RH) pueden jugar un papel clave en la inducción de tolerancia y que además algunas inmunoglobulinas, como la IgG4, cuya concentración aumenta durante el tratamiento, pueden ser capaces de capturar el alérgeno antes de que éste entre en contacto con el receptor de IgE de basófilos y mastocitos, evitando su activación³⁴.

Otro de los objetivos de este trabajo era la identificación de nuevos biomarcadores con potencial para monitorizar el efecto producido por ITSL. Estudios anteriores han demostrado la existencia de ciertas moléculas y parámetros asociados a distintos tipos celulares que podrían ser biomarcadores potenciales asociados al tratamiento. A nivel de inmunoglobulinas, la inmunoterapia alérgeno-específica desvía la respuesta inmune hacia TRegs, produciéndose un aumento de IL-10 y TGF- β y la disminución de IgE, además de un aumento de la producción de IgG4 e IgA por células B. Además, también se ha observado un aumento en las subpoblaciones de células Treg Foxp3⁺ y Th1. Por otro lado, se ha visto que la subpoblación CD27⁻ (Th2) disminuía en sujetos tratados con inmunoterapia, mientras que la subpoblación “protectora” CD27⁺ (Th2) aumentaba. Además, las células B reguladoras IL10⁺ pueden inducir una respuesta protectora IgG4 e inhibir la proliferación de células T CD4⁺ específicas al alérgeno durante el tratamiento. A nivel de CMSP, se han identificado marcadores moleculares en asociados a CD, concretamente a una respuesta CD reguladora aumentada (*C1QA* y *FcεRIIIA*) y una respuesta CD tipo 2 disminuida (*GATA-3*, *CD141* y *RIPK4*). También se han estudiado otros posibles biomarcadores como la expresión de la enzima diamino oxidasa (*DAO*), marcador de la liberación de histamina en basófilos, cuya expresión se reduce durante los tratamientos con ITSL y con ITSC, al igual que *CD63*

y *CD203c* (Figura 31). Sin embargo, aunque estos cambios se observan de manera repetitiva durante el tratamiento con inmunoterapia, no se ha identificado su verdadera relación con la respuesta clínica, con lo que actualmente no pueden usarse como biomarcadores y además en su mayoría solo podrían ser utilizados como biomarcadores de monitorización y de respuesta post-tratamiento, no como predictores de respuesta antes de comenzar el tratamiento¹⁵⁵. En este trabajo, nos propusimos identificar biomarcadores transcriptómicos a nivel de CMSO, pero no encontramos indicadores de una mejoría sistémica clara durante los dos primeros años de intervención, en línea con los estudios que postulan que son necesarios tres años de tratamiento para obtener un beneficio sistémico. Por otro lado, existía una gran variabilidad entre individuos en cuanto a su perfil de sensibilización, siendo la polisensibilización uno de los factores de confusión más relevantes en este trabajo, ya que la inclusión de algunos de los pacientes coincidió con la estación polínica de ciprés mientras que la obtención de las muestras tras dos años de tratamiento no se realizó en la misma época. En conclusión, serían necesarios estudios con un mayor número de pacientes más homogéneos (mono o polisensibilizados) y con una duración del tratamiento de al menos tres años para poder profundizar en la búsqueda de biomarcadores asociados a ITSL.

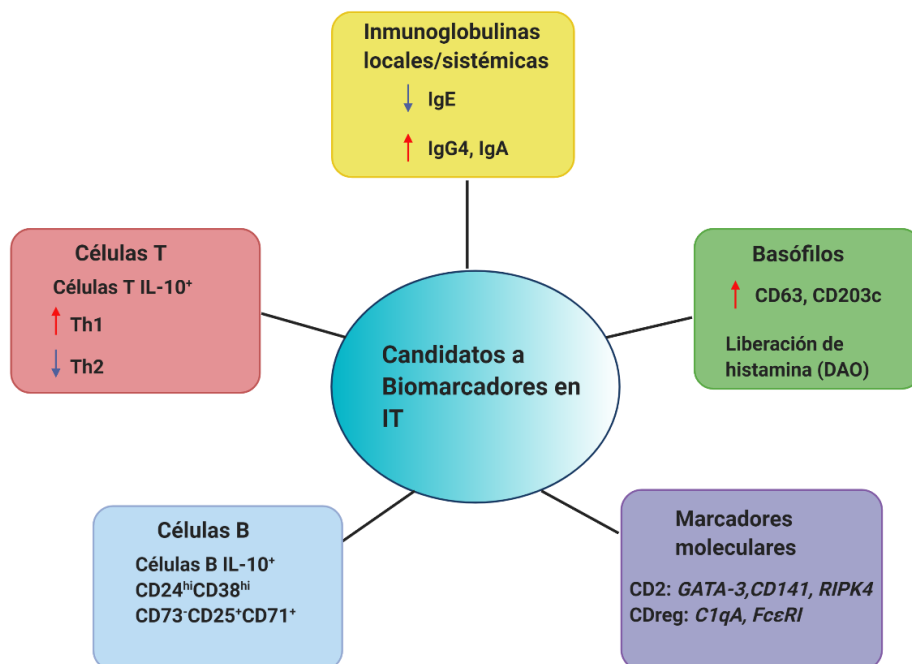


Figura 31. Posibles biomarcadores asociados al tratamiento con IT.

En resumen, en este trabajo no se ha encontrado evidencia de ninguna mejora de la firma inflamatoria sistémica, pero si una disminución de la funcionalidad de las células efectoras. Llama la atención además que esto se ha observado al analizar CMSP, sugiriendo una conexión entre células efectoras periféricas y locales. Sin embargo, esta desensibilización no se observó en los pacientes que presentaban polisensibilización (datos no mostrados), lo que concuerda con la observación clínica de que la desensibilización producida por ITSL es específica del alérgeno¹⁵⁶ (Figura 32).

Los resultados de este estudio sugieren claramente una asociación entre la administración de ITSL durante dos años y la desensibilización de células efectoras. No se detecta mejoría sistémica a nivel de CMSP, hecho que podría explicar el por qué cuando se interrumpe el tratamiento en esta fase se pierde inmediatamente el beneficio terapéutico y que explicaría muchos de los ensayos fallidos con un enfoque de regulación de células T administrando el tratamiento únicamente durante 1-2 años^{38,41}. Sin embargo, son necesarios más estudios en este campo para entender los mecanismos subyacentes asociados a esta desensibilización y que permitan comprender por qué es específica del antígeno y como se establece el efecto regulatorio a partir del tercer año de intervención.

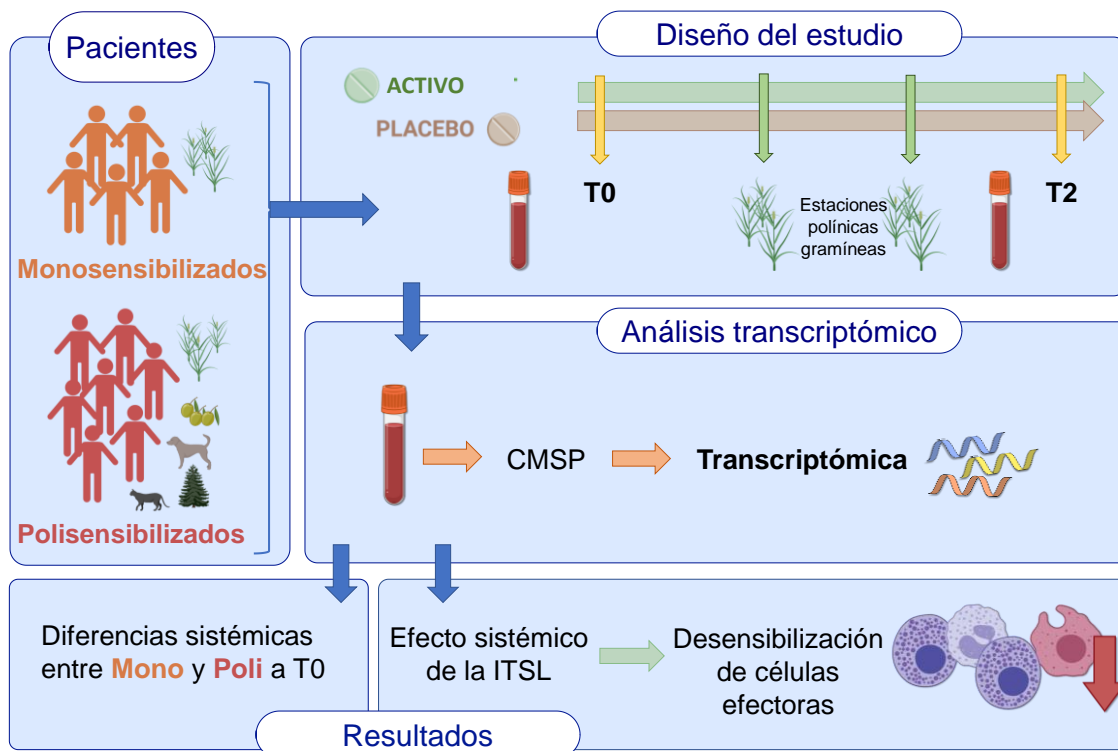


Figura 32. Esquema del estudio de ITSL analizado. Diseño del estudio y resumen de resultados. *Figura adaptada de Barker-Tejeda TC, Bazire R, Obeso D, et al. Exploring novel systemic biomarker approaches in grass-pollen sublingual immunotherapy using omics [published online ahead of print, 2020 Aug 19]. Allergy.*

Puesto que las células efectoras producen múltiples mediadores inflamatorios que contribuyen a mantener la respuesta tipo Th2 (prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas y mediadores inflamatorios), su desensibilización temprana podría ser esencial para establecer la respuesta regulatoria posterior^{157,158} pero desafortunadamente no existen hasta la fecha estudios de ITSL a largo plazo con productos específicamente basados en el reconocimiento de células T, por lo que no es posible responder a esta pregunta que sería clave para aumentar el éxito de las intervenciones con ITSL.

Por último, quizás sería útil focalizarnos en los resultados obtenidos en el Capítulo I, que sugieren una firma transcriptómica asociada a fenotipos con una alergia a gramíneas grave (metabolismo energético alterado, inflamación sistémica descontrolada y alteración en las funciones plaquetarias) para identificar y excluir de la intervención con ITSL a aquellos pacientes que la presenten. En estudios recientes^{38,159}, se ha observado que la primera fase de la ITSL se asocia con un aumento del estado inflamatorio periférico que va mejorando progresivamente y es posible que algunos pacientes no sean capaces de lidiar con este aumento si

presentan las características asociadas a fenotipos graves descritas en el Capítulo I y por ello no sean buenos candidatos para el tratamiento con ITSL. Por tanto, se necesitan estudios que validen este nuevo enfoque de biomarcadores que podría ser útil en diversas estrategias de intervención. Además, se necesitan también estudios prospectivos basados en ciencias ómicas con una población más grande para analizar en profundidad las firmas sistémicas asociadas al efecto clínico de la ITSL y que permitan entender sus mecanismos subyacentes.

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN ALERGIA A LA PROTEÍNA DE LECHE DE VACA

Materiales y Métodos

1. Reclutamiento de pacientes

131 sujetos fueron reclutados por el Hospital Universitario Infantil Niño Jesús y el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España). Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética de los hospitales involucrados.

1.1 Criterios de inclusión y de exclusión lactantes alérgicos

Se incluyeron en el estudio, 20 lactantes alérgicos de 4 a 8 meses de edad que presentaban historia clínica de reacciones alérgicas alimentarias y con SPT positivo y valores > 0.35 kU/L de IgE específica en sangre para leche de vaca, α -lactalbumina, β -lactoglobulina y/o caseína. Se excluyeron del estudio a todos aquellos lactantes que habían sido alimentados con hidrolizado por un período superior a dos semanas o habían tomado antibióticos en los tres meses anteriores a la recogida de muestra.

1.2 Criterios de inclusión y de exclusión lactantes no alérgicos

Se incluyeron en el estudio 7 lactantes de 4 a 8 meses de edad que no presentaban síntomas de alergia a proteína de leche de vaca (APLV) o patologías graves asociadas.

1.3 Criterios de inclusión y exclusión de madres y abuelas

Fueron incluidas en el estudio aquellas madres y abuelas que no hubieran tomado antibióticos durante los tres meses anteriores a la recogida de muestra.

2. Análisis gen rRNA 16S

2.1 Recogida de muestras y datos personales

Cada participante recibió un kit de recogida de muestras que constaba de un pequeño refrigerador desechable, una bolsa hermética, una bolsa para enfriar, un recipiente estéril para depositar la muestra de heces que contenía una cuchara para facilitar la recogida, papel especializado para la recogida de la muestra, un par de guantes, etiquetas y un archivo con las instrucciones para realizar correctamente el procedimiento. Se pidió a los sujetos que registraran el día en que se recogió la

muestra y evitar la contaminación con orina y papel higiénico. Las muestras fueron almacenadas en su congelador doméstico hasta la entrega en los centros participantes. Las heces de todos los lactantes fueron recogidas por sus padres e inmediatamente congeladas a -20 ° C. Se recogieron un total de 131 muestras fecales en el laboratorio y se almacenaron a -80 ° C hasta su procesamiento para la extracción de DNA.

