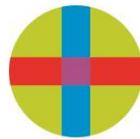


Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de Doctorado

PROGRAMA en MEDICINA TRASLACIONAL



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

Remodelado de la Mucosa Oral en Alergia y Celiaquía y Marcadores Sistémicos Asociados

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Javier Sánchez Solares

Dirigida por:

Domingo Barber Hernández

Cristina Gómez Casado

MADRID

2021

Agradecimientos

Abreviaturas y Acrónimos

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Areg: anfirregulina.

AATG-2: anticuerpos anti-transglutaminasa 2.

ALH: antígeno leucocitario humano.

AN: asesinos naturales.

CD: célula dendrítica.

CLI: célula linfoide innata.

CMSP: células mononucleares sanguíneas periféricas.

CD#: cúmulo de diferenciación.

DE: desviación estándar.

DAB: diaminobencidina.

DSG: dieta sin gluten.

EPFF: embebidas en parafina y fijados con formalina.

EC: enfermedad celiaca.

EP: enfermedad periodontal.

EILE: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

FAP: factor activador de plaquetas.

FCEV-a: factor de crecimiento endotelial vascular-a.

FCT- β : factor de crecimiento transformante β .

FNT: factor de necrosis tumoral.

FEC-GM: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

CMI: genes relacionados con cadenas de MHC I.

GAPDH: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

H-E: hematoxilina-eosina.

Ig: inmunoglobulina.

IHQ: inmunohistoquímica.

IT: inmunoterapia.

ITSL: inmunoterapia Sublingual.

IFN: interferón.

IL: interleucina.

RT-cRCP: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa.

LT: leucotrieno

CCL2: ligando 2 de la citoquina con motivo CC.

LIE: linfocito Intraepitelial.

Linfocito Th: linfocito T *helper*, en castellano T colaborador.

LPET: linfopoyetina estromal tímica.

MPM: metaloproteinasas de la matriz.

POSTN: periostina.

PPL: periplaquina.

PG: prostaglandina.

PTLs: proteínas de transferencia de lípidos.

FcεRI:receptor de alta afinidad para IgE.

RCT: receptor de célula T.

SAO: síndrome de alergia oral.

IL-15R α : subunidad alfa del receptor para interleucina 15.

Treg: T regulador.

TLAM: tejido linfoide asociado a mucosa.

TM: triptasa de mastocitos.

ZO: *zonula occludens*.

Resumen

Antecedentes: La alergia respiratoria es la más común a nivel mundial. Los estudios en Europa demuestran que en torno a un 30% de la población sufre de rinoconjuntivitis alérgica. De este porcentaje, el 20% de ellos padece además asma. Tanto el asma como la rinitis alérgica cursan con un remodelado intenso en la vía respiratoria. Sin embargo, este remodelado no ocurre únicamente en la vía aérea. Recientemente, se ha descrito en pacientes alérgicos al polen de gramíneas residentes en áreas de alta exposición y sensibilizados al pan-alérgeno profilina, un importante remodelado de la mucosa oral.

Hipótesis: El remodelado oral podría ser consecuencia de la alergia respiratoria a gramíneas, y podría, por tanto, observarse en otro tipo de alergias respiratorias graves a otros aeroalérgenos como el polen de olivo o los ácaros. Además, si la alteración de la barrera epitelial es un proceso común no sólo en enfermedades alérgicas, la mucosa oral podría experimentar remodelado en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad celiaca (EC). En ambas enfermedades, el remodelado podría estar asociado a la presencia de marcadores de daño epitelial a nivel sistémico.

Objetivos y métodos: Se pretende analizar el patrón de remodelado del epitelio oral en biopsias orales de pacientes con patología alérgica respiratoria grave causada por polen de olivo y por ácaros. Asimismo, se pretende aplicar este concepto a la EC analizando el posible patrón de remodelado del epitelio oral en biopsias orales de pacientes celíacos con enfermedad activa y pacientes en dieta sin gluten (DSG). Además, se estudia el perfil de marcadores sistémicos asociados a inflamación en sujetos alérgicos y celíacos.

Resultados: La expresión de proteínas de las uniones intercelulares epiteliales, tales como la e-cadherina, la ocludina y la claudina-1, se encuentra disminuida en el epitelio bucal de los pacientes alérgicos y

celiacos, incluso cuando los alérgicos no presentan alergia alimentaria concomitante y los celíacos mantienen al menos 1 año de tratamiento siguiendo una DSG. En ambas enfermedades, el remodelado epitelial se produce en ausencia de un incremento notable del infiltrado inmune, exceptuando un aumento significativo de la población de linfocitos T reguladores. Estos pacientes, a su vez, muestran un incremento significativo en los niveles sistémicos de distintas citoquinas epiteliales (IL-33, IL-25 y LPET).

Conclusiones: En ambas enfermedades se produce un daño epitelial en ausencia de un incremento notable del infiltrado inmune. El infiltrado es presumiblemente enviado a las mucosas respiratoria o intestinal. Por esta razón, nosotros hipotetizamos que los daños observados son consecuencia de las alteraciones observadas a nivel sistémico en las citoquinas epiteliales y factores proinflamatorios. El remodelado oral podría jugar un papel relevante en la evolución de la enfermedad alérgica, la manifestación de lesiones orales en la EC y en los mecanismos de la inmunoterapia sublingual en enfermedad alérgica y su posible aplicación en EC.

Índice

INTRODUCCIÓN	16
1. Alergia respiratoria	16
1.1. Definición de alergia y alergia respiratoria	16
1.2. Etiopatogenia inmunológica de la alergia	16
1.3. Diagnóstico y tratamiento de la alergia respiratoria	19
1.4. La alergia respiratoria en España	22
1.5. Alergia respiratoria al polen de olivo y ácaros	23
2. Enfermedad Celiaca	26
2.1. Definición, prevalencia y clínica de la enfermedad celiaca	26
2.2. Etiopatogenia inmunológica de la enfermedad celiaca	27
2.3. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celiaca	28
3. Estructura e integridad de la mucosa oral	31
3.1. Organización general de la mucosa oral	31
3.2. Histología de la mucosa oral de revestimiento	32
3.3. Uniones intercelulares en el epitelio	33
3.4. Sistema inmune asociado a la mucosa oral	35
4. Alteración de la integridad tisular	39
4.1. Ruptura de la integridad de las uniones intercelulares epiteliales	40
4.2. Citoquinas epiteliales asociadas a la alteración de la integridad tisular	40
4.3. Fibrosis y angiogénesis	41
4.4. Fisiopatología de la mucosa oral en enfermedades sistémicas	43
5. Antecedentes al presente estudio.	43
5.1. Alteraciones en la cavidad oral en enfermedad celiaca	43
5.2. Alteraciones en la cavidad oral en alergia respiratoria a polen de gramíneas asociada a alergia alimentaria a profilina	44
5.3. Alteraciones en la cavidad oral en alergia respiratoria sin alergia alimentaria..	46
HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y UTILIDAD PRÁCTICA	47
MATERIALES Y MÉTODOS	50

1. Sujetos del estudio.....	50
2. Estudios histológicos y expresión génica en biopsias	54
2.1. Obtención de biopsias de mucosa oral	54
2.2. Procesado de biopsias de mucosa oral.....	57
2.3. Tinciones histológicas.....	58
2.4. Inmunohistoquímica.....	59
2.5. Análisis de imagen.....	60
2.6. Aislamiento de ARN de biopsias de mucosa oral y CMSPs	61
3. Estudios sistémicos	64
3.1. Obtención de suero, plasma y CMSPs a partir de sangre periférica	64
3.2. Obtención del ARN de las CMSPs	64
3.3. EILE multiplex: FCEV-a, PQM-1 y FCT- β	65
3.4. EILE simple: IL-25, IL-33, LPET y FAP	65
4. Análisis estadístico	66
RESULTADOS ALERGIA ESTUDIO MUCOSA ORAL.....	68
1. Características clínicas de los sujetos control y pacientes alérgicos	68
2. Análisis descriptivo preliminar de la mucosa oral	70
3. Integridad de la mucosa oral de pacientes alérgicos.....	70
3.1. Integridad de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes alérgicos.....	70
3.2. Deposición de fibras de colágeno en la mucosa oral de pacientes alérgicos.....	73
3.3. Angiogénesis en la mucosa oral de pacientes alérgicos.....	74
4. Respuesta inmune desarrollada en la mucosa oral de pacientes alérgicos	75
4.1. Infiltrado linfocitario: CD3, CD4 y FoxP3	75
4.2. Infiltrado células presentadoras de antígeno: Langerhans y CD11c	77
4.3. Infiltrado característico de alergia: eosinófilos, mastocitos y receptor Fc ϵ RI.....	78
4.4. Infiltrado de neutrófilos y eosinófilos	79
RESULTADOS ALERGIA: MARCADORES SISTÉMICOS	81
1. Características clínicas de los sujetos control y pacientes alérgicos	81

2. Niveles sistémicos de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral.....	88
3. Niveles sistémicos de citoquinas asociadas a la inflamación alérgica.....	90
4. Correlaciones entre citoquinas inflamatorias y alarminas epiteliales.....	91
RESULTADOS CELIAQUÍA.....	94
1. Características clínicas de los sujetos control y celíacos.....	94
2. Análisis descriptivo preliminar de la mucosa oral.....	97
3. Integridad de las uniones intercelulares en biopsias de mucosa oral de pacientes celíacos.....	98
3.1. Inmunohistoquímica de las uniones intercelulares.....	98
3.2. Expresión génica de las uniones intercelulares.....	98
4. Respuesta inmune desarrollada en la mucosa oral de pacientes celíacos.....	100
4.1. Infiltrado linfocitario: CD3, CD4 y CD8.....	100
4.2. Infiltrado de linfocitos T reguladores (Treg).....	101
4.3. Infiltrado células presentadoras de antígeno, linfocitos B, neutrófilos y eosinófilos.	104
5. Correlaciones entre infiltrado, daño tisular y anfirregulina.....	105
5.1. Correlación entre infiltrado y daño tisular.....	105
5.2. Correlación entre Treg y anfirregulina.....	106
6. Expresión génica de marcadores asociados a EC en la mucosa oral.....	106
7. Expresión génica de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral y a nivel sistémico.....	107
7.1. Expresión génica de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral	107
7.2. Niveles sistémicos de citoquinas asociadas al remodelado epitelial.....	108
DISCUSIÓN.....	110
CONCLUSIONES.....	123
BIBLIOGRAFÍA.....	125
LISTADO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	144

Índice de figuras

Figura 1. Fases de la inflamación alérgica usando como ejemplo el modelo asmático.....	19
Figura 2. Dianas moléculas de las terapias biológicas actuales y futuras para el asma alérgico.	21
Figura 3. Distribución geográfica de los niveles de polvo y Ácaros en España.	23
Figura 4. Destrucción del tejido intestinal en la enfermedad celiaca.	27
Figura 5. Clasificación histológica Marsh.	30
Figura 6. Organización general de la mucosa oral.	31
Figura 7. Uniones intercelulares epiteliales principales y sus componentes principales....	34
Figura 8. Red de componentes inmunológicos de la mucosa oral. La distribución de las células inmunitarias en las distintas partes de la mucosa oral es diferente.	36
Figura 9. Remodelado oral en respuesta al daño epitelial.	39
Figura 10. Contribución del remodelado epitelial de la mucosa oral en las reacciones alérgicas alimentarias a profilina.	46
Figura 11. Modelos de enfermedad planteados para el estudio y referidos a la exposición antigénica en la mucosa oral.	49
Figura 12. Resumen de la muestras obtenidas, su procesado y técnicas aplicadas para todos los sujetos y pacientes celiacos y alérgicos.....	55
Figura 13. Técnicas empleadas para la extracción de biopsias de mucosa oral.	56
Figura 14. Imágenes representativas de la metodología de análisis de imagen.	63
Figura 15. Datos demográficos y clínicos de los sujetos control y pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de la mucosa oral.	70
Figura 16. H-E de la mucosa oral extraída con la técnica de incisión con bisturí.	72
Figura 17. Cuantificación de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes alérgicos y controles.	73
Figura 18. Cuantificación de las fibras de colágeno y angiogénesis en la mucosa oral de pacientes alérgicos y controles.	74
Figura 19. Cuantificación de linfocitos T en la mucosa oral de pacientes alérgicos y sujetos control.	76

Figura 20. Cuantificación de células presentadoras de antígeno en la mucosa oral de los pacientes alérgicos y sujetos control.....	78
Figura 21. Cuantificación de mastocitos y células FcεRI en la mucosa oral de los pacientes alérgicos y sujetos control.	79
Figura 22. Cuantificación de neutrófilos y eosinófilos en la mucosa oral de pacientes alérgicos y sujetos control.	80
Figura 23. Datos demográficos de los sujetos control y pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de citoquinas a nivel sistémico.	83
Figura 24. Datos clínicos de sensibilización de los pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de citoquinas a nivel sistémico.	87
Figura 25. Niveles de alarminas epiteliales en suero medidos por EILE en pacientes alérgicos y sujetos control.	89
Figura 26. Niveles de citoquinas inflamatorias en suero medidos por EILE en pacientes alérgicos y sujetos control.	91
Figura 27. Correlaciones significativas entre alarminas epiteliales y citoquinas inflamatorias en pacientes alérgicos y sujetos control.	92
Figura 28. Datos demográficos y clínicos de los sujetos control y pacientes celíacos en el estudio de la mucosa oral.	95
Figura 29. Análisis descriptivo de la mucosa oral tras biopsia por punción con sacabocados.	97
Figura 30. Cuantificación inmunohistoquímica y expresión de ARNm de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes celíacos y controles.	99
Figura 31: Cuantificación de las linfocitos T CD3, CD4 y CD8 en pacientes celíacos y sujetos control.	101
Figura 32. Histoquímica e inmunohistoquímica para células T γδ, linfocitos B, neutrófilos y eosinófilos en la mucosa oral de pacientes celíacos y sujetos control.	102
Figura 33. Cuantificación de células T reguladoras en la mucosa oral de pacientes celíacos y sujetos control.	103
Figura 34. Cuantificación de las células presentadoras de antígeno (CPAs) en la mucosa oral de los pacientes celíacos y sujetos control.	105
Figura 35. Correlaciones significativas entre el infiltrado, daño tisular y CMSPs en pacientes celíacos y sujetos control.	106

Figura 36. Expresión ARNm de marcadores de EC en la mucosa oral de pacientes celíacos.	107
Figura 37. Expresión ARNm de marcadores de daño epitelial en la mucosa oral de pacientes celíacos.	108
Figura 38. Niveles de alarminas epiteliales en plasma medidos por EILE en pacientes con EC y sujetos control.	109

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación histológica Marsh.....	30
Tabla 2. Resumen comparativo de la enfermedad celiaca y la alergia respiratoria.....	47
Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados en las diferentes tinciones inmunohistoquímicas llevadas a cabo sobre la mucosa oral.....	62
Tabla 4. Información detallada de los pacientes alérgicos implicados en el estudio de la mucosa oral.....	71
Tabla 5. Información detallada de los pacientes alérgicos a olivo implicados en el estudio de alarminas y citoquinas a nivel sistémico.....	84
Tabla 6. Información detallada de los pacientes alérgicos a ácaros implicados en el estudio de alarminas y citoquinas a nivel sistémico.....	85
Tabla 7. Información detallada de los pacientes celíacos del estudio.....	96
Tabla 8. Resumen de los resultados para el remodelado epitelial, la fibrosis y la angiogénesis en la mucosa oral de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo.....	121
Tabla 9. Resumen de los resultados para el infiltrado celular en la mucosa oral de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo control.....	121
Tabla 10. Resumen de los resultados para el nivel de alarminas a nivel sistémico de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo control.....	122

Introducción

1. Alergia respiratoria

1.1. Definición de alergia y alergia respiratoria

La alergia es una reacción inmunológica de hipersensibilidad mediada por alérgenos que induce enfermedad en individuos genéticamente predispuestos (atópicos) (1). Los alérgenos son antígenos capaces de instruir al sistema inmune para producir inmunoglobulinas (Ig) clase E. En clínica, la alergia se manifiesta mediante distintos síndromes, entre los que podemos destacar: la anafilaxis, el asma bronquial, la rinitis o sinusitis alérgica y la alergia a alimentos (1,2).

La alergia respiratoria se define como aquella que se manifiesta en forma de rinitis o asma alérgico, y que es inducida por un alérgeno inhalado (3). Se trata del tipo de alergia más común a nivel mundial, de hecho, algunos estudios en Europa revelan que en torno al 30% de la población sufre de rinoconjuntivitis alérgica, mientras que un 20% de ellos presenta asma, además, su incidencia se encuentra en aumento (4). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la rinitis alérgica y el asma afectan hasta 800 millones de personas en todo el mundo (5). Los principales síntomas de la rinitis alérgica son estornudos, conjuntivitis, congestión nasal, picazón, etc. Si el alérgeno es capaz de inducir asma lo más común es padecer disnea, respiración sibilante, opresión en el pecho o falta de aire (4).

1.2. Etiopatogenia inmunológica de la alergia

La reacción alérgica está caracterizada por una respuesta inmune de linfocitos colaboradores tipo 2 (en inglés, T helper 2 o Th2) específicos de alérgeno, y por la aparición de las interleucinas (IL)-4, -5 y -13 (6,7). Estas citoquinas inducen un ambiente proinflamatorio que involucra a otros tipos celulares: células epiteliales de la mucosa, células dendríticas (CDs), mastocitos, basófilos y eosinófilos (8,9).

Tras la sensibilización al alérgeno, el curso de la reacción alérgica se divide conceptualmente en 3 fases: fase temprana, fase tardía, e inflamación alérgica crónica (10,11).

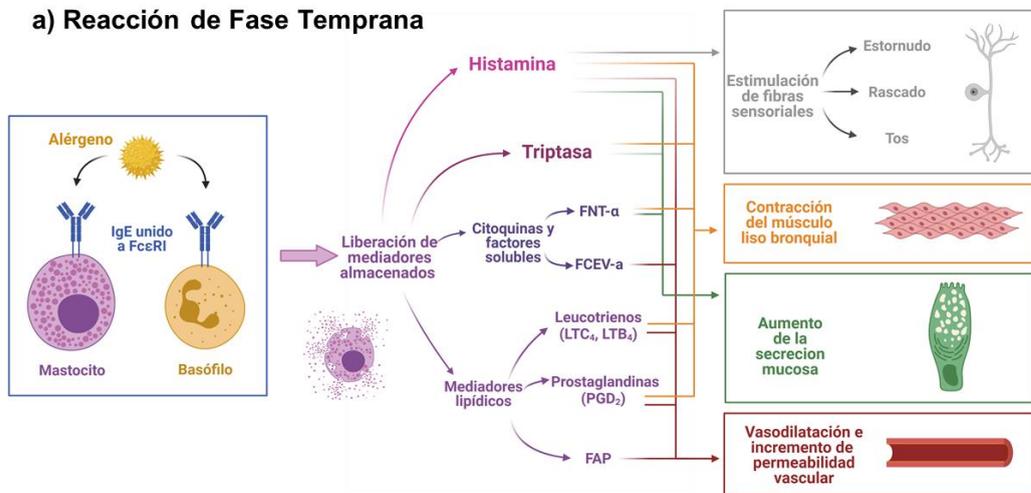
- Sensibilización

Previamente a la aparición de una reacción alérgica tiene que existir una sensibilización al alérgeno. En los órganos linfoides secundarios, las células presentadoras de antígeno (CPAs), principalmente CD4 y macrófagos, fagocitan y procesan los alérgenos hasta péptidos. Estos péptidos alergénicos son presentados vía el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II a los linfocitos T vírgenes, induciendo una polarización del linfocito hacia una respuesta Th2. La liberación de citoquinas Th2 actúa sobre los linfocitos B, promoviendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE específica para el alérgeno procesado por las CPAs. Finalmente, esta IgE liberada por las células plasmáticas se une a los receptores de alta afinidad de IgE (FcεR1) de la superficie de los mastocitos y los basófilos (10,12).

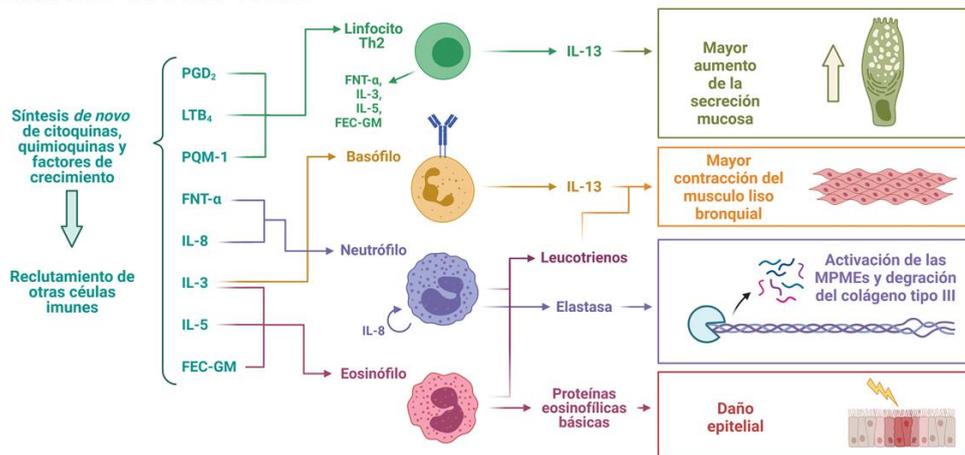
- Reacción de fase temprana

La reacción de fase temprana se inicia tras una reexposición al alérgeno al que se ha sido sensibilizado. Ahora, el alérgeno se unirá a las IgE ancladas en el mastocito e inducirá en él la liberación de distintos mediadores preformados y almacenados en gránulos citoplasmáticos. Estos mediadores son principalmente sustancias vasoactivas y citoquinas proinflamatorias: histamina, triptasas, factor de necrosis tumoral alfa (FNT-α), o el factor de crecimiento endotelial vascular A (FCEV-a), y mediadores lipídicos como la prostaglandina (PG) tipo D₂ o leucotrienos (LT) tipo B₄. (10,13,14) (**Figura 1 a**). Cuando estos mediadores son liberados de manera local y controlada, los síntomas suelen ser leves; sin embargo, si se produce una liberación masiva, entran en la vía circulatoria y pueden causar una grave reacción sistémica denominada anafilaxia (10,15).

a) Reacción de Fase Temprana



b) Reacción de Fase Tardía



c) Inflamación Alérgica Crónica

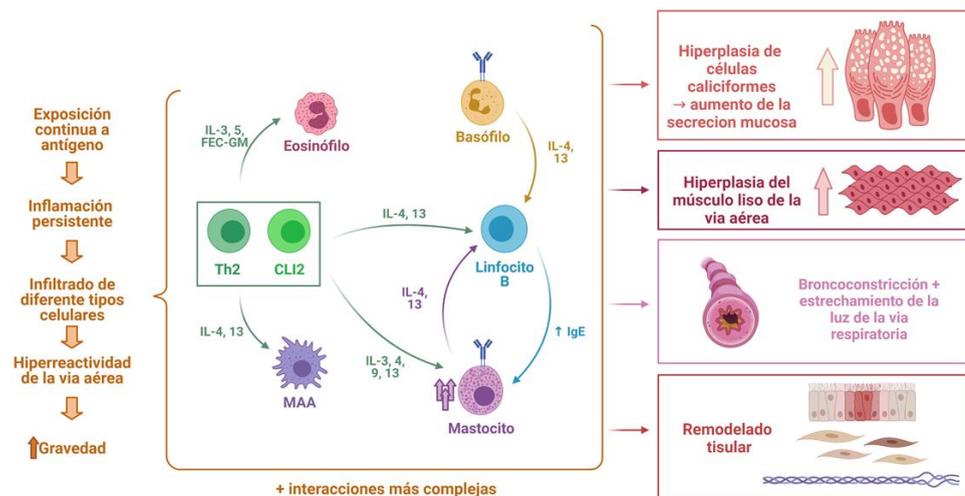


Figura 1. Fases de la inflamación alérgica usando como ejemplo el modelo asmático. (a) Reacción de fase temprana, (b) Reacción de fase tardía, (c) Inflamación alérgica crónica. MAA: macrófago alternativamente activado, CCL2: ligando 2 de la citoquina con motivo CC, FcεRI: Receptor de alta afinidad para IgE, FEC-GM factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, Ig: inmunoglobulina, IL: interleucina, CLI2: célula linfoide innata 2, LT: leucotrieno, MPMs: metaloproteasas de matriz extracelular, FAP: factor activador de plaquetas, PG: prostaglandina, FNT-α: Factor de Necrosis Tumoral α. Traducido de Rodriguez-Coira et al (19).