Además de la recogida de la muestra de heces, los participantes proporcionaron cuestionarios individuales en los que se recogía información epidemiológica que pudiera resultar útil para el análisis de los resultados. Se recogieron datos demográficos (edad, sexo), alimentación, tipo de parto (cesárea, uso de antibióticos durante el parto), tabaquismo y sintomatología alérgica de las madres y abuelas.

2.2 Extracción DNA de heces

Todo el proceso se realizó en el centro de investigación FISABIO (Valencia, España).

Se extrajo el DNA de todas las muestras recogidas partiendo de 200 mg de heces utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) con un paso adicional con bolitas magnéticas en cuatro tandas. En resumen, se lisaron las muestras con 1 ml de InhibitEX buffer, resuspendiendo con un palillo y realizando un vórtex de 5 minutos con 500 µl de bolitas magnéticas. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml que se calentó a 95°C durante 7 minutos y se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima. Se cogieron 200 µl del sobrenadante resultante de la centrifugación a los cuales se añadió 15 µl de proteinasa K y un volumen de buffer AL, centrifugando el lisado 1 minuto a velocidad máxima. Finalmente, se añadió Etanol 100% para precipitar el DNA y se pasaron 600 µl del lisado por las columnas incluidas en el Kit para purificar el DNA, que fue eluido en 100 µl de agua libre de nucleasas. Se incluyeron controles negativos en cada tanda de extracción. Todo el proceso se describe en la Figura 33.

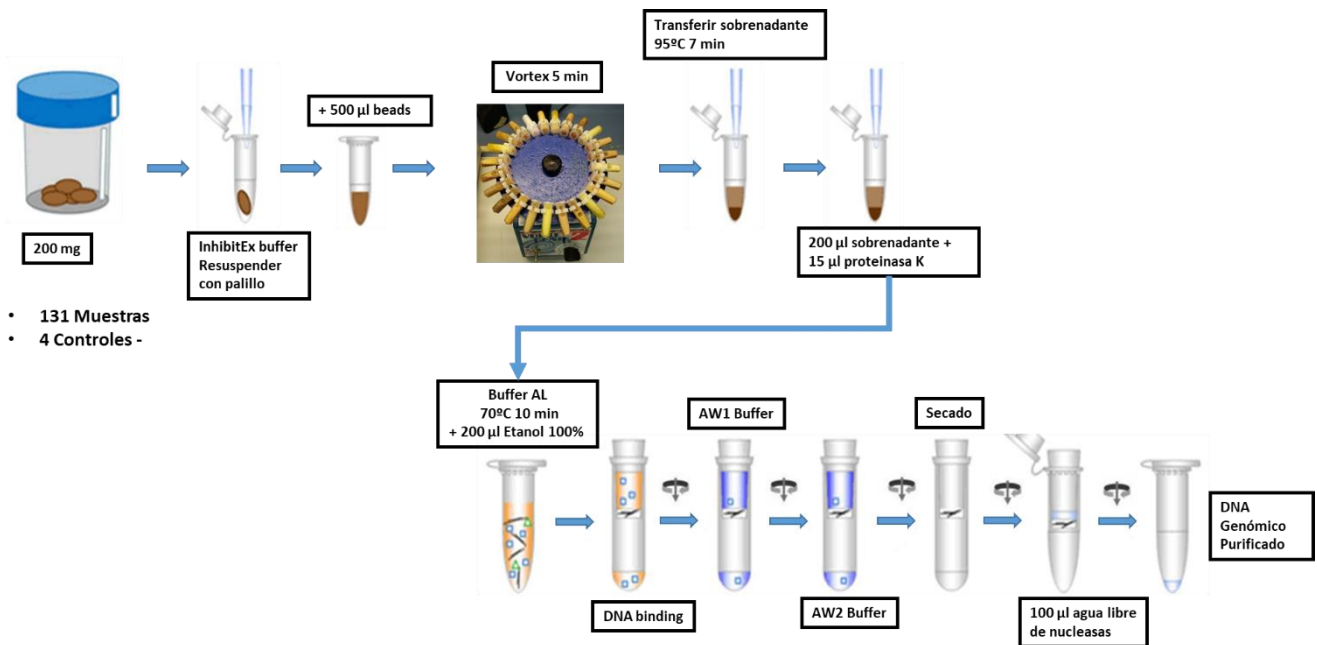


Figura 33. Extracción DNA de muestras de heces usando el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit.

4.2 Cuantificación y análisis de calidad del DNA

El DNA extraído fue cuantificado usando el fluorómetro Qubit® 2.0 siguiendo el protocolo dsDNA HS Assay Kit. Todas las muestras tenían la concentración mínima necesaria para llevar a cabo su secuenciación (0,2 µg/µL).

4.3 Amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S

Las regiones V3-V4 del gen rRNA 16S fueron amplificadas y secuenciadas (paired-end) por el servicio de genómica del FISABIO usando la plataforma MiSeq (Illumina) siguiendo las instrucciones descritas en el manual “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation”.

4.3 Análisis bioinformático

El análisis de calidad de las lecturas obtenidas por el secuenciador se realizó con el programa prinseq-lite con los siguientes parámetros: min_length: 50, trim_qual_right: 30, trim_qual_type: mean, trim_qual_window: 20¹⁶⁰. Las lecturas R1 y R2 se unieron mediante el programa FLASH aplicando parámetros predeterminados¹⁶¹.

Las secuencias de 16S rRNA fueron limpiadas y procesadas siguiendo el pipeline DADA2 v1.11 para definir ASVs¹⁶². La taxonomía se asignó con el clasificador RDP implementado en DADA2 (RDP trainset 16; release 11.5)¹⁶³.

La diversidad α de las muestras se estimó mediante el índice de Shannon. El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) junto al análisis multivariante permutacional (PERMANOVA) se llevaron a cabo con el programa R. Para analizar diferencias significativas entre los grupos experimentales, se aplicaron los test estadísticos de Wilcoxon y ANCOM-II con scripts en lenguaje R proporcionados por el FISABIO. Las ASVs con un *p-valor* <0.05 y un *p-valor* ajustado < 0.1 (FDR) fueron consideradas significativas.

Resultados

1. Clasificación de pacientes

Los pacientes involucrados en el estudio se clasificaron en seis grupos experimentales divididos en dos categorías:

- Grupo 1- Lactantes alérgicos a la proteína de leche de vaca (LA)
- Grupo 2- Madres de lactantes alérgicos (MA)
- Grupo 3- Abuelas de lactantes alérgicos (AA)
- Grupo 4- Lactantes control (LC)
- Grupo 5- Madres de lactantes no alérgicos (MC)
- Grupo 6- Abuelas de lactantes no alérgicos (AC)

En el caso de las madres y abuelas, además de la clasificación según el estado alérgico del lactante perteneciente a su familia, se realizó una clasificación adicional teniendo en cuenta las reacciones alérgicas que ellas mismas reportaban en el cuestionario, dividiéndolas en Alérgicas y No alérgicas.

Los datos epidemiológicos de lactantes, madres y abuelas se encuentran en los Anexos I y II.

2. Perfil de la microbiota intestinal asociada al desarrollo de alergia a lo largo de las tres generaciones

De todas las muestras secuenciadas, se obtuvieron un total de 19 523 010 secuencias. 12 955 391 secuencias del total generado recibieron una asignación taxonómica resultando en 9641 ASVs.

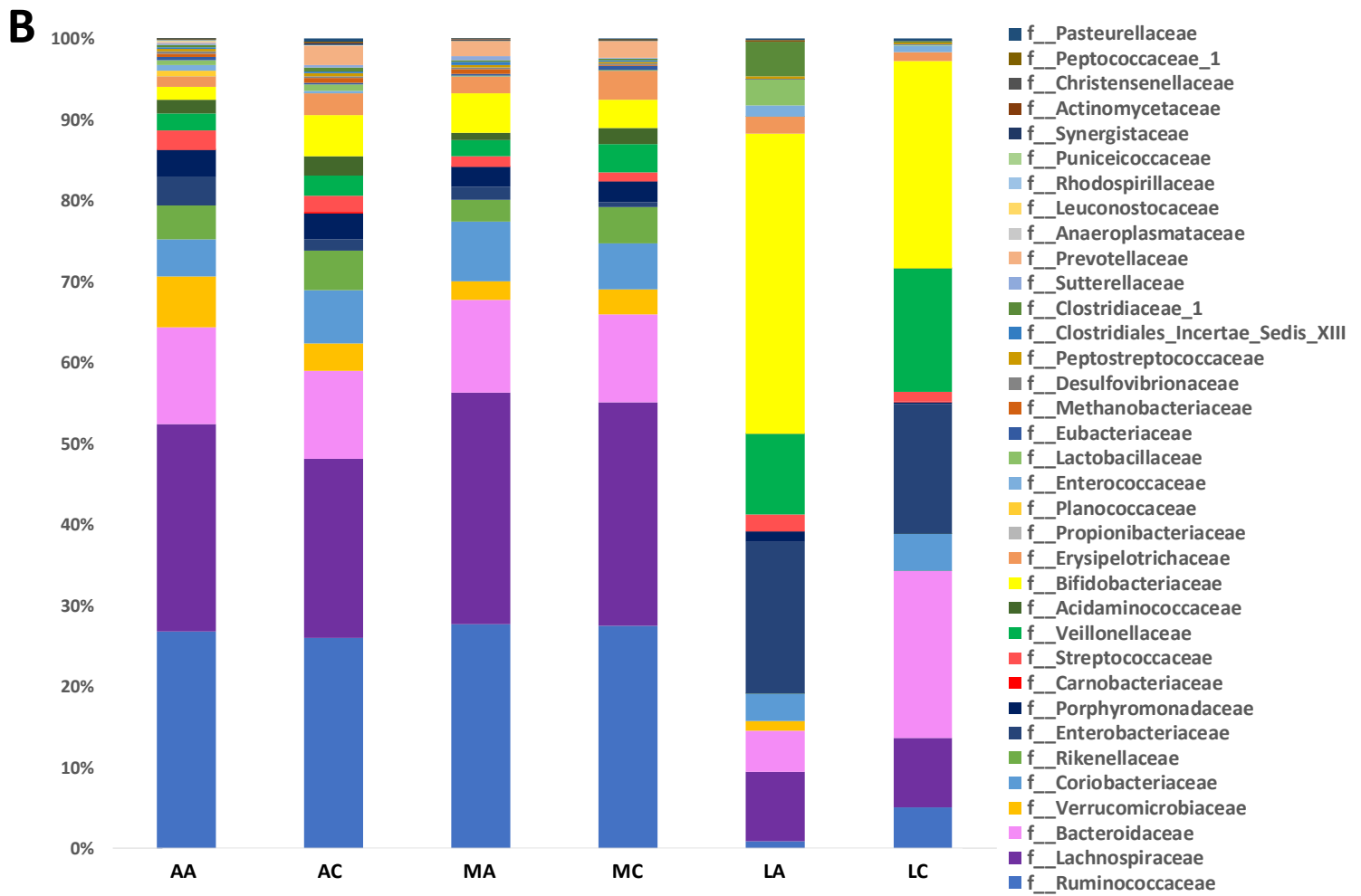
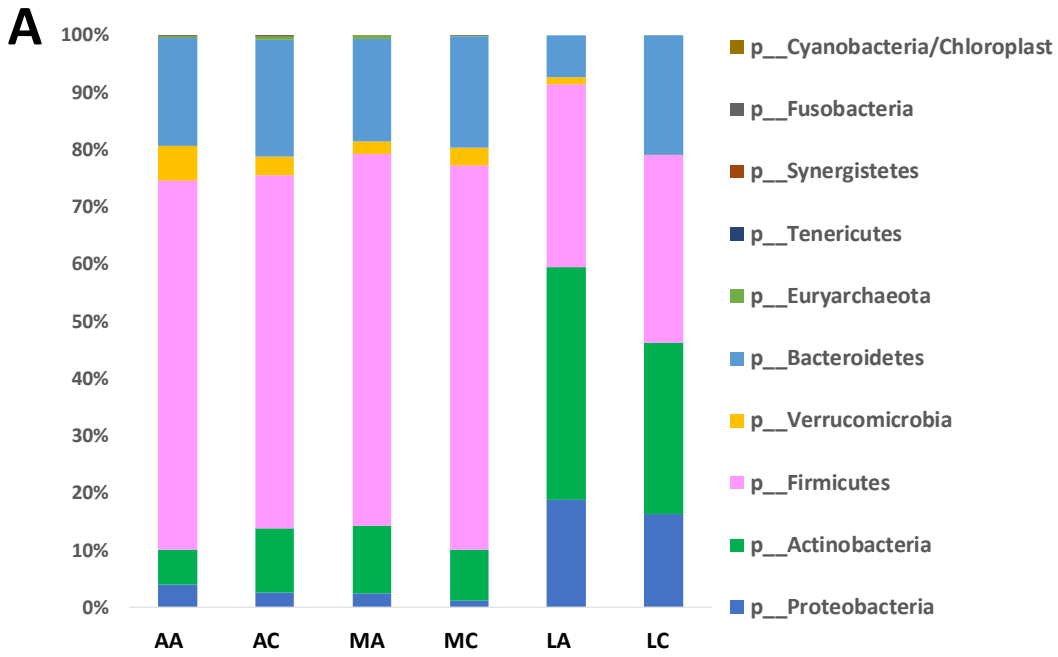
Con el fin de tener una visión general de la composición de la microbiota intestinal asociada a las distintas edades se representaron gráficos de barras de las familias y filos bacterianos identificados para cada uno de los grupos experimentales (Figura 34A-B). Se observaron cambios asociados con la edad en la estructura de la microbiota de los miembros de las tres generaciones (lactantes, madres y abuelas), existiendo una mayor diversidad bacteriana en adultos en comparación con lactantes.

A nivel de filo, la microbiota adulta estaba principalmente constituida por Firmicutes (60%), Bacteroidetes (15%), Actinobacteria (7%), Verrumicrobia (4%) y Proteobacteria (3%). Los lactantes tenían una composición similar en cuanto a filos pero su distribución era diferente: Actinobacteria y Proteobacteria estaban aumentados, representando el 30% y el 15% de la microbiota intestinal respectivamente mientras que la abundancia de Firmicutes estaba disminuida (30%).

Además, las familias predominantes en la microbiota intestinal adulta eran *Ruminococcaceae* (25%), *Lachnospiraceae* (23%), *Bacteroidaceae* (10%), *Coriobacteriaceae* (5%), *Bifidobacteriaceae* (2-4%), *Verrumicrobiaceae* (2-4%) y *Rikenellaceae* (2-4%) mientras que en el caso de los lactantes las más abundantes eran *Bifidobacteriaceae* (25-30%), *Enterobacteriaceae* (15-20%), *Lachnospiraceae* (5%), y *Bacteroidaceae* y *Veillonaceae*, que representaban alrededor del 3 y el 5% en lactantes alérgicos y el 20 y el 15% en los lactantes control.

Finalmente, la diversidad- α (Índice de Shannon), es decir, el análisis de abundancia y uniformidad de las especies presentes y riqueza bacteriana (número de especies presentes, N) de las muestras fueron analizadas (Figura 34C-D), mostrando un descenso significativo en lactantes en comparación con la microbiota adulta, apoyando lo que se observa en los gráficos de barras previamente descritos. La microbiota adulta presentaba un índice de Shannon mayor (alrededor de 4) que los lactantes (en torno a 2). Además, se observó que los lactantes con APLV tenían un menor índice de Shannon en comparación con los no alérgicos.

Estos resultados en conjunto sugieren que la edad influye en la composición de la microbiota intestinal.



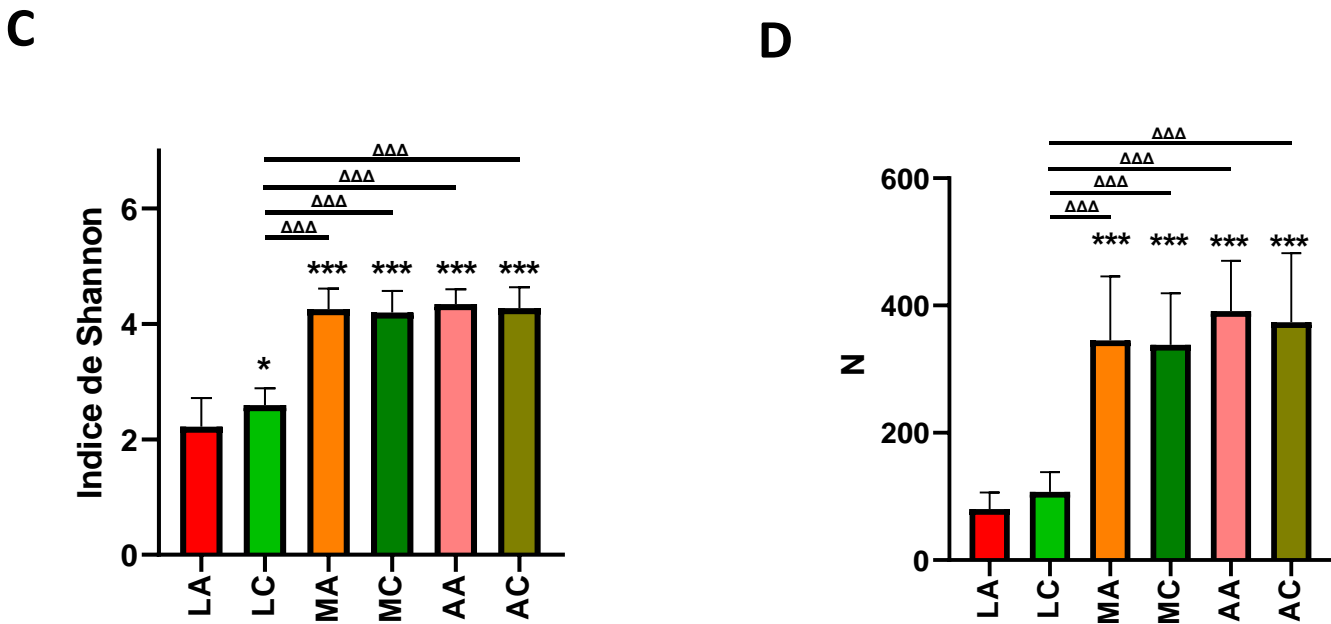


Figura 34. Composición de la microbiota intestinal a lo largo de las tres generaciones. **A.** Composición bacteriana a nivel de filo. **B.** Top 35 familias bacterianas. **C.** Diferencias en alfa diversidad entre los grupos experimentales (Índice de Shannon). **D.** Diferencias en la riqueza bacteriana entre los grupos. Las diferencias estadísticas se identificaron mediante T-test usando GraphPad Prism. * p -valor <0.05 , ***/ $\Delta\Delta\Delta$ p -valor < 0.001 .

3. Diferencias en la microbiota intestinal asociadas a APLV en lactantes

Con el objetivo de evaluar si el estado alérgico de los lactantes estaba asociado con una variación en la composición de la microbiota intestinal, comparamos la distribución de las 15 familias más abundantes identificadas en ambos grupos, LA y LC. El fenotipo LA mostró una abundancia aumentada de las familias *Bifidobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*, mientras que las familias *Bacteroidaceae*, *Veillonaceae*, *Ruminococcaceae* y *Coriobacteriaceae* se encontraban disminuidas en comparación con LC (Figura 35A), aunque ninguna de estas diferencias era estadísticamente significativa. Además, se llevó a cabo el análisis multivariante PERMANOVA, mostrando que existían diferencias significativas a nivel de composición de familias bacterianas entre los dos grupos (PERMANOVA Adonis $p=0.025$) (Figura 35B). Las diferencias entre los dos grupos de lactantes fueron identificadas utilizando el test estadístico ANCOMII,

indicando que familias con una pequeña abundancia relativa como *Prevotellaceae* y *Acidaminococcaceae* estaban significativamente aumentadas en LC (Figura 35C). Por otro lado, se identificaron también las diferencias a nivel de ASVs, con resultados significativos para las especies *Veillonella parvula*, *Veillonella dispar*, *Streptococcus lutetiensis* y *Enterococcus casseliflavus* (Figura 36). *Veillonella parvula* estaba aumentada en LA mientras que el resto de las especies significativas estaban disminuidas.

C o_Bacteroidales;f_Prevotellaceae o_Selenomonadales;f_Acidaminococcaceae

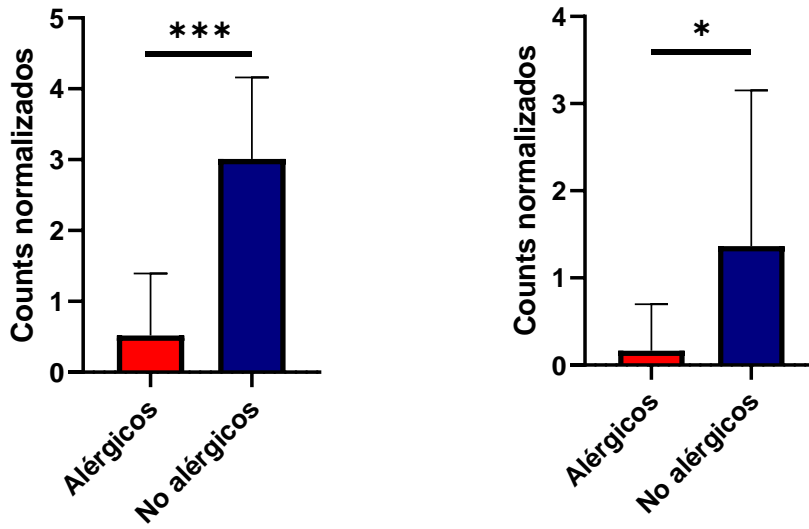
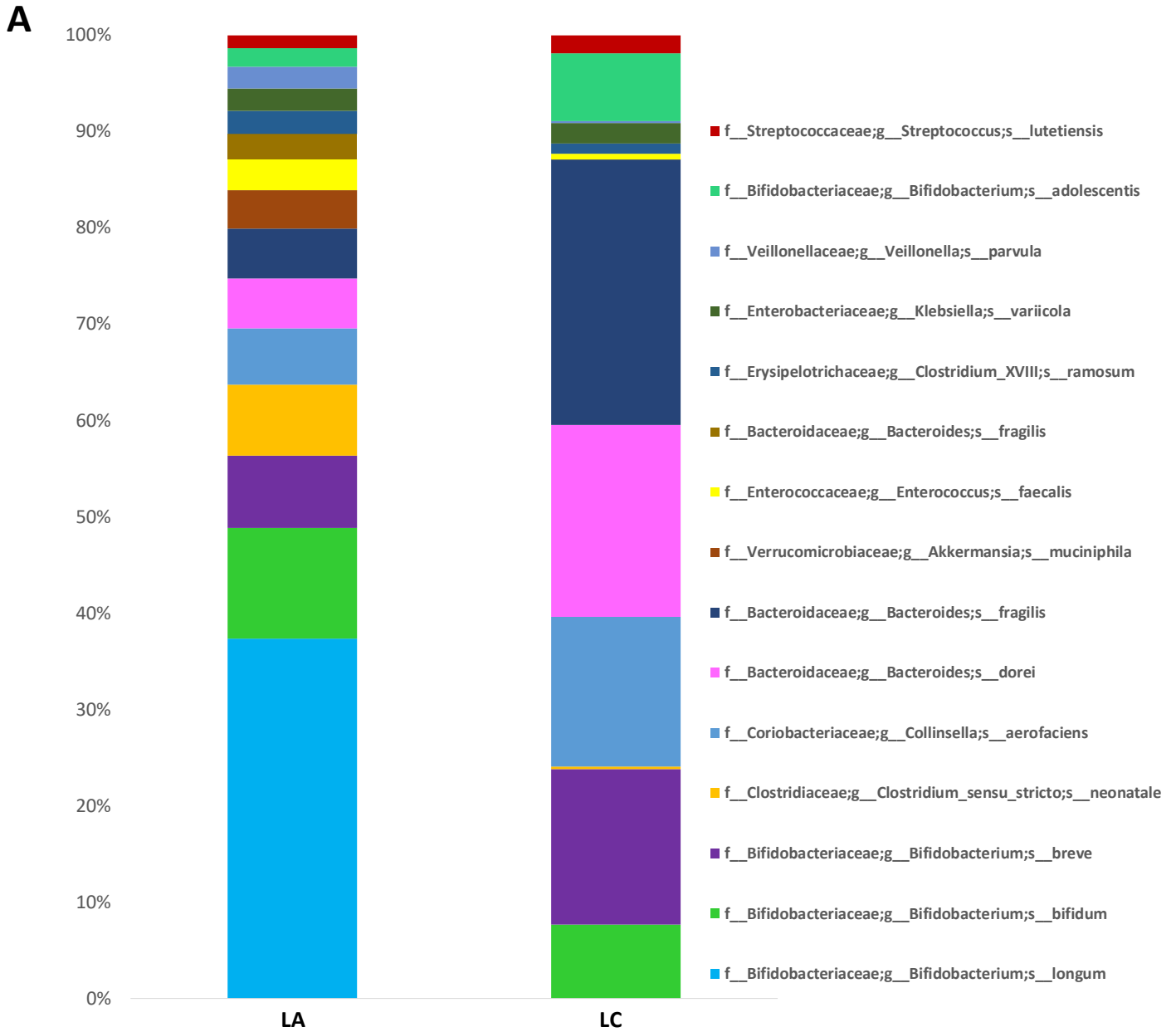


Figura 35. Microbiota intestinal asociada a APLV en lactantes. **A.** Composición bacteriana a nivel de familia en LA y LC. **B.** Análisis de coordenadas principales (PCoA). **C.** Familias bacterianas diferencialmente expresadas entre LA y LC utilizando el test estadístico ANCOMII * p -valor<0.05, *** p -valor< 0.001.