- Reacción de fase tardía

Además de estos mediadores preformados, los mastocitos también producen otros mediadores *de novo* cuando se exponen al alérgeno. Este proceso es más lento que el de desgranulación, y se considera una reacción de fase tardía que puede ocurrir varias horas después de la exposición al alérgeno. Durante esta fase, distintos mediadores como el FNT-α, la interleucina (IL) 8, el ligando 2 de quimioquina motivo CC (CCL2), LTs y otras quimioquinas inducen el reclutamiento de más Th2, pero también de otros tipos celulares (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, y basófilos) los cuales acaban provocando un mayor daño en el tejido (**Figura 1 b**) (16). Las reacciones de fase tardía no ocurren en todos los pacientes, y pueden no estar claramente diferenciadas de la fase temprana (10).

- Inflamación alérgica crónica

Si la exposición al alérgeno persiste en el tiempo o la inflamación no se resuelve, la respuesta inmune evoluciona hacia una inflamación alérgica crónica. Esta inflamación se caracteriza por la aparición de múltiples tipos de células inmunes, tanto del sistema inmune innato como adaptativo. Este infiltrado crónico puede inducir remodelado tisular alterando las funciones del órgano afectado (17–19) (**Figura 1 c**).

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la alergia respiratoria

- Diagnóstico de la alergia respiratoria

Tras encontrar clínica sospechosa, el diagnóstico de la alergia respiratoria ha estado históricamente basado en la identificación de atopia

positiva, es decir, la detección de IgE (3). La sensibilización a un alérgeno puede ser detectada de manera directa midiendo los niveles de IgE específicas frente al alérgeno en suero. Sin embargo, también existen métodos indirectos de estudio de sensibilización mediante una prueba de punción cutánea frente a alérgeno, o una prueba de activación de basófilos frente al alérgeno en muestras de sangre periférica (20).

Aunque las pruebas de sensibilización pueden ser concluyentes, la confirmación de etiología alérgica puede requerir la provocación con el alérgeno. Esta provocación se puede llevar a cabo por vía oral, para las alergias alimentarias, o bronquial o nasal, en el caso de la alergia respiratoria. El resultado de la provocación será positivo cuando induzca sintomatología en el paciente (3,20).

- Tratamiento de la alergia respiratoria

Además de evitar la exposición al alérgeno y la medicación que controla los síntomas (antihistamínicos, agonistas β , adrenalina, etc.), en los últimos años se han desarrollado tratamientos específicos para la alergia: vacunas contra la alergia o inmunoterapia. La inmunoterapia (IT) se basa en la dosificación de cantidades cada vez mayores de alérgenos durante un período de semanas o meses para desarrollar desensibilización e inducir tolerancia en pacientes con alergia mediada por IgE. Los mecanismos implicados en este proceso incluyen un aumento inicial y transitorio de linfocitos T reguladores (Treg) que desvían la respuesta Th2 (propia de la alergia) a respuesta Th1 (21). Además, la IT contribuye a reducir la activación de mastocitos y basófilos, y la liberación de mediadores (22).

En 2007, se registran siguiendo por primera vez los requerimientos aplicables al desarrollo de medicamentos nuevos tratamientos sublinguales (inmunoterapia sublingual, ITSL) para la alergia a pólenes y ácaros (23,24). Este hecho supone un salto cualitativo en el tratamiento de la alergia y el inicio de una investigación sistemática sobre los mecanismos implicados. Sin embargo, la IT no es eficaz en todos los pacientes. Este es el caso de los pacientes con patología alérgica grave, los cuales presentan mala

tolerancia a la IT y una ausencia de respuesta, siendo necesarios estudios para entender las limitaciones de este tipo de intervención y poder diseñar nuevas estrategias de intervención basadas en el uso de nuevos fármacos biológicos (25,26), un resumen de las dianas de estos fármacos aparece en la **Figura 2**.

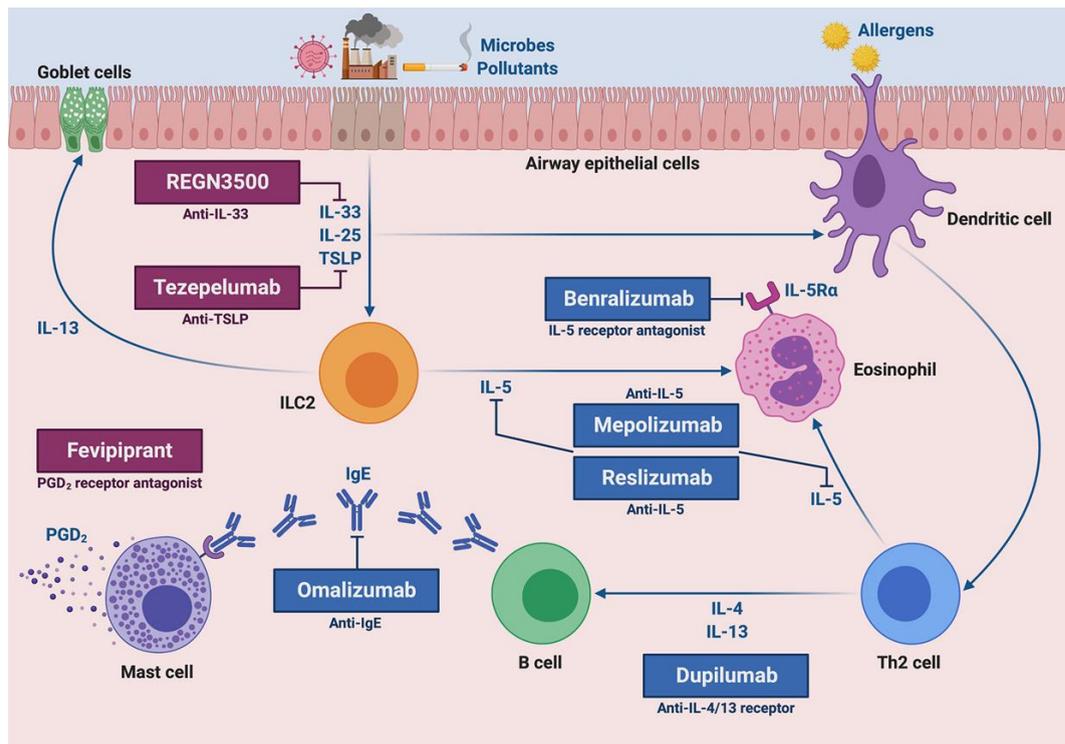


Figura 2. Dianas moléculas de las terapias biológicas actuales y futuras para el asma alérgico. Las dianas aprobadas (en color azul) incluyen IgE (omalizumab), IL-5 (mepolizumab y reslizumab), el receptor de IL-5 (benralizumab), y el complejo receptor de IL-4/IL-13 (dupilumab). Además, se incluyen fármacos experimentales (en color magenta) como el tezepelumab, el REGN3500 y el fevipirant que son diana para LPET, IL-33 y el receptor CRTH2 de PGD₂, respectivamente. PGD₂: prostaglandina D₂, Ig: inmunoglobulina, LPET: linfopoyetina estromal tímica, CLI: célula linfoide innata, IL: interleucina. Imagen traducida de: Pelaia et al, 2020 (26).

El tipo de tratamiento de inicio dependerá de la gravedad de la alergia respiratoria. En el caso de la rinitis alérgica, la guía de Rinitis Alérgica y su Impacto en el Asma o ARIA, por sus siglas en inglés, estratifica a los pacientes en función de la duración de los síntomas (intermitente o persistente) y de su gravedad (moderada o moderada-grave) (27). Además, describe dos tipos de rinitis: la rinitis estacionaria, mediada por alérgenos

externos (como el polen), y la rinitis perenne, mediada por alérgenos de interior (como los ácaros). En el caso del asma, la Iniciativa Global para el Asma o GINA, por sus siglas en inglés, inicialmente establece una estratificación del asma en función de los síntomas y las pruebas de función pulmonar. Aparecen cuatro categorías: intermitente, persistente leve, persistente moderado o persistente grave (28). Actualmente, aunque esta clasificación es útil para el tratamiento de inicio o para estudios clínicos, ya no se recomienda tener en cuenta para establecer el tratamiento continuado y su seguimiento, apareciendo una nueva clasificación basada en la respuesta a tratamiento con mayor relevancia clínica (29).

1.4. La alergia respiratoria en España

La diversidad geográfica y climatológica hace de España un entorno muy complejo y único para la alergia respiratoria. Podemos definir tres áreas muy diferenciadas (30). La primera, dominada por sensibilización a polen de gramíneas (norte, noroeste, centro), una segunda zona en la que el alérgeno dominante es el polen de olivo (fundamentalmente Andalucía) (**Figura 3 a**) y por último el arco mediterráneo con patrones muy complejos de sensibilización a múltiples pólenes. España presenta los niveles más altos de exposición descritos a cualquier polen a nivel mundial, tal es el caso del polen de olivo en áreas de Andalucía o de polen de gramíneas en Extremadura (31). Estos elevados niveles de exposición inducen patrones clínicos muy diferentes en estas zonas, con un perfil clínico más grave y con necesidades diagnósticas y terapéuticas específicas (31).

En cuanto a la población de ácaros, la determinación de contenido de alérgenos de ácaros en polvo en 3000 muestras analizadas a lo largo de España demuestra una mayor presencia de ácaros en las regiones del norte de España y Canarias con una concentración de 10µg/ml de Der p 1 (Barber et al, sin publicar) (**Figura 3 b**).

Lo interesante de los modelos de alta exposición, es que proporcionan diseños experimentales excelentes para abordar proyectos que nos

permitan buscar marcadores de inflamación con el fin de identificar nuevas formas de diagnóstico y para evaluar marcadores que permitan determinar el nivel de inflamación alérgica de un paciente concreto y diseñar terapias personalizadas más seguras y eficaces.

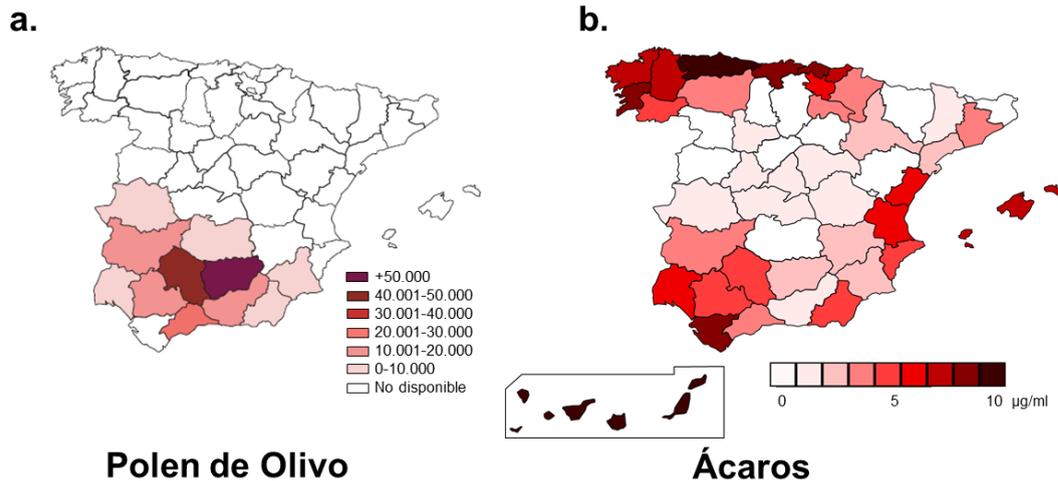


Figura 3. Distribución geográfica de los niveles de polen y Ácaros en España. a) Contaje total de granos de polen de olivo acumulado en las provincias del sur de España. b) Contenido de alérgenos de ácaros en polvo a lo largo de España expresados como concentración de Der p 1 (m/v, µg/ml). Datos obtenidos de: Red Española de Aerobiología (REA) in Boletín 4 (1998).