B *f_Enterococcaceae;g_Enterococcus;s_casseliflavus* *f_Streptococcaceae;g_Streptococcus;s_lutetiensis*

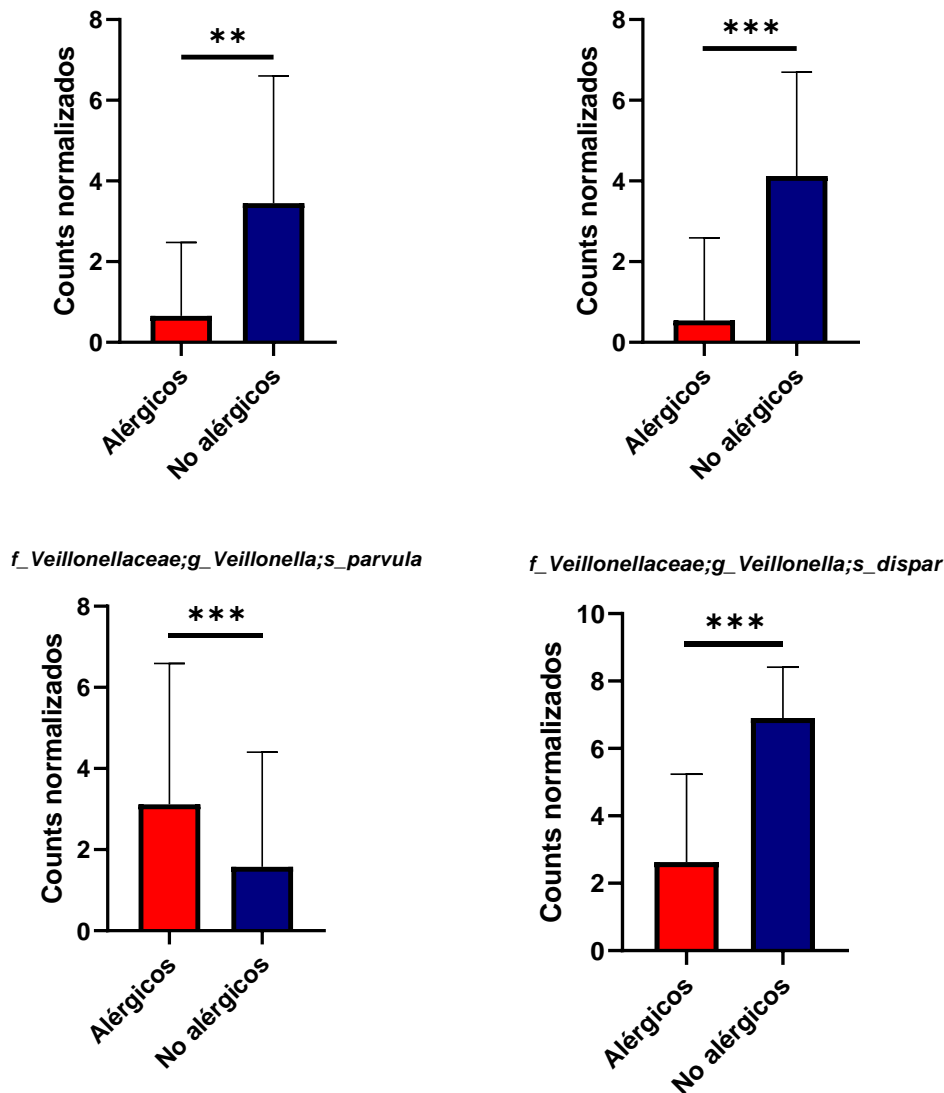
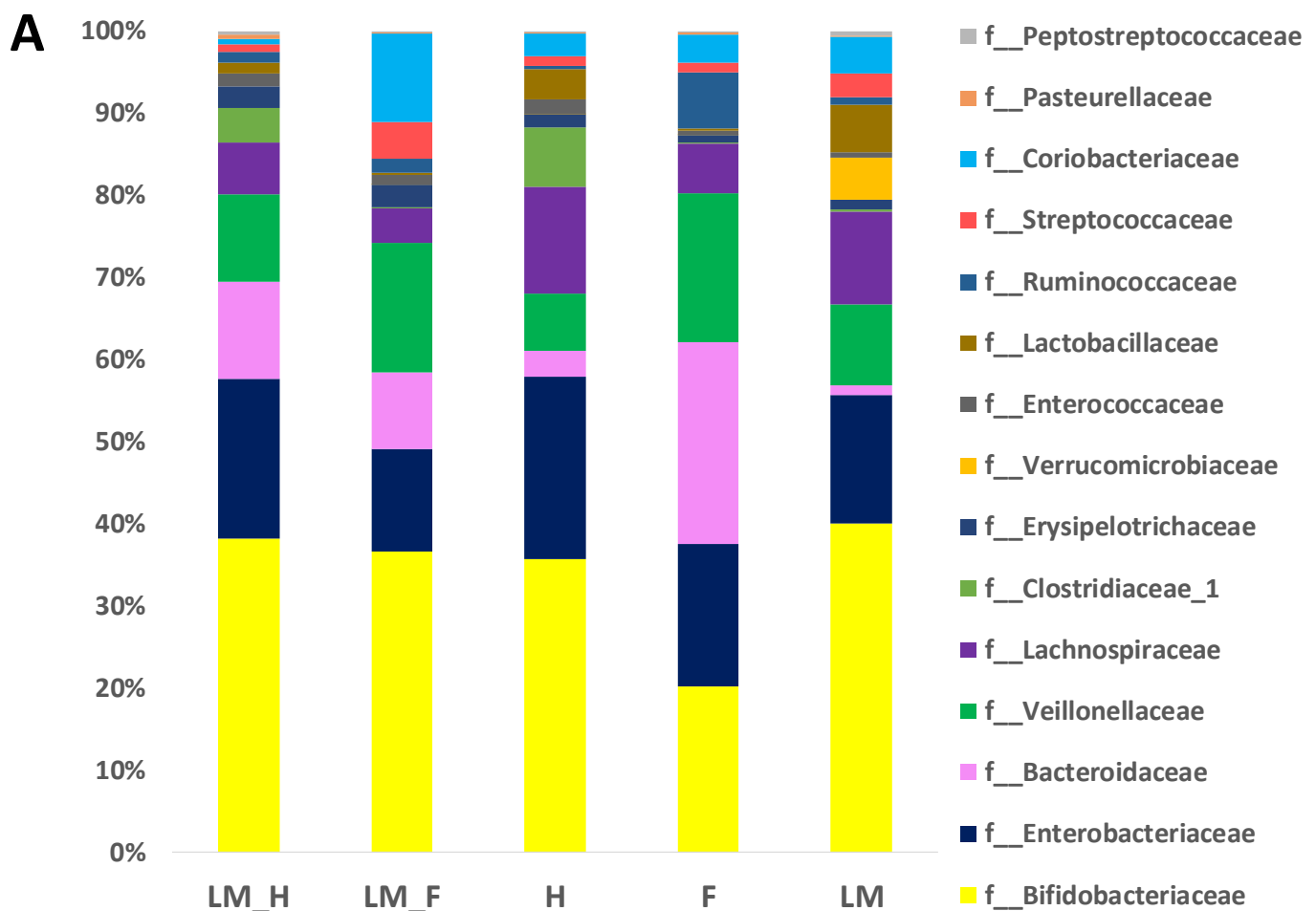


Figura 36. Composición de la microbiota intestinal a nivel de ASV en lactantes. **A.** Composición bacteriana a nivel ASV en LA y LC. **B.** ASV diferencialmente expresadas entre LA y LC utilizando el test estadístico ANCOMII ***p*-valor<0.01, ****p*-valor< 0.001.

En relación con la dieta de los lactantes, se identificaron 5 grupos experimentales: leche materna (LM), leche materna junto con hidrolizado (LM_H), leche materna junto con leche de fórmula (LM_F), hidrolizado (H) y leche de fórmula (F). Los LA fueron alimentados con hidrolizado, leche materna o una combinación de ambos, mientras que los LC se alimentaban con leche de fórmula o una combinación de la misma con leche materna. Como se puede observar en los gráficos de barras representados en la Figura 37A, la frecuencia relativa de las familias cambia de acuerdo a la dieta. Los cambios más notables se observaron entre lactantes que tomaban hidrolizado (todos pertenecientes al grupo LA) y aquellos que tomaban leche de fórmula (todos

pertenecientes al grupo LC) (PERMANOVA Adonis $p=0.005$) (Figura 37B). Con respecto al análisis estadístico, la familia *Prevotellaceae* estaba aumentada significativamente en los lactantes alimentados con fórmula (Figura 37C). Además, se identificaron las diferencias significativas a nivel de ASV, observándose un aumento de *Veillonella Parvula* y *Enterococcus casseliflavus* en los grupos LM_H, LM_F comparados con los lactantes que tomaban fórmula (F), respectivamente, mientras que *Streptococcus lutetiensis* estaba disminuida en los lactantes alérgicos que tomaban hidrolizado (H) en comparación con F (Figura 38). Puesto que las familias y ASV identificadas coincidían con las diferencias identificadas entre LA y LC, estos resultados sugieren que la alimentación tiene un mayor impacto en la composición de la microbiota que la alergia.



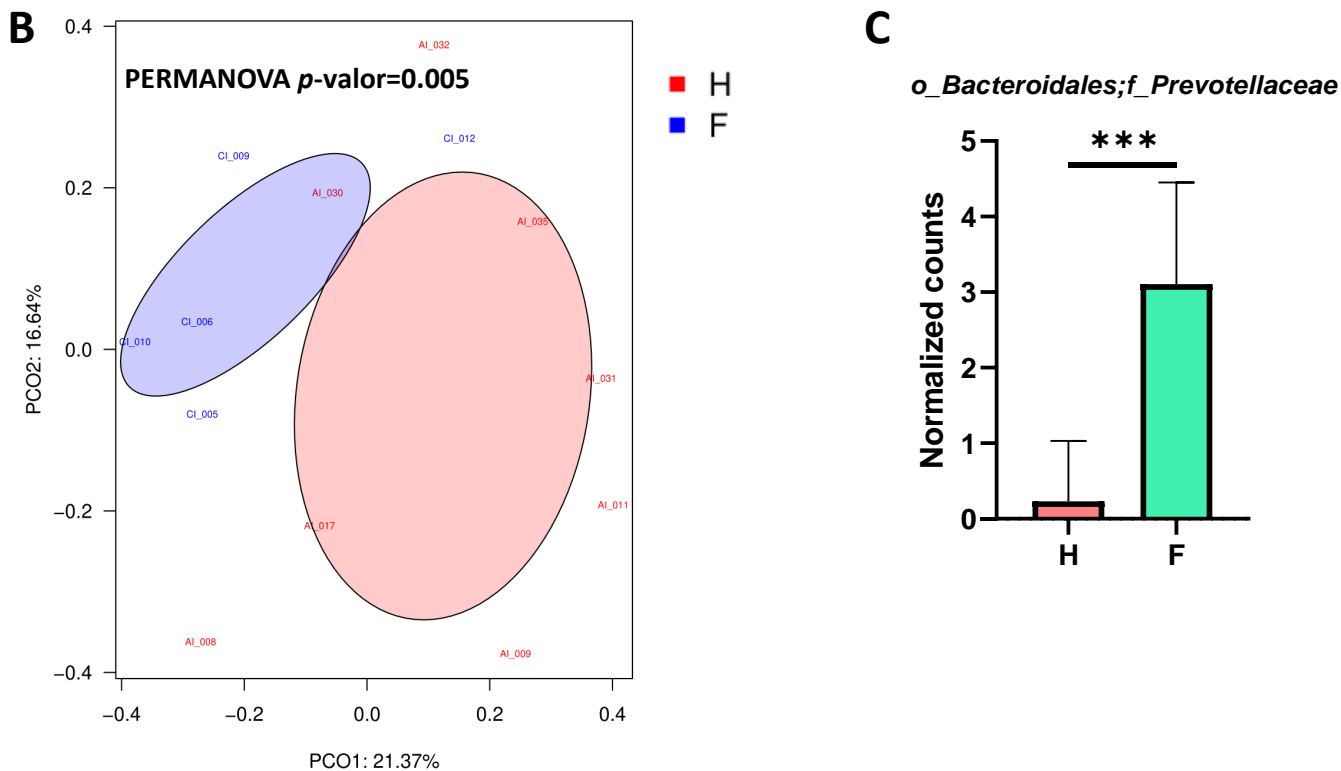


Figura 37. Microbiota intestinal asociada a la dieta lactantes. **A.** Composición bacteriana a nivel de familia en los grupos LM, LM_F, LM_H, H, F. **B.** Análisis de coordenadas principales (PCoA). **C.** Familias bacterianas diferencialmente expresadas entre los grupos experimentales utilizando el test estadístico ANCOMII. *** p -valor < 0.001.

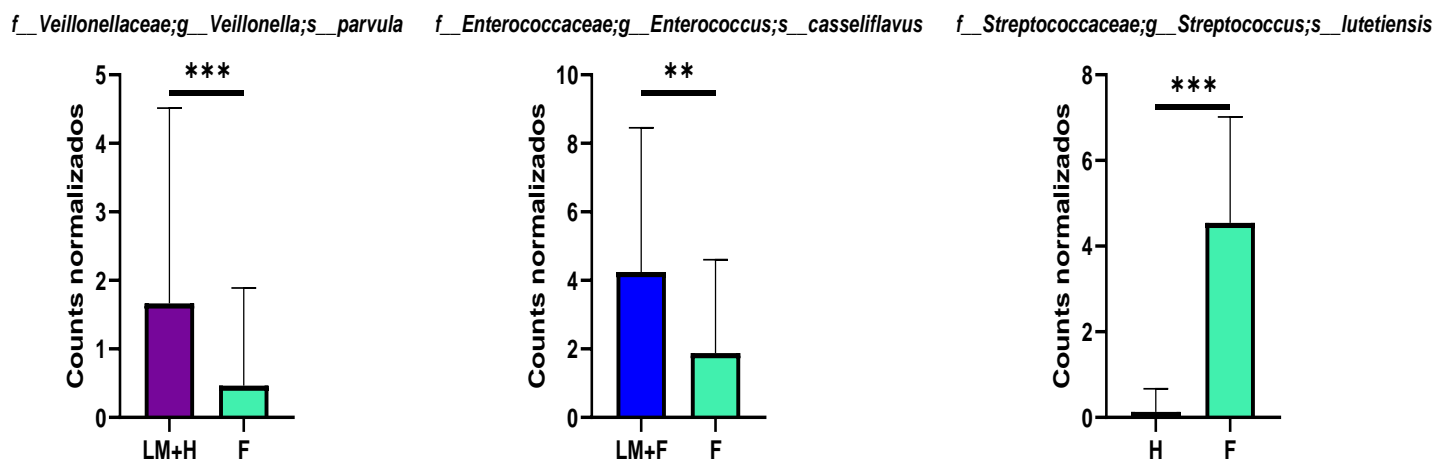


Figura 38. ASV bacterianas diferencialmente expresadas entre los grupos LM, LM_F, LM_H, H y F utilizando el test estadístico ANCOMII ** p -valor < 0.01, *** p -valor < 0.001.

4. β diversidad asociada a APLV

Nuestro último objetivo era analizar las diferencias entre lactantes, madres y abuelas de la misma familia teniendo en cuenta su estado alérgico. Para ello, calculamos la distancia de Bray-Curtis entre lactantes y sus madres (L-M), madres y abuelas (M-G) y lactantes y sus abuelas (L-G) (Figura 39). Como se puede observar, la distancia entre M-G fue significativamente menor que la distancia L-M y L-G, lo que se correlaciona con el hecho de que la microbiota adulta es más diversa que la microbiota infantil. Por otro lado, también intentamos identificar un patrón disbiótico en las familias alérgicas en comparación con las familias no alérgicas. Las muestras disbióticas suelen ser más similares entre sí que las muestras no disbióticas, por lo que se esperaba que la distancia entre los sujetos alérgicos de la misma familia fuera menor que la distancia entre sujetos de las familias no alérgicas. Sin embargo, en este caso, las distancias fueron similares independientemente de la alergia.

Todos estos resultados señalan que no hay evidencia de disbiosis en LA en comparación con LC.

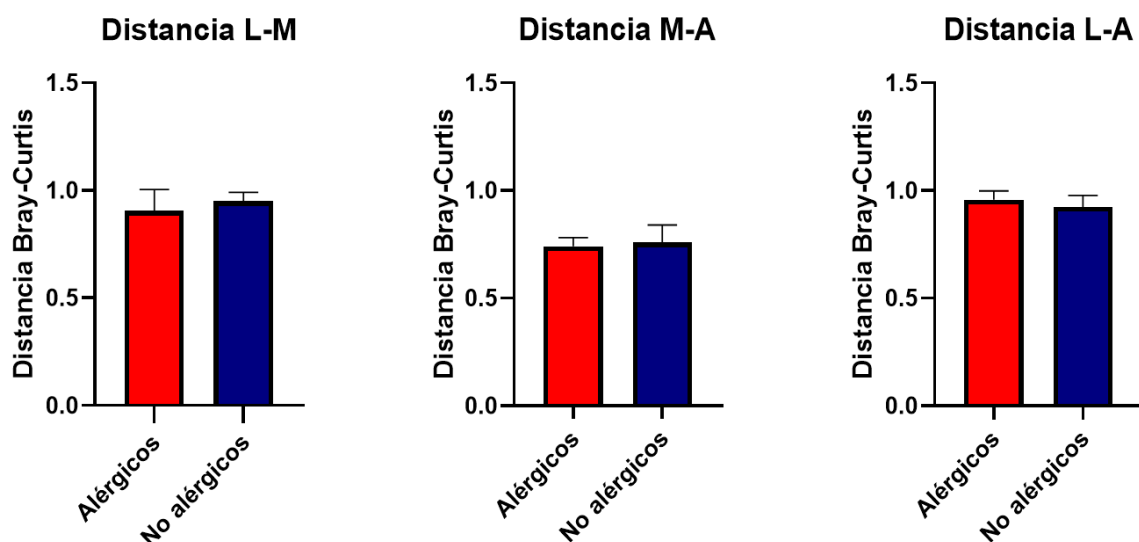


Figura 39. Análisis de beta diversidad entre miembros de la misma familia basado en la distancia de Bray-Curtis. Los análisis estadísticos se hicieron aplicando T-test con el programa GraphPad Prism.

Discusión

Durante los últimos años el estudio de la relación de la microbiota y la alergia ha cobrado mucha importancia, ya que existen estudios que describen que ésta juega un papel crucial en el desarrollo y la regulación del sistema inmune, existiendo una relación simbiótica entre el huésped y los microorganismos que conforman la microbiota, en su mayoría^{164,165}. Además, muchos estudios describen la existencia de una transferencia longitudinal de la microbiota de madres a hijos durante el parto, siendo la microbiota del bebé diferente según el tipo de parto (natural o cesárea), la cual puede ser clave para el desarrollo inmunitario del recién nacido¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Por otro lado, existe la hipótesis de que desequilibrios en la microbiota (disbiosis) pueden llevar al desarrollo de alergias, sin embargo, a día de hoy existe mucha controversia sobre si es la disbiosis la que causa la alergia o es la alergia la que termina produciendo una alteración en la microbiota^{65,77}. Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la microbiota pulmonar y la alergia respiratoria así como la microbiota cutánea y el desarrollo de dermatitis atópica y la microbiota intestinal y la alergia alimentaria⁶⁵. En cuanto al papel de la microbiota intestinal en la alergia alimentaria y más concretamente en la APLV, una de las alergias más comunes en niños menores de tres años, existen algunos estudios que han descrito algunas diferencias entre la microbiota intestinal de lactantes sanos y de lactantes alérgicos a nivel de composición y funcionalidad bacteriana, con un aumento de los géneros *Clostridia* y *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes* y alteraciones en el ratio *Enterobacteriaceae/Bacteroidaceae* así como en la abundancia de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Sin embargo, no existen apenas estudios que evalúen la transferencia longitudinal de madres a hijos y su papel en el desarrollo de la alergia alimentaria. Por ello, en este trabajo nos propusimos estudiar la influencia longitudinal, transmitida de abuelas a madres y de madres a hijos en la composición de la microbiota intestinal y su relación con el desarrollo de APLV mediante el estudio del gen del rRNA 16S de muestras fecales de las tres generaciones.

Abuelas, madres y lactantes fueron reclutados para este estudio con el objetivo de entender el efecto de la alergia en la microbiota y ver si existía un patrón disbiótico transmitido a lo largo de las tres generaciones que pudiera ser el causante del desarrollo de esta alergia. Las fortalezas de este estudio incluyen la heterogeneidad

de las muestras al haber incluido tres generaciones distintas de pacientes de dos hospitales y cinco centros de salud ubicados en Madrid y el uso de técnicas de secuenciación masiva para la identificación de la composición de la microbiota. Además, actualmente se está llevando a cabo el análisis metagenómico de estas muestras, que permitirá profundizar en las diferencias a nivel de funcionalidad bacteriana. Como limitaciones encontramos que la dieta y el estado alérgico de los lactantes estaba confundido, ya que en el momento de diagnosticarse la APLV en lactantes alimentados con fórmula a base de leche de vaca (exclusivamente o como complemento de la lactancia materna), su alimentación era cambiada a otras alternativas como la fórmula parcialmente hidrolizada, la fórmula extensamente hidrolizada o la fórmula hidrolizada de soja^{172,173}. Por otro lado, las muestras fecales se recolectaron solo una vez por lo que los cambios en la microbiota a lo largo del tiempo (por ejemplo, antes y después del desarrollo de la alergia) no pudieron ser estudiados. Por otro lado, la microbiota en lactantes de corta edad varía rápidamente y la heterogeneidad de sus edades pudo dificultar la identificación de diferencias entre los grupos experimentales.

En cuanto a los resultados de este estudio, observamos en primer lugar una asociación significativa entre la dieta y el estado alérgico de los lactantes, que se explica por el hecho de que la mayoría de los lactantes alérgicos comenzaban a tomar hidrolizado solo o en combinación con leche materna en el momento en el que eran diagnosticados con APLV. Por el contrario, la mayoría de los lactantes control incluidos tenían una dieta basada en leche de fórmula. En este trabajo, identificamos que la familia *Prevotellaceae* estaba significativamente aumentada en el grupo LC y en aquellos lactantes que tomaban leche de fórmula (todos LC). Puesto que las muestras fueron recolectadas una única vez, no podemos saber si este cambio está asociado a la alergia o a la dieta de los lactantes. El género *Prevotella* junto con *Bacteroides* son los más prevalentes dentro del filo Bacteroidetes. *Prevotella* es un género muy amplio e incluye una gran cantidad de familias y especies diferentes con un genoma muy diverso entre sus cepas. Estudios previos han demostrado que una disminución de este género en la microbiota pulmonar se asocia con asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)¹⁷⁴. Sin embargo, en otros estudios el aumento de este género se ha asociado a artritis reumatoide y al desarrollo de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn^{175,176}. Esto justifica la relación descrita previamente

entre respuesta inmunitaria y cambios en la microbiota. Por el contrario, miembros pertenecientes a este género bacteriano se han asociado con efectos beneficiosos como un mejor metabolismo de la glucosa y además se ha visto su correlación con la dieta vegetariana^{177,178}. Por tanto, el papel y la influencia de este género bacteriano es aún bastante desconocido y probablemente dependiente de las cepas específicas involucradas.

Muchos autores han descrito una asociación entre la edad y la microbiota^{64,179}. Sin embargo, existen pocos estudios longitudinales como éste que involucren tres generaciones¹⁸⁰. En línea con estos estudios, encontramos que la estructura de la microbiota intestinal era diferente a nivel de riqueza y diversidad cuando comparamos los grupos acorde a su estado alérgico, siendo la microbiota de los lactantes menos diversa que la de los adultos (madres y abuelas) (Figura 34). En el grupo de lactantes, los filos Actinobacteria y Proteobacteria estaban aumentados en comparación con la microbiota adulta. En estudios anteriores, se ha descrito que un aumento de estos filos puede asociarse a una disbiosis de la microbiota intestinal y al desarrollo y mantenimiento de la homeostasis intestinal¹⁸¹. Además, el aumento del filo Proteobacteria se ha correlacionado con una respuesta inmune debilitada y se cree que puede ser una firma microbiana de enfermedad¹⁸². El filo Actinobacteria está representado mayoritariamente por la familia *Bifidobacteriaceae* y en el caso de los lactantes ésta representa el 25-30% del total de su microbiota intestinal¹⁸³. Aunque algunos autores consideran que un aumento de esta familia es beneficioso para la regulación de la respuesta inmune, en este trabajo se ha descrito un aumento de la misma en LA, que podría explicarse por la transferencia longitudinal de madres a hijos vía leche materna¹⁸⁴.

Por último, otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar si existía un patrón disbiótico transmitido a lo largo de las tres generaciones en miembros alérgicos pertenecientes a la misma familia en comparación con aquellas familias formadas únicamente por sujetos no alérgicos. Según algunos estudios, las muestras disbióticas suelen ser más similares entre sí que las no disbióticas, por lo que la distancia de Bray-Curtis debería ser menor en las familias alérgicas que en las no alérgicas¹⁸⁵. Sin embargo, en este estudio las distancias fueron similares independientemente del

estado alérgico, por lo que no podemos concluir que exista una disbiosis transmitida longitudinalmente en las familias con sujetos alérgicos.

En resumen, en este trabajo hemos confirmado que la microbiota de lactantes es menos diversa que la de adultos. Además, nuestros resultados parecen contradecir la idea de que existe una firma disbiótica transmitida de madres a hijos durante los primeros 8 meses de vida. Por otro lado, puesto que los factores dieta y alergia estaban confundidos en LA y LC, no ha sido posible asociar las diferencias encontradas a ninguna de estas dos variables (Figura 40). Teniendo todo lo anterior en cuenta, son necesarios estudios prospectivos que incluyan distintos intervalos de tiempo durante los primeros meses de vida de los lactantes para entender el papel de las diferencias a nivel de microbiota intestinal entre LA y LC en el desarrollo de la alergia.