1.5. Alergia respiratoria al polen de olivo y ácaros

- Alergia respiratoria al polen de olivo

La alergia al polen de olivo (*Olea europea*) en los países mediterráneos y algunas áreas de América, Sudáfrica, Japón y Australia constituye una de las polinosis más importantes. Dada la alta densidad de cultivo, las zonas de Jaén y Córdoba presentan concentraciones superiores a 10.000 gramos/m³ durante la época de polinización. En estas zonas una fracción relevante de los pacientes alérgicos presentan una patología alérgica grave (32).

Actualmente se han identificado 14 alérgenos de olivo, desde Ole e 1 a Ole e14. Algunos alérgenos se consideran mayoritarios, porque exhiben una prevalencia mayor al 50%; éste es el caso de Ole e1 y Ole e4. Sin

embargo, la prevalencia de los alérgenos de olivo está relacionada con el área geográfica de la población sensibilizada. Aunque Ole e1 parece ser el único alérgeno relevante en áreas de baja o intermedia exposición, los alérgenos minoritarios (<50% de prevalencia) se convierten en alérgenos mayoritarios en áreas de alta exposición. Esto es relevante a la hora de diagnosticar y diseñar tratamiento de IT, que debe imitar con la mayor semejanza posible el panel de alérgenos al que están expuestos los pacientes (32).

Ole e1 es el principal alérgeno del polen de olivo, con una prevalencia que cubre desde el 55 al 90% de los pacientes, dependiendo del área geográfica. Es la proteína más abundante del polen y contribuye significativamente a su alergenicidad, correlacionándose su concentración con el potencial alergénico total de los extractos (33).

Ole e7 es una proteína perteneciente a la familia de proteínas de transferencia de lípidos (PTLs) con escasa reactividad cruzada a nivel de IgE con PTLs de alimentos (34,35) y aunque normalmente es un alérgeno minoritario, en zonas de alta exposición llega a sensibilizar a la mitad de la población alérgica a olivo (36). Al igual que Ole e7, Ole e9 puede ser mayoritario en poblaciones que residen en áreas de alta exposición (37). Los sujetos sensibilizados estos alérgenos son menos tolerantes a la IT a las dosis recomendadas (36).

- Alergia respiratoria a ácaros

Los ácaros del polvo se encuentran en elevadas concentraciones en todas las zonas costeras y húmedas, que es donde se concentra la mayor parte de la población mundial. Se estima que entre 65 a 130 millones de personas sufren alergia por ácaros. Esta alergia respiratoria clínicamente se manifiesta como rinitis alérgica o eczema atópico, pudiendo inducir respuesta asmática en algunos pacientes. El 50% de los pacientes asmáticos se encuentran sensibilizados a ácaros (38). Se trata de un tipo de alergia perenne, estando el ácaro presente durante todo el año.

Los ácaros del polvo pertenecen a la familia *Pyroglyphidae*, la cual consiste en 17 géneros y 47 especies. En Europa, las especies de ácaros más comunes son *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* y *Euroglyphus maynei*, siendo el más importante y abundante en los hogares *Dermatophagoides pteronyssinus*. Sin embargo, su distribución varía, *D. farinae* puede ser comúnmente encontrado en zonas más secas; sin embargo, en áreas tropicales y subtropicales, el ácaro de almacén *Blomia tropicalis* que coexiste con *D. pteronyssinus*, es una importante fuente de alérgeno. *Glycyphagus* y *Leipidoglyphus* son ácaros hallados en entornos rurales (39).

Los alérgenos más importantes de ácaros son Der p1, una cisteinoproteasa (40) y Der p2 una proteína similar a las proteínas de la familia Niemann-Pick C (41). Ambas se encuentran en el aparato digestivo y heces de los ácaros de la especie *D. pteronyssinus*, siendo más prevalente la sensibilización a Der p2 (42) que aparece en un 80% de los pacientes (41). Los alérgenos de los ácaros presentan una elevada reactividad cruzada entre especies, p.j. Der p2 con Der f 2 procedente de *Dermatophagoides farinae*. Además, los ácaros tienen la peculiaridad de poseer entre sus principales alérgenos proteínas con actividad enzimática capaces de estimular directamente la respuesta inflamatoria alérgica por interacción con las barreras epiteliales respiratorias a través de mecanismos de señalización específicos. La interleucina 33, juega un papel clave en este proceso (40,43). Recientemente se ha descrito que la actividad proteolítica de Der p 1, y el daño inducido en la barrera epitelial, está directamente relacionado con los niveles de glutatión *s*-transferasa y con la integridad de ésta en el momento de la exposición (44,45). El estado inflamatorio previo a la exposición y la integridad de la barrera epitelial, son, por tanto, clave para predecir la evolución del paciente alérgico.

2. Enfermedad Celiaca

2.1. Definición, prevalencia y clínica de la enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad sistémica autoinmune crónica caracterizada por una enteropatía desencadenada por la ingesta de gluten. Esta enfermedad afecta a personas genéticamente predispuestas, independientemente del sexo del individuo y puede desarrollarse a cualquier edad. El gluten y sus principales fracciones proteicas, gliadina y glutenina, están presentes en trigo, centeno, cebada, avena, especies relacionadas e híbridos, y alimentos procesados (46).

Hasta hace unas décadas, se consideraba que la EC era una enfermedad poco común que afectaba principalmente a niños. Actualmente, se sabe que este trastorno puede detectarse a cualquier edad y es considerada una de las enfermedades crónicas más comunes con una prevalencia de 1-2% (47). La edad media de diagnóstico en adultos es de 45 años, aunque hasta el 20% de los pacientes son diagnosticados a los 60 años o más tarde (48).

La EC se caracteriza por la aparición de atrofia vellositaria en el intestino delgado, lo que provoca un síndrome de malabsorción de nutrientes (46). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca varían tremendamente entre pacientes. El hecho de que muchos de los síntomas resulten de la malabsorción intestinal hace que no sean específicos de enfermedad celiaca y sean similares a los de otros tipos de desórdenes malabsorptivos. Algunos adultos presentan síntomas intestinales como diarrea, dolor abdominal, dispepsia o pérdida de peso; sin embargo, frecuentemente son los múltiples síntomas extraintestinales los responsables del diagnóstico de la enfermedad. Entre estos síntomas, aparecen trastornos hematológicos (anemia y déficit de hierro), bioquímicos (niveles elevados de aminotransferasa), esqueléticos (osteoporosis), entre otros (49).

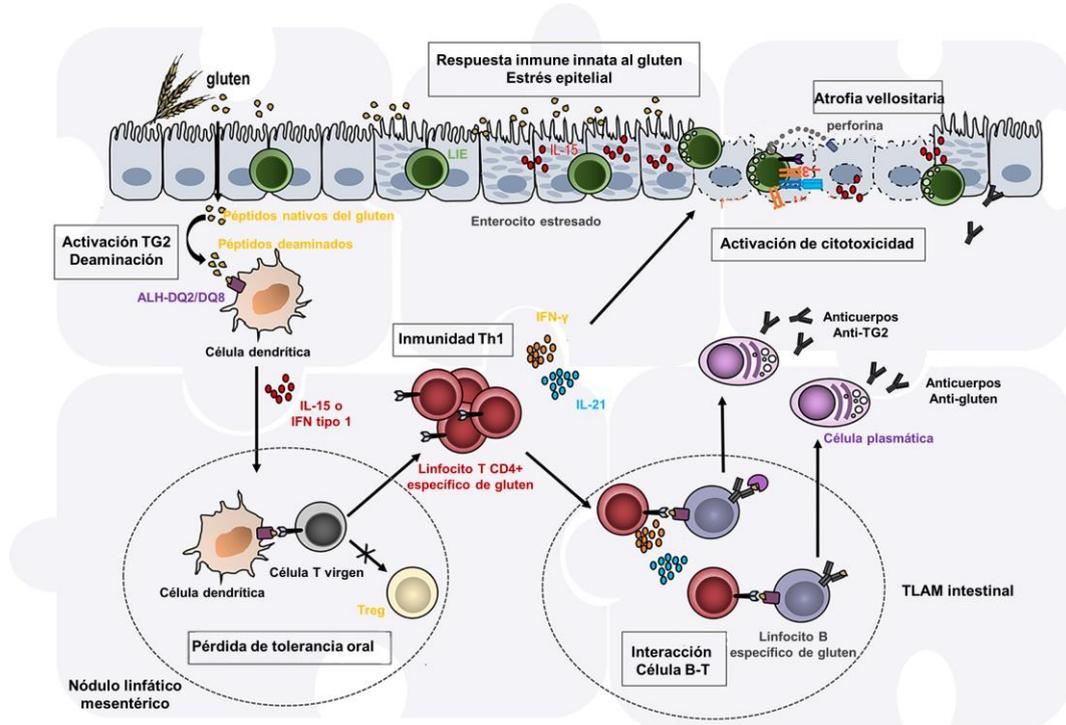


Figura 4. Destrucción del tejido intestinal en la enfermedad celiaca. Los péptidos deaminados por la transglutaminasa (TG) 2 se unen al antígeno leucocitario humano (ALH) DQ2 en las células presentadoras de antígeno (CPAs). En un contexto inflamatorio (presencia de interleucina (IL) 15 e interferón (IFN) tipo 1), las células dendríticas (CDs) adquieren un fenotipo proinflamatorio y migran a los nódulos linfáticos mesentéricos para presentar los péptidos del gluten a los linfocitos T vírgenes. Esta presentación lleva a la diferenciación de los linfocitos hacia T colaborador (Th) 1 mientras que se interrumpe la inducción de los linfocitos T reguladores (Treg) perdiendo la tolerancia oral al gluten. Los linfocitos Th 1 secretan IFN- γ o IL-21, mientras que los linfocitos foliculares presentan en los órganos linfoides secundarios de la mucosa intestinal los péptidos a los linfocitos B que acaban produciendo inmunoglobulina (Ig) A e IgG anti-TG2 y anti-gluten. Paralelamente, la presencia de IL-15 en altas concentraciones en el epitelio hace que los linfocitos intraepiteliales (LIEs) adquieran un fenotipo citotóxico y sean capaces de reconocer los enterocitos estresados. Todos estos eventos son necesarios para producir enfermedad, pero no suficientes por sí solos. TLAM: tejido linfoide asociado a mucosa. Traducida y adaptada de: Voisine y Abadie (51)

2.2. Etiopatogenia inmunológica de la enfermedad celiaca

Los péptidos derivados del gluten son modificados por la transglutaminasa (TG) 2 y presentados mediante el antígeno leucocitario humano (ALH) ALH-DQ2 y ALH-DQ8 en las membranas de las CPAs a las células CD4+. Esta presentación que sucede en los nódulos linfáticos mesentéricos induce una respuesta Th1 que cursa con la producción de

interferón- γ (IFN γ) e inflamación intestinal. La inflamación crónica induce la expansión y mantenimiento de linfocitos T $\gamma\delta$ que asimismo contribuyen a la producción de más IFN γ (50,51). Al mismo tiempo, se genera una respuesta de autoanticuerpos específicos para la TG2 (52), que son producidos principalmente por células plasmáticas localizadas en la lámina propia (53).

Sin embargo, la respuesta adaptativa frente al gluten y la TG2 no explican la lesión intestinal caracterizada por la destrucción de las células del epitelio y el remodelado tisular. Esta citotoxicidad es mediada por la expresión de IL-15 y de moléculas asociadas al estrés en los enterocitos en contacto con los péptidos del gluten. La expresión mantenida de IL-15 induce un fenotipo similar al de los linfocitos asesinos naturales (AN) en los linfocitos CD8+ del compartimento epitelial (activación de receptores AN). Los receptores AN son capaces de reconocer las moléculas de estrés epitelial (ALH-E y genes relacionados con cadenas de MHC I (CMI) CMIA/B) induciendo en los linfocitos T CD8+ la liberación de mediadores citotóxicos como la perforina o la granzima B, que destruyen los enterocitos (50,51) (**Figura 4**).