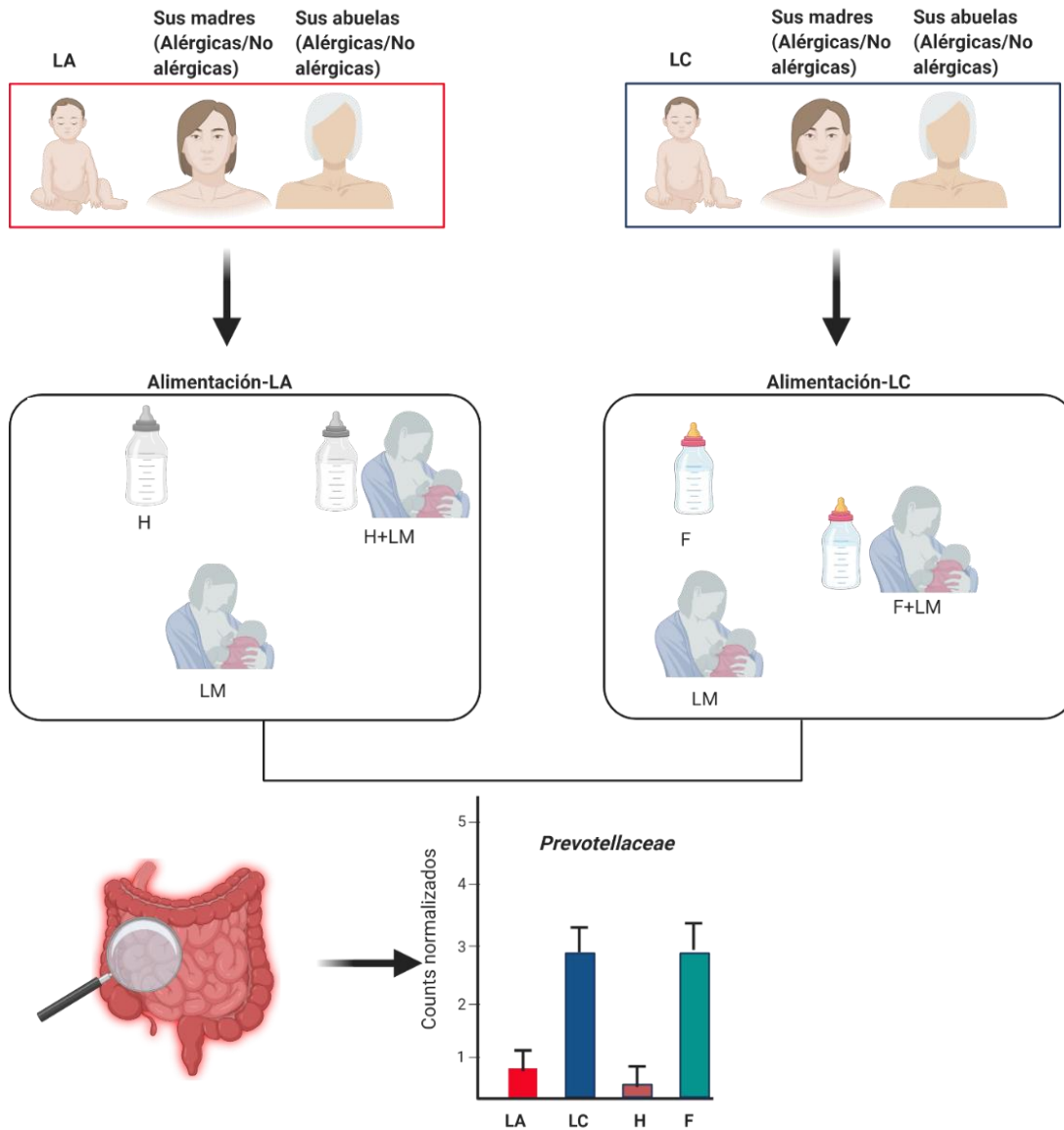


Figura 40. Resumen de las diferencias a nivel de familia entre LA y LC según su estado alérgico y su alimentación.

Conclusiones

- Los pacientes con un fenotipo alérgico respiratorio grave, con o sin alergia alimentaria, presentan una alteración de las funciones plaquetarias tales como la agregación, adhesión, activación y la liberación de gránulos en comparación con fenotipos alérgicos moderados y sujetos no alérgicos.
- Los pacientes monosensibilizados a gramíneas y polisensibilizados tienen un perfil transcriptómico diferente previamente al tratamiento con ITSL, presentando los pacientes polisensibilizados un estado inflamatorio más elevado.
- Los pacientes monosensibilizados a gramíneas y polisensibilizados que reciben tratamiento activo de ITSL presentan un perfil transcriptómico diferente tras dos años de tratamiento.
- Los pacientes monosensibilizados a gramíneas presentan una desensibilización de células efectoras tras dos años de tratamiento con ITSL y un estado inflamatorio mayor en comparación con los pacientes polisensibilizados.
- La diversidad de la microbiota intestinal varía con la edad, siendo más diversa en adultos que en lactantes.
- No hay evidencias que sugieran que, de 4 a 8 meses de edad, exista una firma disbiótica en la microbiota intestinal, transferida por vía materna, relacionada con el desarrollo de APLV en niños.

Listado de publicaciones científicas

Obeso, D., **Mera-Berriatua, L.**, Rodríguez-Coira, J., Rosace, D., Fernández, P., Martín-Antoniano, I. A., Santaolalla, M., Marco Martín, G., Chivato, T., Fernández-Rivas, M., Ramos, T., Blanco, C., Alvarado, M. I., Domínguez, C., Angulo, S., Barbas, C., Barber, D., Villaseñor, A., & Escibese, M. M. (2018). Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*, 73(11), 2137–2149.

Sánchez-Solares, J., Delgado-Dolset, M. I., **Mera-Berriatua, L.**, Hormias-Martin, G., Cumplido, J. A., Saiz, V., Carrillo, T., Moreno-Aguilar, C., Escibese, M. M., Gómez-Casado, C., & Barber, D. (2019). Respiratory allergies with no associated food allergy disrupt oral mucosa integrity. *Allergy*, 74(11), 2261–2265.

Barker-Tejeda, T. C., Bazire, R., Obeso, D., **Mera-Berriatua, L.**, Rosace, D., Vázquez-Cortes, S., Ramos, T., Rico, P., Chivato, T., Barbas, C., Villaseñor, A., Escibese, M. M., Fernández-Rivas, M., Blanco, C., & Barber, D. (2020). Exploring novel systemic biomarker approaches in grass-pollen sublingual immunotherapy using omics. *Allergy*, 10.1111/all.14565. Advance online publication.

Artículos en proceso de publicación:

Mera-Berriatua, L., Zubeldia-Varela, E., Martín-Antoniano, IA., López de Maturana, E., Rojo, D., Barber, D., Bazire, R., Cabrera, P., Barker-Tejeda, T.C., Úbeda, C., Francino, M.P., Ibáñez Sandín, M.D., Pérez-Gordo, M., (2020). Unravelling the gut microbiome of cow's milk allergic infants, their mothers and grandmothers. Submitted to *Allergy*.

ANEXOS

Anexo I. Características demográficas y clínicas de los lactantes incluidos en el estudio. H: Hombre; M: Mujer; LM: Leche materna; F: Fórmula, H: Hidrolizado.

| Muestra | Edad (Meses) | Sexo | Clasificación | Tipo parto | Antibióticos parto | Alimentación |
|---------|--------------|------|---------------|------------|--------------------|--------------|
| LA_001 | 4 | H | Alérgico | Cesárea | Sí | LM+H |
| LA_003 | 5 | H | Alérgico | Vaginal | No | LM+H |
| LA_004 | 4 | H | Alérgico | Cesárea | No | LM+H |
| LA_008 | 6 | M | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_009 | 6 | H | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_011 | 5 | H | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_012 | 6 | M | Alérgico | Vaginal | No | LM |
| LA_014 | 5 | M | Alérgico | Vaginal | No | LM+F |
| LA_016 | 4 | M | Alérgico | Vaginal | Sí | LM |
| LA_017 | 5 | M | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_019 | 5 | M | Alérgico | Vaginal | No | LM+H |
| LA_021 | 6 | M | Alérgico | Vaginal | No | LM+F |
| LA_022 | 6 | M | Alérgico | Cesárea | No | LM |
| LA_024 | 6 | M | Alérgico | Vaginal | No | LM+H |
| LA_027 | 5 | H | Alérgico | Vaginal | No | LM+H |
| LA_029 | 5 | M | Alérgico | Vaginal | Sí | LM+H |
| LA_030 | 6 | H | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_031 | 4 | M | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LA_032 | 6 | H | Alérgico | Cesárea | No | H |
| LA_035 | 6 | H | Alérgico | Vaginal | No | H |
| LC_004 | 6 | M | No alérgico | Vaginal | Sí | LM+F |
| LC_005 | 6 | H | No alérgico | Vaginal | No | F |
| LC_006 | 6 | H | No alérgico | Vaginal | No | F |
| LC_009 | 5 | M | No alérgico | Cesárea | No | F |
| LC_010 | 5 | M | No alérgico | Cesárea | No | F |
| LC_011 | 5 | M | No alérgico | Vaginal | No | LM |
| LC_012 | 4 | H | No alérgico | Vaginal | No | F |

Anexo II. Características demográficas y clínicas de las madres y abuelas de los lactantes incluidas en el estudio. *No se detallan alimentos ni tipo de polen que producen las alergias.

| Muestra | Edad (años) | Clasificación | Tabaco | Alergias Reportadas* |
|---------|-------------|---------------|--------|---|
| MA_001 | 41 | Alérgica | 0 | Alimentos |
| MA_003 | 37 | No alérgica | 3 | 0 |
| MA_004 | 33 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_005 | 32 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_006 | 28 | Alérgica | 3 | Alimentos |
| MA_007 | 34 | Alérgica | 3 | Alimentos + Polen |
| MA_008 | 39 | Alérgica | 3 | Alimentos + Polen + Dermatitis atópica + Gato |
| MA_009 | 42 | Alérgica | 0 | Alimentos + Polen + Dermatitis atópica |
| MA_011 | 38 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_012 | 33 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica + Gato |
| MA_013 | 32 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica |
| MA_014 | 32 | Alérgica | 0 | Polen |
| MA_015 | 29 | No alérgica | 3 | 0 |
| MA_016 | 31 | Alérgica | 2 | Alimentos |
| MA_018 | 35 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica + Gato |
| MA_017 | 31 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_019 | 38 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_020 | 41 | No alérgica | 3 | 0 |
| MA_021 | 34 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_022 | 36 | Alérgica | 3 | Dermatitis atópica |
| MA_023 | 34 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_024 | 34 | Alérgica | 0 | Alimentos + Gato |
| MA_026 | 35 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica |
| MA_027 | 36 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_028 | 29 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_029 | 31 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica |
| MA_030 | 34 | No alérgica | 3 | 0 |
| MA_031 | 31 | No alérgica | 0 | 0 |
| MA_032 | 30 | Alérgica | 2 | Alimentos |
| MA_033 | 38 | No alérgica | 1 | 0 |
| MA_034 | 34 | No alérgica | 3 | 0 |
| MA_035 | 38 | Alérgica | 3 | Dermatitis atópica |
| MA_036 | 30 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_001 | 69 | Alérgica | 2 | Alimentos |
| AA_002 | 56 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_003 | 64 | Alérgica | 3 | Alimentos |
| AA_004 | 60 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_005 | 60 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_006 | 51 | No alérgica | 2 | 0 |
| AA_007 | 69 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_008 | 66 | Alérgica | 3 | Dermatitis atópica |

| | | | | |
|------------|----|-------------|---|---------------------------|
| AA_009 | 69 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_010 | 75 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_011 | 63 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_012 | 67 | Alérgica | 3 | Alimentos |
| AA_013 | 61 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_014 | 59 | No alérgica | 2 | 0 |
| AA_015 | 73 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica |
| AA_017 | 62 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_018 | 58 | No alérgica | 1 | 0 |
| AA_019 | 73 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_021 | 67 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_022 | 60 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_024 | 62 | No alérgica | 1 | 0 |
| AA_026 | 66 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_027 | 66 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_028 | 62 | No alérgica | 2 | 0 |
| AA_029 | 56 | Alérgica | 3 | Alimentos |
| AA_030 | 68 | Alérgica | 0 | Alimentos |
| AA_031 | 65 | No alérgica | 0 | 0 |
| AA_032 | 58 | Alérgica | 2 | Alimentos |
| AA_033 | 63 | No alérgica | 2 | 0 |
| AA_034 | 65 | No alérgica | 3 | 0 |
| AA_036 | 47 | No alérgica | 3 | 0 |
| MC_001 | 34 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_002 | 42 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_003 | 29 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_004 | 33 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_005/006 | 28 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_007 | 30 | Alérgica | 0 | Dermatitis atópica + Gato |
| MC_009/010 | 36 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_011 | 34 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_012 | 37 | Alérgica | 0 | Polen |
| MC_013 | 38 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_014 | 30 | No alérgica | 0 | 0 |
| MC_016 | 37 | No alérgica | 3 | 0 |
| AC_001 | 73 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_002 | 73 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_003 | 61 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_004 | 63 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_005/006 | 66 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_007 | 59 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_009/010 | 63 | No alérgica | 3 | 0 |
| AC_011 | 62 | No alérgica | 1 | 0 |
| AC_012 | 68 | Alérgica | 1 | Dermatitis atópica |
| AC_013 | 67 | No alérgica | 0 | 0 |

| | | | | |
|---------------|----|-------------|---|---|
| AC_014 | 60 | No alérgica | 0 | 0 |
| AC_016 | 68 | No alérgica | 2 | 0 |

Bibliografía

1. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Global Atlas of Allergy. 2014;
2. Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol.* mayo de 2008;585(2-3):354-60.
3. Zubeldia JM, Baeza M^a L, Jáuregui I, Senent CJ. Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. :488.
4. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics.* 15 de marzo de 2014;30(6):846-51.
5. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel J, Chivato T. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 25 de junio de 2018;28(3):151-64.
6. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Advocacy Manifesto. Tackling the Allergy Crisis in Europe-Concerted Policy Action Needed. junio de 2015;
7. Escribese MM, Gómez Casado C, Barber D, Diaz Perales A. Immune Polarization in Allergic Patients: Role of the Innate Immune System. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2015;25(4):251-8.
8. Fang Mercado L, Martinez Alfaro B, Marrugo Cano J. Linfopoyetina Estromal Tímica y su relación con las enfermedades alérgicas. / Thymic Stromal Lymphopoietin and its relationship with allergic diseases. *Cienc Salud Virtual.* 30 de junio de 2015;7(1):59.
9. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp Med.* 7 de agosto de 2017;214(8):2193-204.
10. Rondina MT, Garraud O. Emerging Evidence for Platelets as Immune and Inflammatory Effector Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [citado 15 de septiembre de 2020];5. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00653/full>
11. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood.* 1 de mayo de 2014;123(18):2759-67.
12. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell.* marzo de 2007;128(6):1173-86.
13. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood.* 08 de 2018;131(6):605-10.

14. Coller BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood*. 15 de octubre de 2008;112(8):3011-25.
15. Deppermann C, Kubes P. Platelets and infection. *Semin Immunol*. 1 de diciembre de 2016;28(6):536-45.
16. Gomez-Casado C, Villaseñor A, Rodriguez-Nogales A, Bueno J, Barber D, Escribese M. Understanding Platelets in Infectious and Allergic Lung Diseases. *Int J Mol Sci*. 8 de abril de 2019;20(7):1730.
17. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost*. 2007;5(9):1945-55.
18. Koseoglu S, Flaumenhaft R. Advances in platelet granule biology. *Curr Opin Hematol*. septiembre de 2013;20(5):464-71.
19. Amisten S. A rapid and efficient platelet purification protocol for platelet gene expression studies. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;788:155-72.
20. Eicher JD, Wakabayashi Y, Vitseva O, Esa N, Yang Y, Zhu J, et al. Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*. 2 de abril de 2016;27(3):230-9.
21. Page C, Pitchford S. Platelets and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. julio de 2014;44(7):901-13.
22. Audera C, Rocklin R, Vaillancourt R, Jakubowski JA, Deykin D. Altered arachidonic acid metabolism and platelet size in atopic subjects. *Clin Immunol Immunopathol*. 1 de marzo de 1988;46(3):352-9.
23. Szczeklik A, Milner PC, Birch J, Watkins J, Martin JF. Prolonged bleeding time, reduced platelet aggregation, altered PAF-acether sensitivity and increased platelet mass are a trait of asthma and hay fever. *Thromb Haemost*. 15 de diciembre de 1986;56(3):283-7.
24. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 06 de 2017;544(7648):105-9.
25. Hemmendinger S, Pauli G, Tenabene A, Pujol JL, Bessot JC, Eber M, et al. Platelet function: Aggregation by PAF or sequestration in lung is not modified during immediate or late allergen-induced bronchospasm in man. *J Allergy Clin Immunol*. 1 de mayo de 1989;83(5):990-6.
26. Ind PW, Peters AM, Malik F, Lavender JP, Dollery CT. Pulmonary platelet kinetics in asthma. *Thorax*. 1 de junio de 1985;40(6):412-7.
27. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. enero de 2012;67(1):18-24.

28. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy*. 1 de febrero de 2013;3(1):3.
29. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL, Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol*. diciembre de 2013;88(6):879-88.
30. Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczyńska M, Picado C, Scadding G, et al. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy*. octubre de 2007;62(10):1111-8.
31. Baumgart KW. The immunocap ISAC microarray in allergy diagnosis. *Pathology (Phila)*. 1 de enero de 2014;46:S41-2.
32. World Allergy Organization. *White Book on Allergy*. 2013.
33. Reisacher WR. Allergy treatment: environmental control strategies. *Otolaryngol Clin North Am*. junio de 2011;44(3):711-25, x.
34. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015;8:17.
35. Manka LA, Wechsler ME. New biologics for allergic diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 3 de abril de 2018;14(4):285-96.
36. Jutel M, Kosowska A, Smolinska S. Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future. *Allergy Asthma Immunol Res*. mayo de 2016;8(3):191-7.
37. Nevot Falcó S, Gómez Galán C. Prevención de las enfermedades alérgicas. *Pediatría integral*. marzo de 2018;23(2).
38. Varona R, Ramos T, Escribese MM, Jimeno L, Galán A, Würtzen PA, et al. Persistent regulatory T-cell response 2 years after 3 years of grass tablet SLIT: Links to reduced eosinophil counts, sIgE levels, and clinical benefit. *Allergy*. febrero de 2019;74(2):349-60.
39. Barber D, Rico P, Blanco C, Fernandez-Rivas M, Ibañez MD, Escribese MM. GRAZAX®: a sublingual immunotherapy vaccine for Hay fever treatment: from concept to commercialization. *Hum Vaccines Immunother*. 2 de diciembre de 2019;15(12):2887-95.
40. Durham SR, Emminger W, Kapp A, de Monchy JGR, Rak S, Scadding GK, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: Confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. marzo de 2012;129(3):717-725.e5.
41. Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, Eifan AO, Penagos M, Dumitru F, et al. Effect of 2 Years of Treatment With Sublingual Grass Pollen Immunotherapy on Nasal Response to Allergen Challenge at 3 Years Among Patients With Moderate to Severe Seasonal Allergic Rhinitis: The GRASS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 14 de febrero de 2017;317(6):615.

42. Valovirta E, Petersen TH, Piotrowska T, Laursen MK, Andersen JS, Sørensen HF, et al. Results from the 5-year SQ grass sublingual immunotherapy tablet asthma prevention (GAP) trial in children with grass pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2018;141(2):529-538.e13.
43. Subiza Garrido-Lestache J. Pólenes alergénicos en España. *Allergol Immunopathol (Madr)*. enero de 2004;32(3):121-4.
44. Gamboa PM, Cáceres O, Antepará I, Sánchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, et al. Original article: Two different profiles of peach allergy in the north of Spain: Peach allergy: allergen profiles. *Allergy*. 12 de marzo de 2007;62(4):408-14.
45. Suárez-Lorenzo I, Cruz-Niesvaara D, Rodríguez-Gallego C, Rodríguez de Castro F, Carrillo-Díaz T. Epidemiological Study of the Allergic Population in the North of Gran Canaria. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 25 de junio de 2018;28(3):212-5.
46. Eguiluz-Gracia I, Tay TR, Hew M, Escribese MM, Barber D, O'Hehir RE, et al. Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy*. diciembre de 2018;73(12):2290-305.
47. Barber D, Villaseñor A, Escribese MM. Metabolomics strategies to discover new biomarkers associated to severe allergic phenotypes. *Asia Pac Allergy*. 2019;9(4):e37.
48. Rosace D, Gomez-Casado C, Fernandez P, Perez-Gordo M, Dominguez MDC, Vega A, et al. Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(2):681-690.e1.
49. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. noviembre de 2008;63(11):1550-8.
50. Miguéres M, Dávila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lhéritier-Barrand M, et al. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):16.
51. Tejedor M. Influence of geographic origin, age and gender in the mono or polysensitization to pollens in the Southwest of Madrid region (Spain)*1. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2004;113(2):S223.
52. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, Sabato V, Hagendorens MM, Mertens C, et al. Cross-Reactive Aeroallergens: Which Need to Cross Our Mind in Food Allergy Diagnosis? *J Allergy Clin Immunol Pract*. noviembre de 2018;6(6):1813-23.
53. Breiteneder H, Mills C. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. junio de 2005;5(3):275-9.

54. Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 2 de agosto de 1991;253(5019):557-60.
55. Asero R, Monsalve R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. junio de 2008;38(6):1033-7.
56. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colas C, Dávila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2009;39(11):1764-73.
57. Ruiz-García M, García Del Potro M, Fernández-Nieto M, Barber D, Jimeno-Nogales L, Sastre J. Profilin: a relevant aeroallergen? *J Allergy Clin Immunol*. agosto de 2011;128(2):416-8.
58. Santos A, Ree RV. Profilins: Mimickers of Allergy or Relevant Allergens? *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(3):191-204.
59. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol*. octubre de 2004;114(4):900-7.
60. Alvarado MI, Jimeno L, De La Torre F, Boissy P, Rivas B, Lázaro MJ, et al. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. *Allergy*. diciembre de 2014;69(12):1610-6.
61. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 29 de abril de 2016;352(6285):560-4.
62. Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, Rupp S, Uchimura Y, Li H, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*. 18 de marzo de 2016;351(6279):1296-302.
63. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. agosto de 2014;25(5):428-38.
64. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 9 de mayo de 2012;486(7402):222-7.
65. Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, Escribese MM, Lopez Longo MN, Luengo O, et al. Microbiome and Allergic Diseases. *Front Immunol*. 17 de julio de 2018;9:1584.

66. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol.* septiembre de 2011;128(3):646-652.e1-5.
67. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2012;129(2):434-40, 440.e1-2.
68. Aitoro R, Paparo L, Amoroso A, Di Costanzo M, Cosenza L, Granata V, et al. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. *Nutrients.* 28 de junio de 2017;9(7).
69. Muir AB, Benitez AJ, Dods K, Spergel JM, Fillon SA. Microbiome and its impact on gastrointestinal atopy. *Allergy.* 2016;71(9):1256-63.
70. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol.* 1 de septiembre de 2009;587(Pt 17):4153-8.
71. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med.* 11 de noviembre de 2009;1(6):6ra14-6ra14.
72. Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity.* 19 de junio de 2014;40(6):843-54.
73. Kostić M, Djakovic L, Šujić R, Godman B, Janković SM. Inflammatory Bowel Diseases (Crohn's Disease and Ulcerative Colitis): Cost of Treatment in Serbia and the Implications. *Appl Health Econ Health Policy.* febrero de 2017;15(1):85-93.
74. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell.* enero de 2015;160(3):447-60.
75. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 4 de octubre de 2012;490(7418):55-60.
76. Av H, Ke B, F B, M N. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes [Internet]. Vol. 38, *Diabetes care.* *Diabetes Care;* 2015 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25538312/>
77. Chiu C-Y, Chan Y-L, Tsai M-H, Wang C-J, Chiang M-H, Chiu C-C. Gut microbial dysbiosis is associated with allergen-specific IgE responses in young children with airway allergies. *World Allergy Organ J* [Internet]. 2019 [citado 16 de septiembre de 2020];12(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6439417/>
78. Rachid R, Chatila TA. The role of the gut microbiota in food allergy: *Curr Opin Pediatr.* diciembre de 2016;28(6):748-53.

79. Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* [Internet]. 25 de febrero de 2016 [citado 16 de septiembre de 2020];1(1). Disponible en: <https://msphere.asm.org/content/1/1/e00045-15>
80. Quifer-Rada P, Choy YY, Calvert CC, Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM. Use of metabolomics and lipidomics to evaluate the hypocholesterolemic effect of Proanthocyanidins from grape seed in a pig model. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(10):2219-27.
81. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, et al. Conducting a Microbiome Study. *Cell*. julio de 2014;158(2):250-62.
82. Vandamme P, Pot B, Gillis M, Vos P de, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*. junio de 1996;60(2):407.
83. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2004;17(4):840-62.
84. Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*. enero de 1996;9(1):18.
85. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. agosto de 2012;6(8):1621-4.
86. Ja H, Db MW, Hg M, Sm H, Pr N, Da B, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere [Internet]. Vol. 318, *Science* (New York, N.Y.). *Science*; 2007 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916733/>
87. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol* [Internet]. 20 de abril de 2016 [citado 2 de septiembre de 2020];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00459/abstract>
88. Galli SJ. Toward precision medicine and health: Opportunities and challenges in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. mayo de 2016;137(5):1289-300.
89. Yii ACA, Tay T-R, Choo XN, Koh MSY, Tee AKH, Wang D-Y. Precision medicine in united airways disease: A "treatable traits" approach. *Allergy*. 2018;73(10):1964-78.
90. Hu Z-Z, Huang H, Wu CH, Jung M, Dritschilo A, Riegel AT, et al. Omics-Based Molecular Target and Biomarker Identification. En: Mayer B, editor. *Bioinformatics for Omics Data* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011

- [citado 2 de septiembre de 2020]. p. 547-71. (Methods in Molecular Biology; vol. 719). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-027-0_26
91. Villaseñor A, Rosace D, Obeso D, Pérez-Gordo M, Chivato T, Barbas C, et al. Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. *Clin Exp Allergy*. abril de 2017;47(4):442-56.
 92. I H, J H, Pj B, K A, A A, E B, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions [Internet]. Vol. 26, *The European respiratory journal*. *Eur Respir J*; 2005 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16135737/>
 93. J C-V, A C, Mt G del P, Jc L. Approaches for the study of cancer: towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics [Internet]. Vol. 13, *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. *Clin Transl Oncol*; 2011 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21865133/>
 94. H Q, Al G-O, H D-S, R V-R, J A-H. Omics-based biomarkers: current status and potential use in the clinic [Internet]. Vol. 74, *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 2017 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382490/>
 95. Abu-Asab MS, Chaouchi M, Alesci S, Galli S, Laassri M, Cheema AK, et al. Biomarkers in the Age of Omics: Time for a Systems Biology Approach. *OMICS J Integr Biol*. marzo de 2011;15(3):105-12.
 96. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics: *The Obstetrician & Gynaecologist*. *Obstet Gynaecol*. julio de 2011;13(3):189-95.
 97. Esteve-Codina A. RNA-Seq Data Analysis, Applications and Challenges. En: *Comprehensive Analytical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2018 [citado 16 de septiembre de 2020]. p. 71-106. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166526X18300552>
 98. Gallart-Ayala H, Fernández-Navarro J, Checa A. Data Analysis in Transcriptomics and Metabolomics Clinical Applications. En: *Comprehensive Analytical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2018 [citado 16 de septiembre de 2020]. p. 613-41. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166526X18300631>
 99. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. :10.
 100. Galán I, Prieto A, Rubio M, Herrero T, Cervigón P, Cantero JL, et al. Association between airborne pollen and epidemic asthma in Madrid, Spain: A case-control study. 2010 [citado 16 de septiembre de 2020]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/72314>