2.3. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celiaca

- Diagnóstico de la EC

La historia clínica es la piedra angular para establecer la sospecha de enfermedad celiaca y, por lo tanto, su diagnóstico, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad. En la edad adulta, los síntomas más frecuentes son poco específicos: dispepsia, dolor abdominal crónico, pérdida de peso sin causa aparente, aftas bucales recidivantes, ferropenia con o sin anemia, déficit de vitamina B12 o de ácido fólico, y la hipertransaminasemia de origen no aclarado, entre otros (54,55).

El diagnóstico diferencial se establece en presencia de una serología positiva para anticuerpos anti-transglutaminasa IgA que presenta una elevada sensibilidad próxima al 98%. La clínica y la serología positiva junto

con una determinación HLA DQ2 /DQ8 positiva son signos diagnósticos para la enfermedad. Sin embargo, en adultos todos los consensos exigen la realización de una biopsia intestinal como prueba definitiva, pudiendo presentar ésta, lesiones que van desde un aumento de los linfocitos intraepiteliales a una atrofia vellositaria grave (56,57). Los cambios en la mucosa intestinal de los pacientes sensibles al gluten se estratifican según la clasificación Marsh que se basa en: a) la presencia de infiltrado linfocitario en el compartimento epitelial, linfocitos intraepiteliales (LIEs), b) la hiperplasia de las criptas intestinales y c) la medida de la atrofia vellositaria (55,58,59) (**Figura 5 y Tabla 1**).

El 10-12% de casos dudosos constituye en la actualidad un reto para médicos clínicos e investigadores. Para confirmar o descartar el diagnóstico de EC en esta situación, se proponen distintas alternativas como la realización de una dieta exenta de gluten y valoración de la evolución de las lesiones en una nueva biopsia, la determinación por citometría de flujo de los subtipos de linfocitos intraepiteliales en la biopsia intestinal, la valoración de niveles de anticuerpos antitransglutamina IgG en paciente con déficit de IgA o la determinación de Anti -DGP tipo IgG (60,61).

Algunas de estas pruebas diagnósticas no están disponibles en la práctica clínica habitual o suponen importantes molestias para el paciente. Por lo tanto, sería necesario el uso de nuevas técnicas poco agresivas que ayudaran a esclarecer el diagnóstico en este porcentaje de casos difíciles o dudosos.

- Tratamiento de la EC

El único tratamiento disponible para la EC es una dieta libre de gluten (*GFD- Gluten Free Diet*) de por vida, lo que garantiza la recuperación clínica e histológica en la mayoría de los pacientes (46).

Tabla 1. Clasificación histológica Marsh.

	Marsh 0	Marsh I	Marsh II	Marsh IIIa	Marsh IIIb	Marsh IIIc
LIE (por 100 enterocitos)	<30	≥30	≥30	≥30	≥30	≥30
Criptas	Normal	Normal	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia
Vellosidades	Normal	Normal	Normal	Atrofia +	Atrofia ++	Sin vellosidades
Designación Histológica	Mucosa normal	Mucosa normal	Criptas agrandadas	Atrofia parcial (ratio cripta/vellosidad < 1:1)	Atrofia subtotal (vellosidades atrofiadas pero reconocibles)	Atrofia total (vellosidades rudimentarias o ausentes)

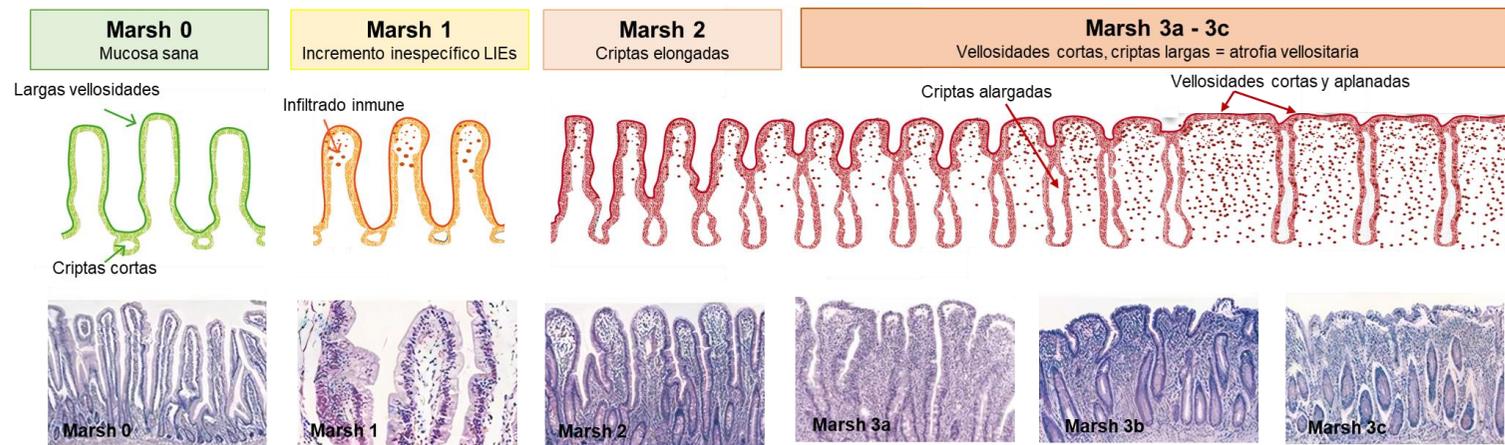


Figura 5. Clasificación histológica Marsh. a) Representaciones gráficas de la mucosa oral en los distintos estratos de la clasificación. b) Imágenes de hematoxilina-eosina representativas de biopsia duodenal en cada uno de los estratos de la clasificación. LIE: linfocito intraepitelial. Fuentes. Representación gráfica: traducida de FocusINCD, imágenes: Wahab et al (58). Tabla adaptada de Parzanese et al. (59).

3. Estructura e integridad de la mucosa oral

3.1. Organización general de la mucosa oral

Se define como mucosa oral a la membrana húmeda que recubre el interior de la cavidad bucal y que se extiende desde la parte interna de los labios hasta la mucosa que recubre la bucofaringe. Esta mucosa recubre superficialmente el vestíbulo de la boca, incluyendo la cara interna de los labios y de las mejillas, además de la cavidad bucal propiamente dicha, que incluye lateralmente las arcadas gingivodentarias, dorsalmente el paladar, y ventralmente la lengua y el piso de la boca (62).

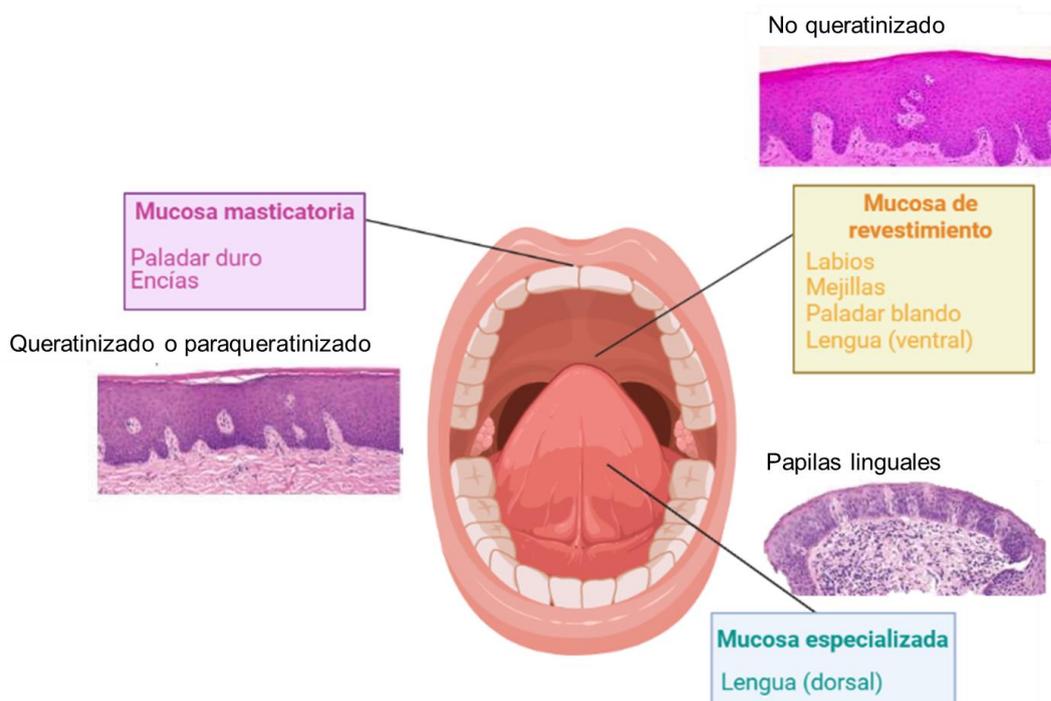


Figura 6. Organización general de la mucosa oral. La mucosa oral varía en función de su localización dentro de la cavidad oral pudiendo ser organizada en tres grupos según su morfología y el patrón específico de diferenciación de los tejidos que la componen: 1) mucosa de revestimiento, correspondiente a labios, mejillas, paladar blando y la parte ventral de la lengua, 2) mucosa masticatoria, correspondiente al paladar duro y las encías y 3) mucosa especializada, presente en la parte dorsal de la lengua.

A nivel histológico, la mucosa oral en general está constituida por tres capas de tejido, que son de superficie a profundidad: 1) Epitelio plano

poliestratificado, 2) lamina propia de tejido conjuntivo laxo, y 3) tejido de sostén submucoso (63). Sin embargo, la mucosa oral varía en función de su localización dentro de la cavidad oral. Se reconocen 3 tipos de mucosa en la cavidad oral que difieren en su morfología y el patrón específico de diferenciación de los tejidos que la componen: 1) mucosa de revestimiento, correspondiente a labios, mejillas, paladar blando y la parte ventral de la lengua, 2) mucosa masticatoria, correspondiente al paladar duro y las encías y 3) mucosa especializada, presente en la parte dorsal de la lengua (64) (**Figura 6**).

3.2. Histología de la mucosa oral de revestimiento

La mucosa oral de revestimiento está presente en labios, mejillas, paladar blando y la parte ventral de la lengua, constituyendo un 60% del total de la mucosa oral. Histológicamente se caracteriza por un epitelio estratificado plano no queratinizado, una lámina propia fina de tejido conjuntivo laxo con abundantes fibras elásticas, y una capa submucosa de tejido conjuntivo denso con presencia de glándulas salivares menores (62,65). En el caso de la mejilla y la lengua aparecen fascículos musculares en la zona profunda correspondientes al músculo buccinador o los músculos linguales respectivamente (63).

El tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas dérmicas. A su vez el epitelio se proyecta hacia la lámina propia en forma de evaginaciones que se interdigitan con las papilas dérmicas y reciben el nombre de crestas epidérmicas. Esta disposición estructural en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio de la mucosa oral al permitir una mayor proximidad entre el tejido conjuntivo vascular y el tejido epitelial avascular (66).

En el epitelio de la mucosa oral podemos encontrar diferentes poblaciones celulares. Las células intrínsecas o queratinocitos constituyen la población celular más abundante del tejido epitelial formando la capa basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso, y por último el estrato

superficial. Las células extrínsecas permanentes: los melanocitos se encargan de producir melanina para proteger de la radiación ultravioleta, las células de Merkel funcionan como elemento sensitivo, y las células de Langerhans forman parte del sistema de defensa. Por último, pueden aparecer células extrínsecas transitorias, tales como: mastocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos, cuya proporción es variable y se modifica en función de la presencia de procesos inflamatorios (66).

La membrana basal o lámina basal es una fina capa compuesta de colágeno y laminina situada entre el epitelio y la lámina propia. Se observa como una banda no estructurada que incluye glucógeno, mucosustancias, glicolípidos y fosfolípidos (67).

La lamina propia consiste en una red de fibras agrupadas y una matriz compuesta por agua, glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas séricas. Además, contiene una amplia variedad de células, capilares sanguíneos, y elementos nerviosos (67,68). Los fibroblastos son el principal elemento de la lámina propia cuya función principal es el mantenimiento del tejido mediante la secreción de fibras y matriz (67,68).

En la submucosa, aparecen grandes vasos, nervios, tejido adiposo intercalado, además de glándulas salivales menores, bucales y retromolares. Asimismo, pueden aparecer glándulas sebáceas aisladas denominadas cuerpos de Fordyce (63).