101. Porcel Carreño S, Gómez Nieves E, Fernández-Caldas E, Abel Fernández E, Cases B, Tudela JI, et al. Immunochemical and physical quantitation of grass and olive pollen allergens and correlation with asthma admissions in Cáceres, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 8 de julio de 2019;0.
102. Ra I, B H, F C, Yd B-B, Kj A, U S, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data [Internet]. Vol. 4, *Biostatistics* (Oxford, England). Biostatistics; 2003 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12925520/>
103. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 1995;57(1):289-300.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
105. Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, Rosace D, Fernández P, Martín-Antoniano IA, et al. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*. noviembre de 2018;73(11):2137-49.
106. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de octubre de 2005;102(43):15545-50.
107. Loza MJ, Djukanovic R, Chung KF, Horowitz D, Ma K, Branigan P, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respir Res*. 15 de 2016;17(1):165.
108. Sallis BF, Erkert L, Moñino-Romero S, Acar U, Wu R, Konnikova L, et al. An algorithm for the classification of mRNA patterns in eosinophilic esophagitis: Integration of machine learning. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1354-1364.e9.
109. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS, et al. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol*. junio de 2009;123(6 Suppl):S365-383.
110. Costa V, Casamassimi A, Roberto R, Gianfrancesco F, Matarazzo MR, D'Urso M, et al. DDX11L: a novel transcript family emerging from human subtelomeric regions. *BMC Genomics*. 28 de mayo de 2009;10:250.
111. Wang CM, Zhang XJ, Ma YJ, Li X. Mutational Analysis of Mitochondrial tRNA Genes in Patients with Asthma. *Iran J Public Health*. mayo de 2017;46(5):620-5.
112. Perčulija V, Ouyang S. Chapter 9 - Diverse Roles of DEAD/DEAH-Box Helicases in Innate Immunity and Diseases. En: Tuteja R, editor. *Helicases from All Domains of Life* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 16 de septiembre de

2020]. p. 141-71. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128146859000099>

113. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J Biol Chem*. 1 de enero de 2016;291(1):1-10.
114. Kornberg MD. The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. septiembre de 2020;12(5):e1486.
115. Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, von Bülow V, Harb H, Alhamdan F, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol*. diciembre de 2018;14(1):39.
116. Kidd CDA, Thompson PJ, Barrett L, Baltic S. Histone Modifications and Asthma. The Interface of the Epigenetic and Genetic Landscapes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. enero de 2016;54(1):3-12.
117. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet Adhesion to Vascular Walls [Internet]. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53456/>
118. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet Aggregation [Internet]. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [citado 16 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53449/>
119. McCulloch RK, Croft KD, Vandongen R. Enhancement of platelet 12-HETE production in the presence of polymorphonuclear leukocytes during calcium ionophore stimulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 13 de enero de 1992;1133(2):142-6.
120. Baig A, Bao X, Wolf M, Haslam RJ. The platelet protein kinase C substrate pleckstrin binds directly to SDPR protein. *Platelets*. noviembre de 2009;20(7):446-57.
121. Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S, Naseem KM. cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood*. 14 de noviembre de 2013;122(20):3533-45.
122. Vito CD, Hadi LA, Navone SE, Marfia G, Campanella R, Mancuso ME, et al. Platelet-derived sphingosine-1-phosphate and inflammation: from basic mechanisms to clinical implications. *Platelets*. julio de 2016;27(5):393-401.
123. Wedman PA, Aladhami A, Chumanevich AP, Fuseler JW, Oskeritzian CA. Mast cells and sphingosine-1-phosphate underlie prelesional remodeling in a mouse model of eczema. *Allergy*. 2018;73(2):405-15.
124. Oskeritzian CA, Hait NC, Wedman P, Chumanevich A, Kolawole EM, Price MM, et al. The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis

- regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses. *J Allergy Clin Immunol*. abril de 2015;135(4):1008-1018.e1.
125. Książek M, Chacińska M, Chabowski A, Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res*. julio de 2015;56(7):1271-81.
 126. Mezger M, Nording H, Sauter R, Graf T, Heim C, von Bubnoff N, et al. Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol*. 2019;10:1731.
 127. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Res Pract Thromb Haemost*. enero de 2020;4(1):23-35.
 128. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzman M, Assinger A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. marzo de 2016;43(2):78-88.
 129. Qian F, Le Breton GC, Chen J, Deng J, Christman JW, Wu D, et al. Role for the guanine nucleotide exchange factor phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent rac exchanger 1 in platelet secretion and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. marzo de 2012;32(3):768-77.
 130. Zheng P, Huang C, Leng D, Feng M, Sun B, Zhang XD. Transcriptome analysis of peripheral whole blood reveals key lncRNAs implicated in childhood asthma [Internet]. In Review; 2019 oct [citado 2 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.researchsquare.com/article/rs-6603/v1>
 131. Yarani R, Mirza AH, Kaur S, Pociot F. The emerging role of lncRNAs in inflammatory bowel disease. *Exp Mol Med*. diciembre de 2018;50(12):1-14.
 132. Mambetsariev N, Mirzapozazova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JGN, et al. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. marzo de 2010;30(3):483-90.
 133. Gutiérrez J, Droppelmann CA, Salsoso R, Westermeier F, Toledo F, Salomon C, et al. A Hypothesis for the Role of RECK in Angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(1):106-15.
 134. Hofmann J, Hofmann B, Sturm G, Till U. Evidence for glutathione-S-transferase activity in human blood platelets. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(5):K5-11.
 135. Menzel H, Steiner G, Lombeck I, Ohnesorge FK. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity of platelets. *Eur J Pediatr*. julio de 1983;140(3):244-7.
 136. Corcoran SE, O'Neill LAJ. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest*. 03 de 2016;126(10):3699-707.
 137. Idzko M, Pitchford S, Page C. Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. junio de 2015;135(6):1416-23.

138. Turkalj M, Banic I. The Role of Platelets in Allergic Inflammation and Asthma. En: Pereira C, editor. Asthma - Biological Evidences [Internet]. IntechOpen; 2019 [citado 2 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/asthma-biological-evidences/the-role-of-platelets-in-allergic-inflammation-and-asthma>
139. Takeda T, Morita H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Recent advances in understanding the roles of blood platelets in the pathogenesis of allergic inflammation and bronchial asthma. *Allergol Int.* julio de 2018;67(3):326-33.
140. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* julio de 2008;454(7203):445-54.
141. Willemsen LEM. Dietary n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in allergy prevention and asthma treatment. *Eur J Pharmacol.* 15 de agosto de 2016;785:174-86.
142. Wendell SG, Baffi C, Holguin F. Fatty acids, inflammation, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* mayo de 2014;133(5):1255-64.
143. Giudetti AM, Cagnazzo R. Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1 de diciembre de 2012;99(3):57-67.
144. Badsha H, Harifi G, Murrell WD. Platelet Rich Plasma for Treatment of Rheumatoid Arthritis: Case Series and Review of Literature. *Case Rep Rheumatol [Internet].* 2020 [citado 16 de septiembre de 2020];2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7021456/>
145. Ho WE, Xu Y-J, Xu F, Cheng C, Peh HY, Tannenbaum SR, et al. Metabolomics Reveals Altered Metabolic Pathways in Experimental Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1 de febrero de 2013;48(2):204-11.
146. Dourado LPA, Noviello M de LM, Alvarenga DM, Menezes Z, Perez DA, Batista NV, et al. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cell Immunol.* 1 de enero de 2011;270(2):198-206.
147. Liu X, Ng CL, Wang DY. The efficacy of sublingual immunotherapy for allergic diseases in Asia. *Allergol Int.* 1 de julio de 2018;67(3):309-19.
148. Fujimura T, Okamoto Y, Taniguchi M. Therapeutic Effects and Biomarkers in Sublingual Immunotherapy: A Review. *J Allergy [Internet].* 2012 [citado 16 de septiembre de 2020];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303629/>
149. Aasbjerg K, Backer V, Lund G, Holm J, Nielsen NC, Holse M, et al. Immunological comparison of allergen immunotherapy tablet treatment and subcutaneous immunotherapy against grass allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* marzo de 2014;44(3):417-28.

150. Ott H, Sieber J, Brehler R, Fölster-Holst R, Kapp A, Klimek L, et al. Efficacy of grass pollen sublingual immunotherapy for three consecutive seasons and after cessation of treatment: the ECRIT study. *Allergy*. septiembre de 2009;64(9):1394-401.
151. Lim JH, Kim JY, Han DH, Lee CH, Hong S-N, Wee JH, et al. Sublingual immunotherapy (SLIT) for house dust mites does not prevent new allergen sensitization and bronchial hyper-responsiveness in allergic rhinitis children. *PloS One*. 2017;12(8):e0182295.
152. Zhang W, Lin C, Sampath V, Nadeau K. Impact of allergen immunotherapy in allergic asthma. *Immunotherapy*. 23 de marzo de 2018;10(7):579-93.
153. Veen W van de, Akdis M. Tolerance mechanisms of allergen immunotherapy. *Allergy*. 2020;75(5):1017-8.
154. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M, et al. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2012;130(5):1153-1158.e2.
155. Kouser L, Kappen J, Walton RP, Shamji MH. Update on Biomarkers to Monitor Clinical Efficacy Response During and Post Treatment in Allergen Immunotherapy. *Curr Treat Options Allergy*. 2017;4(1):43-53.
156. Kulis MD, Patil SU, Wambre E, Vickery BP. Immune mechanisms of oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):491-8.
157. Jiménez-Saiz R, Patil SU. The Multifaceted B Cell Response in Allergen Immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 05 de 2018;18(12):66.
158. Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. octubre de 2013;132(4):922-932.e1-16.
159. Suárez-Fueyo A, Ramos T, Galán A, Jimeno L, Wurtzen PA, Marin A, et al. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J Allergy Clin Immunol*. enero de 2014;133(1):130-138.e2.
160. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 de marzo de 2011;27(6):863-4.
161. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 de noviembre de 2011;27(21):2957-63.
162. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-3.

163. 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.* agosto de 2007;73(16):5261-7.
164. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell.* marzo de 2014;157(1):121-41.
165. Lazar V, Ditu L-M, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol.* 15 de agosto de 2018;9:1830.
166. Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome. *Cell Host Microbe.* mayo de 2015;17(5):592-602.
167. Tun HM, Bridgman SL, Chari R, Field CJ, Guttman DS, Becker AB, et al. Roles of Birth Mode and Infant Gut Microbiota in Intergenerational Transmission of Overweight and Obesity From Mother to Offspring. *JAMA Pediatr.* 01 de 2018;172(4):368-77.
168. Nyangahu DD, Lennard KS, Brown BP, Darby MG, Wendoh JM, Havyarimana E, et al. Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome [Internet].* 7 de julio de 2018 [citado 16 de septiembre de 2020];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6035804/>
169. Melli LCFL, do Carmo-Rodrigues MS, Araújo-Filho HB, Solé D, de Moraes MB. Intestinal microbiota and allergic diseases: A systematic review. *Allergol Immunopathol (Madr).* marzo de 2016;44(2):177-88.
170. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol.* octubre de 2016;138(4):1122-30.
171. Dong P, Feng J, Yan D, Lyu Y, Xu X. Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case - control 6-month follow-up study. *Saudi J Biol Sci.* julio de 2018;25(5):875-80.
172. Kemp AS, Hill DJ, Allen KJ, Anderson K, Davidson GP, Day AS, et al. Guidelines for the use of infant formulas to treat cows milk protein allergy: an Australian consensus panel opinion. *Med J Aust.* enero de 2008;188(2):109-12.
173. Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child.* 1 de octubre de 2007;92(10):902-8.
174. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology.* agosto de 2017;151(4):363-74.
175. Aquino SG de, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, Loo FAJ van de, Pruijn GJM, Marijnissen RJ, et al. Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune

- Experimental Arthritis by Inducing a TLR2- and IL-1–Driven Th17 Response. *J Immunol.* 1 de mayo de 2014;192(9):4103-11.
176. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol.* septiembre de 2002;37(9):1034-41.
 177. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* 1 de diciembre de 2015;22(6):971-82.
 178. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, Sandhu K, Gao Z, Wang B, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv.* 3 de abril de 2015;1(3).
 179. Ruiz-Ruiz S, Sanchez-Carrillo S, Ciordia S, Mena MC, Méndez-García C, Rojo D, et al. Functional microbiome deficits associated with ageing: Chronological age threshold. *Aging Cell.* 2020;19(1):e13063.
 180. Chaudhari DS, Dhotre DP, Agarwal DM, Gaike AH, Bhalerao D, Jadhav P, et al. Gut, oral and skin microbiome of Indian patrilineal families reveal perceptible association with age. *Sci Rep.* 30 de 2020;10(1):5685.
 181. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* mayo de 2018;50(5):421-8.
 182. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Res Int.* 2017;2017:9351507.
 183. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* 10 de enero de 2019;7(1).
 184. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2017;81(4).
 185. Larsen PE, Dai Y. Metabolome of human gut microbiome is predictive of host dysbiosis. *GigaScience.* 2015;4:42.