3.3. Uniones intercelulares en el epitelio

La integridad de la barrera epitelial es un factor clave para evitar la presentación antigénica descontrolada. La integridad del epitelio oral se mantiene mediante específicos complejos de unión entre las células epiteliales. Existen 3 tipos de complejos: 1) uniones estrechas, 2) uniones tipo gap, y 3) uniones de anclaje (69,70) (**Figura 7**).

Las uniones estrechas forman el tipo más cercano de unión entre células y suelen localizarse en la zona apical del epitelio oral, ejerciendo

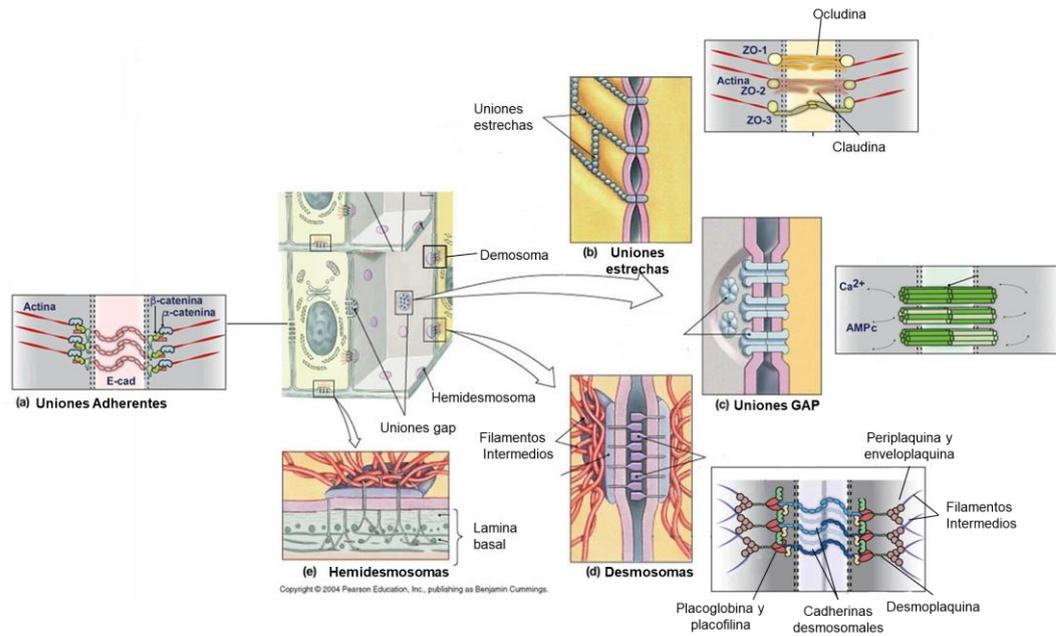


Figura 7. Uniones intercelulares epiteliales principales y sus componentes principales. a) Las uniones adherentes anclan el citoesqueleto de actina de una célula con la adyacente mediada por interacciones homófilicas entre las cadherinas clásicas (e-cad). b) En las uniones estrechas las claudinas y ocludinas forman una barrera paracelular donde las proteínas *zónula occludens* (ZO) fortalecen la unión desde el interior citoplasmático. c) Las uniones tipo gap están construidas por hexámeros de proteínas que forman un canal que permite el flujo de iones, moléculas pequeñas y proteínas entre las células. d) Los desmosomas de manera similar a las uniones adherentes la adhesión esta mediada por las cadherinas desmosomales que se asocian con proteínas “armadillo” como la placoglobina o la placofilina, para posteriormente anclarse a los filamentos intermedios mediante las plaquinas desmoplaquina, periplaquina y la evoplaquina. e) Los hemisomosomas anclan la célula a la lámina basal a través de los filamentos intermedios. AMPc: Adenosín monofosfato cíclico. Traducida y adaptada de Pearson Education, Inc y Sieben et al, 2019 (76).

una función de barrera frente al paso de agua, electrolitos y otras moléculas de pequeño tamaño. Consisten en un número de moléculas transmembrana incluyendo ocludina, claudina y proteínas de superficie con dominio parecido a inmunoglobulina, además de proteínas citoplasmáticas como la *zonula occludens* (ZO) (69,71). Las uniones gap están formadas por hemicanales denominados conexones que están regulados por distintos factores: el pH, los niveles de Ca^{2+} y modificaciones traslacionales. Estas uniones permiten establecer una comunicación directa entre dos células adherentes además del intercambio de moléculas e iones.

Las uniones de anclaje, a su vez, se pueden dividir en 3 grupos: uniones adherentes, desmosomas, y hemidesmosomas (72). Las uniones adherentes son complejos proteicos situados por debajo de las uniones estrechas que mantienen firmemente unidas las células y están formadas por moléculas cadherina como la E-cadherina, que se unen al citoesqueleto de actina mediante las cateninas. Los desmosomas unen dos células mediante los filamentos intermedios del citoesquelético siendo muy importantes en la resistencia al estrés mecánico del tejido. Estas uniones entre elementos del citoesqueleto para formar los desmosomas se llevan a cabo mediante las proteínas de la familia de las plaquinas, proteína dentro de la cual se incluye la periplaquina (PPL), expresada constitutivamente en la mucosa oral (73–76). Además, los desmosomas actúan como receptores celulares de superficie durante los procesos de proliferación y diferenciación celular. La adhesión entre el epitelio y el tejido conectivo es llevada a cabo por los hemidesmosomas, los cuales unen los filamentos intermedios de las células epiteliales a la lámina basal (69,72).

3.4. Sistema inmune asociado a la mucosa oral

La mucosa oral es un órgano inmunocompetente cuya función principal es tolerogénica (77–80). A parte de los mecanismos de integridad de las células epiteliales que ejercen una importante función como barrera física, la protección y homeostasis de la mucosa oral dependerá de otros 3 componentes: las células inmunológicas y sus productos, la microbiota comensal y la saliva (81).

La respuesta inmunitaria de la mucosa oral se encuentra mediada por la interacción entre el tejido residente y las células migratorias. En esta mucosa existe una gran variedad de células inmunes, siendo la mayoría de origen linfoide, y algunas de origen mieloide (**Figura 8**) (81).

Las células dendríticas y los linfocitos T producen varios tipos de citoquinas tanto pro-inflamatorias (FNT- α , IL-6, IL-12, IL-17 e IFN- γ) como anti-inflamatorias (IL-10 y factor de crecimiento tumoral β (FCT- β)), lo que

da lugar a un perfil de respuesta polifuncional especializado caracterizado por altos niveles de IL-17 (82,83).

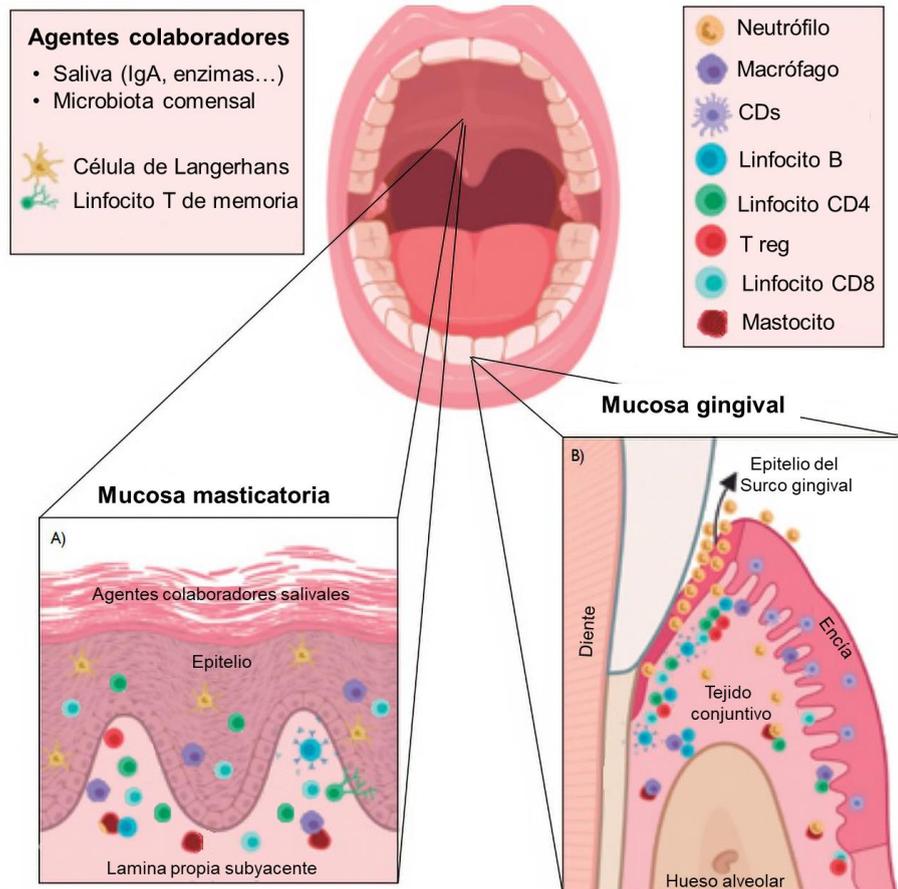


Figura 8. Red de componentes inmunológicos de la mucosa oral. La distribución de las células inmunitarias en las distintas partes de la mucosa oral es diferente. a) Mucosa masticatoria: el epitelio exterior de la mucosa de revestimiento presenta macrófagos y células de Langerhans genuinas, los linfocitos se encuentran en la lámina propia agrupados en la membrana basal apareciendo algunos intraepiteliales. Los linfocitos pueden ser innatos e invariantes (CLI, $T\gamma\delta$), efectores (Treg, Th, T citotóxico, linfocitos B) o de memoria. b) Mucosa gingival: similar pero con abundantes neutrófilos circulantes en el fluido crevicular gingival y mayor cantidad de linfocitos B. CD: célula dendrítica, Treg: linfocito T regulador, CLI: Célula Linfoide Innata, Th: T colaborador, $T\gamma\delta$: Linfocitos T invariante de cadenas pesadas γ y δ , Ig: inmunoglobulina. Figura adaptada de Ballón-Salcedo et al (81).

- Inmunidad innata de la mucosa oral

La secreción salival es un fluido biológico isotónico – hipotónico compuesto por un 99% de agua y una variedad de electrolitos, pero, además, contiene inmunoglobulinas, enzimas, proteínas, pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) reguladores no codificantes, péptidos antimicrobianos y productos nitrogenados que contribuyen a su función protectora (84). Una disminución de la secreción salival implicará una mayor susceptibilidad a enfermedad (77,81).

Además de la saliva, las células inmunes innatas juegan un papel fundamental en la respuesta inmune de barrera. Dentro del compartimento mielóide, encontramos en orden de abundancia: células dendríticas mieloides, macrófagos, y neutrófilos (85).

En el epitelio de la mucosa oral, las células de Langerhans (Ln+ CD1a+) representan el tipo dominante de CPA (86). Estas CPAs expresan de forma constitutiva FcεRI y presentan niveles aumentados de moléculas co-inhibitorias (B7-H1 y B7-H3), y un descenso en la molécula co-estimuladora CD86. Las células orales de Langerhans pueden inducir células T reguladoras y secretar IL-10 y FcTβ lo que explica su papel como células tolerogénicas (86).

En la lámina propia, las células dendríticas intersticiales CD11c+ CD11b+ representan la mayor población de células dendríticas. Estas células parecen ser las principales relacionadas con la activación de los linfocitos CD8+ y CD4+ en los nódulos linfáticos asociados a la cavidad oral (87).

Los neutrófilos menos abundantes en la mucosa bucal que en la gingival, también se encuentran en el fluido crevicular gingival del epitelio de la hendidura gingival (**Figura 8**) (81,85). Los mastocitos repletos de histamina, heparina y citoquinas se localizan cerca de la membrana basal de las células endoteliales. Su migración se ve influenciada por la síntesis de factor de crecimiento de mastocitos secretado por las células

endoteliales y los queratinocitos (67,77).

- Inmunidad adaptativa: Quiescencia de la mucosa oral

La respuesta adaptativa de la mucosa oral la componen fundamentalmente los linfocitos. Dentro del conjunto linfoide, se encuentran por orden de abundancia: los linfocitos CD4+, linfocitos Th17, linfocitos T invariantes asociados a mucosa, linfocitos CD8+, linfocitos $\gamma\delta$, linfocitos Treg y linfocitos AN.

Los linfocitos CD4+ Th17 tienen un papel crítico en la protección frente a patógenos en la barrera oral. Esta importancia es evidente en pacientes con defectos genéticos en la diferenciación y función de las células Th17, ya que se presentan infecciones fúngicas orales graves y recurrentes. Sin embargo, la respuesta Th17 exagerada es perjudicial, ya que promueve la pérdida ósea inflamatoria y el daño tisular en la enfermedad periodontal (EP); por ello es necesario el equilibrio Th17/Treg para controlar la homeostasis del tejido (81,88).

La respuesta adaptativa también ejerce un papel importante en la generación de tolerancia. La mucosa oral presenta una elevada cantidad de linfocitos Foxp3+ Treg con el fin de evitar la respuesta inmune a los antígenos no patogénicos contenidos en los alimentos, el agua y el aire que se ingieren e inhalan constantemente (89). La inflamación de la mucosa oral es rara; sin embargo, el agotamiento agudo de las células Treg resulta en la infiltración masiva de células T efectoras activadas que se asocian con la autoinmunidad y la destrucción tisular de la mucosa oral (89).

Otros tipos celulares observados son pequeñas minorías de células dendríticas plasmacitoides, células B y células plasmáticas, siendo las células B minoritarias en el tejido bucal comparado con el de la encía (**Figura 8**) (85).

4. Alteración de la integridad tisular

La mucosa oral recubre la cavidad oral actuando como una barrera física, y en conjunto con las células inmunes que contiene, es capaz de generar tolerancia a los estímulos inocuos al mismo tiempo que protege de posibles estímulos dañinos (77,90).

Sin embargo, esta integridad puede verse comprometida por numerosos estímulos nocivos, estando su alteración vinculada a infecciones, enfermedades autoinmunes, alergias y cáncer (71,91–97). El tejido epitelial comprometido libera citoquinas proinflamatorias y permite la penetración de estímulos nocivos a la submucosa, estos dos factores favorecen la inflamación y la progresión de la enfermedad (98) (**Figura 9**). Se discuten en este apartado los principales marcadores de daño a la integridad tisular.

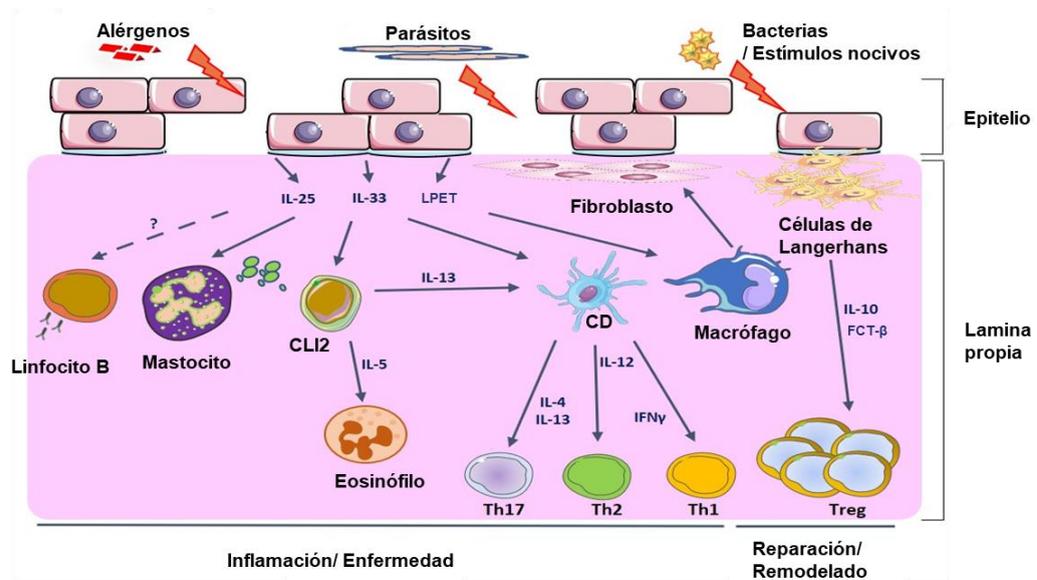


Figura 9. Remodelado oral en respuesta al daño epitelial. La ruptura de la unión epitelial inducida por estímulos como los alérgenos, microbios o sustancias tóxicas activa la secreción de alarminas epiteliales como la IL-25, IL-33 y LPET por parte del epitelio. La presencia de éstas alarminas activa a las células dendríticas (CDs), macrófagos y células linfoides innatas (CLIs) provocando la amplificación de respuestas celulares T, la inflamación y la inducción de mecanismos de remodelado por parte de los fibroblastos. Las células de Langerhans y los linfocitos T reguladores (Treg) participan en la reparación de la herida y el remodelado para aminorar la inflamación. IL: interleucina, Th: T colaborador, FCT- β : factor de crecimiento tumoral β .

4.1. Ruptura de la integridad de las uniones intercelulares epiteliales

La estructura y función de todas las uniones intercelulares descritas anteriormente es fundamental para preservar la integridad de la barrera epitelial. Un ejemplo notable ocurre en la enfermedad celiaca donde la desregulación proteica de las proteínas de unión estrecha del epitelio intestinal altera la homeostasis de la barrera permitiendo el paso no selectivo de microorganismos y proteínas al espacio paracelular. La incapacidad para reparar las uniones estrechas es crucial ya que puede derivar en sepsis o fallo orgánico múltiple (99).

En asma y rinitis alérgica el daño en la barrera respiratoria está asociada con defectos en las uniones estrechas y una reducción en las uniones adherentes y desmosomas. El aumento de la permeabilidad epitelial se ha relacionado con la gravedad del asma, mientras que en las vías respiratorias de pacientes con rinitis alérgica se han encontrado niveles disminuidos de ocludina y proteína *zonula occludens* (100). Se ha llegado incluso a desarrollar una hipótesis de “regulación de barreras” (101) la cual postula que la sensibilización alérgica se inicia con un daño en la barrera epitelial (98,102). Aquellos pacientes con alergia alimentaria tienen la permeabilidad de la barrera aumentada (103–105), siendo la propia afección de la barrera capaz de predisponer a la atopia (106).

Por todo esto, la disminución en la expresión de estas proteínas en el epitelio oral será indicativo de daño en el epitelio y, además pondrá de manifiesto la alteración de la integridad del tejido (69,107).

4.2. Citoquinas epiteliales asociadas a la alteración de la integridad tisular

Aunque en un principio se pensaba que las células epiteliales de la mucosa eran únicamente barreras físicas inertes, actualmente, se entiende que forman un papel clave en el sistema inmune protector (79,97,108,109). Las células epiteliales son capaces de reaccionar a estímulos externos

mediante la producción de moléculas de adhesión, factores de crecimiento, quimioquinas, y metaloproteasas de matriz (MPM) (69). Al mismo tiempo, muchos mediadores inflamatorios como el interferón (IFN) y el factor de necrosis tumoral (FNT) son capaces de desorganizar la integridad epitelial mediante descenso de la expresión de proteínas de uniones estrechas, aumentando la permeabilidad epitelial (110–115).

Existen 22 citoquinas derivadas del epitelio capaces de iniciar una respuesta inmunitaria celular Th2, entre ellas, la linfopoyetina estromal tímica (LPET), la IL-25 y la IL-33 (116). Al producirse un daño, algunos factores, como el Factor Activador de Plaquetas (FAP), son capaces de inducir la liberación de alarminas en las células epiteliales (117). Las alarminas liberadas actúan como señal de remodelado epitelial e inducen el reclutamiento de células T promoviendo una respuesta inflamatoria (98) (**Figura 9**). Para alcanzar la homeostasis, la respuesta generada por la IL-33 puede promover el reclutamiento de células Treg (118), las cuales contribuirán a los procesos de reparación del daño. Estas Treg expresan factores reparadores como la anfirregulina y el factor de crecimiento de queratinocitos (119). Por tanto, la presencia aumentada de estas citoquinas aparece asociada al daño epitelial.

De la misma forma, ante un estímulo dañino, los capilares de la lámina propia expresan moléculas de adhesión, las cuales facilitan el tráfico de leucocitos desde la sangre (67,69,77).

4.3. Fibrosis y angiogénesis

- Fibrosis

La fibrosis es una condición patológica asociada a enfermedad inflamatoria crónica. Como respuesta a un estímulo externo dañino crónico, se produce una excesiva deposición de matriz extracelular que es capaz de afectar la arquitectura y función de un tejido. Este proceso de deposición de fibras se denomina fibrogénesis y esta mediado por la liberación de moléculas biológicamente activas (citoquinas, alarminas y quimioquinas)

las cuales inducen la diferenciación y activación de miofibroblastos. Los miofibroblastos son las células especializadas capaces de producir la alta cantidad de colágeno tipo I característica de la fibrosis (120,121).

Aunque se manifiesta en múltiples enfermedades (122), la fibrosis es un marcador de lesión en asma, donde se puede observar un importante remodelado de la mucosa bronquial con alteración de la integridad de epitelio alveolar acompañada de fibrosis subepitelial en la membrana basal (123,124). A pesar de que se desconoce la etiología exacta de este proceso, se estima que el FCT-b juega un papel muy importante como inductor de síntesis de matriz celular. De hecho, las terapias anti-FCT-b han resultado útiles en la reducción de fibrosis (125,126). En este mismo contexto, la fibrosis ha sido descrita asociada a remodelado epitelial también en rinosinusitis crónica y alergia (127,128).

- Angiogénesis

Durante los procesos de reparación de daño se liberan factores que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. A este proceso se le denomina angiogénesis. En los tejidos inflamados, el remodelado vascular expande los capilares y aumenta el flujo sanguíneo contribuyendo a la fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad (129). Uno de los factores pro-angiogénicos más importantes es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (FCEV) cuya cantidad influirá de manera notable en el curso de la reparación del daño (130).

La inflamación crónica inducida por alergia o asma produce un aumento de angiogénesis en las vías aéreas (17). Además, se ha demostrado una correlación entre el aumento de vasos sanguíneos y de células endoteliales, y la rinitis alérgica (131).

En los pacientes con EC se ha observado que la vasculatura de las mucosas se encuentra desorganizada, y es que aparecen en esta enfermedad determinadas proteínas como los anticuerpos anti-TG2 que

son capaces de interrumpir la angiogénesis al afectar múltiples etapas del proceso angiogénico (132,133).

4.4. Fisiopatología de la mucosa oral en enfermedades sistémicas

La asociación clínica entre enfermedad sistémica y manifestaciones orales ha sido profundamente investigada (134–137). El interés por la conexión entre mucosa oral y la salud a nivel general no sólo se manifiesta en los estudios epidemiológicos, sino también en el papel potencial de la mucosa oral y la saliva para el diagnóstico de enfermedades sistémicas (138,139).

Existe una amplia variedad de enfermedades sistémicas que tienen un efecto sobre la mucosa oral incluyendo: infecciones virales, dermatosis, desórdenes hematológicos, enfermedades endocrinas, alteraciones gastrointestinales, malignidad, y enfermedades autoinmunes entre otras (135,140–144). Las formas más típicas de manifestación de enfermedad sistémica en la cavidad oral son las úlceras, parches blancos, hinchazón, cambios en la pigmentación o inflamación periodontal (134,142,145,146). Aunque la asociación entre enfermedad sistémica y daño en la mucosa oral es obvia, el conocimiento de si las alteraciones son únicamente una manifestación clínica más, o si realmente contribuyen al desarrollo de la enfermedad no ha sido establecido para muchas enfermedades (144,147–149). Como la cavidad oral es un lugar de fácil acceso diagnóstico, sus alteraciones pueden ser la primera indicación de que se está padeciendo una enfermedad sistémica, lo que permite un diagnóstico temprano (135,150,151).

5. Antecedentes al presente estudio.

5.1. Alteraciones en la cavidad oral en enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca se considera principalmente una enfermedad gastrointestinal, pero, como se ha mencionado anteriormente, existe un

importante abanico de efectos extraintestinales (152). En la cavidad oral, se han descrito múltiples afecciones que abarcan tanto la mucosa oral, gingival, lingual, palatina o los dientes y el esmalte (153–155). Entre las manifestaciones más comunes se encuentran: la estomatitis aftosa recurrente (154,155), defectos en el esmalte de los dientes, caries, lengua geográfica, glositis atrófica y boca seca (54). Algunas de estas manifestaciones pueden llegar a ser clave en el diagnóstico de formas atípicas de la enfermedad(156–158), mejorando su clínica tras la aplicación de dieta sin gluten (DSG) (159).

Aunque la fisiopatología de la EC ha sido muy estudiada en el intestino delgado, y las manifestaciones clínicas en la mucosa oral son conocidas, el conocimiento de los procesos inmunológicos que se desarrollan a nivel histológico en la mucosa oral de los pacientes celíacos es escaso (160). En cuanto al compartimento linfocitario, se han llevado a cabo estudios con resultados no consensuados (155). En cuanto a las CPAs, la información sobre las células dendríticas del tejido epitelial oral es escasa y no se encuentra bibliografía en pacientes celíacos.

En la presente tesis, se pretende ampliar los datos obtenidos previamente, analizando el posible patrón de remodelado del epitelio oral en pacientes celíacos con enfermedad activa y pacientes en DSG. Este estudio podría facilitar el conocimiento de los procesos inmunológicos que ocurren en la mucosa oral de los pacientes celíacos y que llevan a la aparición de las manifestaciones clínicas observadas, además de contribuir a entender si la mucosa oral puede ser una potencial fuente de información para el diagnóstico de la enfermedad.

5.2. Alteraciones en la cavidad oral en alergia respiratoria a polen de gramíneas asociada a alergia alimentaria a profilina

La sensibilización a alérgenos del polen que presentan elevada reactividad cruzada con otras moléculas de alimentos vegetales hace que

se den patologías alimentarias ligadas a aeroalérgenos. Cuando estos pacientes alérgicos residen en zonas de alta exposición a pólenes, el fenotipo observado para la alergia a alimentaria es frecuentemente grave (161). La incidencia de estas patologías parece ir en aumento, por lo que entender los mecanismos subyacentes es clave para diseñar estrategias de prevención (162).

La profilina es un alérgeno polínico que normalmente tiene un papel limitado como alérgeno alimentario ya que es fácilmente degradado por las proteasas digestivas y el medio ácido del estómago. Sin embargo, este alérgeno es capaz de inducir hipersensibilidad en individuos alérgicos al polen de gramíneas cuando éstos residen en áreas de alta exposición alérgica. En estos pacientes, la mucosa oral parece tener un papel relevante, ya que, se encuentra alterada, siendo esta alteración más grave cuanto más grave es la clínica de la enfermedad (30,163–167).

En el estudio de Rosace et al. (128), un grupo de pacientes alérgicos al polen de gramíneas y residentes en áreas de alta exposición fueron sometidos a provocación oral con extracto de profilina y clasificados como alérgicos moderados o graves según su respuesta clínica. Las reacciones observadas tras la provocación incluyeron desde reacciones locales, como el síndrome de alergia oral (SAO), angioedema, y prurito oral, hasta reacciones sistémicas graves como urticaria y asma. Al analizar la mucosa oral de los pacientes alérgicos a profilina, se observó en los pacientes graves un remodelado de la mucosa oral progresivo caracterizado por: 1) un descenso de la expresión de proteínas de uniones estrechas (occludina) y uniones adherentes (E-cadherina), 2) un aumento en la angiogénesis y acantosis del tejido, 3) un aumento de la deposición de fibras de colágeno en la lámina propia, 4) presencia de respuesta inflamatoria en la mucosa con un aumento en los números de células CD11c+ y CD4+ (**Figura 10**), y 5) un incremento en la expresión de los genes para las alarminas de remodelado periostina e IL-33. Todos estos procesos son comparables a los observados en otras patologías inflamatorias que presentan remodelado (168,169). Además, en estos pacientes se demostró que los

daños en el epitelio se correlacionaban con una mayor sensibilidad periférica a profilina de los basófilos.

Como las profilinas están presentes en todos los vegetales, la exposición continua contribuiría a mantener la respuesta alérgica inflamatoria en el tejido, induciendo así reacciones alérgicas a los alimentos (161). Esto sugiere que el remodelado del epitelio oral podría ser el proceso clave en la adquisición de un fenotipo de alergia grave en pacientes con alergia alimentaria mediada por profilinas.

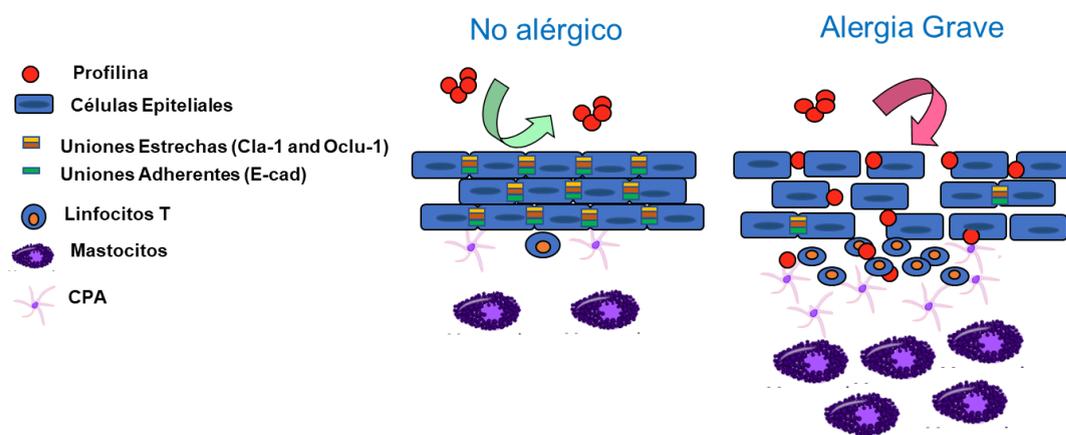


Figura 10. Contribución del remodelado epitelial de la mucosa oral en las reacciones alérgicas alimentarias a profilina. Los pacientes con alergia grave a profilina presentan un daño significativo en la barrera epitelial oral lo que puede permitir la penetración de la profilina en la mucosa oral y la inducción de inflamación local con aumento de linfocitos T y células presentadoras de antígeno. Cla: claudina, oclu: ocludina, cad: cadherina. Traducido de Rosace et al (128).

5.3. Alteraciones en la cavidad oral en alergia respiratoria sin alergia alimentaria

Si la inflamación alérgica respiratoria asociada a alergia alimentaria es capaz de inducir un remodelado de la mucosa oral, este remodelado puede ocurrir en otros tipos de alergia respiratoria.

En la presente tesis, se pretende ampliar los datos obtenidos previamente en pacientes alérgicos a gramíneas, analizando el patrón de remodelado del epitelio oral en pacientes con patología alérgica respiratoria

grave causada por polen de olivo (31) y por ácaros (170). El objetivo es analizar si dichos pacientes, que no presentan una alergia concomitante a alimentos, presentan remodelado del epitelio. El posible remodelado podría ser indicador de daño sistémico de barreras y jugar un papel clave para entender la evolución alérgica del paciente, siendo importante tanto para entender la evolución a perfiles polisensibilizados como para comprender los mecanismos de la ITSL en enfermedad alérgica (128) y su posible aplicación en otras enfermedades inflamatorias como la celiaquía (en la **Tabla 2** se muestra un resumen con las diferencias clave entre estas dos enfermedades).

Tabla 2. Resumen comparativo de la enfermedad celiaca y la alergia respiratoria.

	Enfermedad Celiaca	Alergia Respiratoria
Prevalencia	~1%	20-30%
Clinica	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas intestinales • Malabsorción de nutrientes 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma • Rinoconjuntivitis
Inmunopatología	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos IgA/IgG • Respuesta citotóxica TH1 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos IgE • Respuesta Th2
Riesgo genético	Sí. ALH-DQ2/DQ8	Sí. Atopia
Tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Dieta Sin Gluten (DSG) 	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar exposición • Sintomático: anti-histamínicos, agonistas β, corticoides • Vacunas (IT e ITSL)
Diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> • Biopsia duodenal • Serología anti-TG2 • Detección ALH-DQ2/DQ8 	<ul style="list-style-type: none"> • Serología IgE • Prueba de Sensibilización Cutánea • Provocación bronquial
Tipo sensibilización	Hipersensibilidad / Autoinmunidad	Hipersensibilidad mediada por IgE
Complicaciones sin tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Déficits nutricionales • Autoinmunidad 	Reacción anafiláctica

ALH: antígeno leucocitario humano, IT: inmunoterapia, ITSL: inmunoterapia sublingual, Ig: inmunoglobulina, TG2: transglutaminasa 2.

Hipótesis

- Alergia

H1: La alergia respiratoria grave compromete la integridad de la mucosa oral sin necesidad de exposición a alérgeno en la mucosa (sin alergia alimentaria) e independientemente del aeroalérgeno involucrado.

H2: Los pacientes con alergia respiratoria grave presentan marcadores sistémicos asociados a daño epitelial.

- Enfermedad celiaca

H1: La exposición a gluten en pacientes con enfermedad celiaca compromete la integridad de la mucosa oral, pudiéndose observar cambios al retirar la exposición a gluten (DSG).

H2: Los pacientes celíacos presentan marcadores sistémicos asociados al daño epitelial.

Objetivos

- Alergia

1. Estudiar el proceso de remodelado de la mucosa oral ligado a alergia respiratoria (sin alergia alimentaria concomitante).
2. Determinar biomarcadores sistémicos asociados al proceso inflamatorio en la mucosa.

- Enfermedad celiaca

1. Estudiar el proceso de remodelado de la mucosa oral en pacientes celíacos.
2. Valorar la evolución de la mucosa oral en un modelo sin exposición a antígeno, tras tratamiento con dieta sin gluten (DSG)
3. Determinar biomarcadores sistémicos asociados al proceso inflamatorio en la mucosa.

Los modelos de enfermedad planteados para el estudio de esta tesis se resumen en la **Figura 11**.

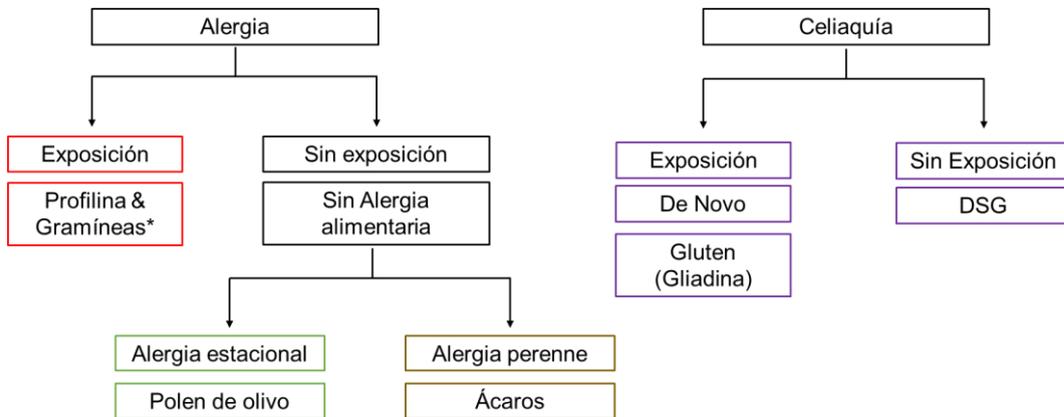


Figura 11. Modelos de enfermedad planteados para el estudio y referidos a la exposición antigénica en la mucosa oral. *Modelo antecedente (Rosace et al., 2019) (128).

Utilidad práctica

Este proyecto se orienta desde un punto de vista traslacional, teniendo en cuenta los problemas que se encuentran los profesionales clínicos en el diagnóstico y tratamiento de la EC y la alergia. Con este abordaje novedoso y multidisciplinar que incluye estudios histológicos y sistémicos se pretende generar el conocimiento científico necesario para determinar la progresión de la EC y de la alergia hacia fenotipos más graves, lo que permitirá una mejor adecuación en el diagnóstico y tratamiento de estas patologías.

Materiales y Métodos

1. Sujetos del estudio

A. ALERGIA RESPIRATORIA

Para los estudios en alergia se reclutaron un total de 123 sujetos: 16 se incluyeron en el estudio de la mucosa oral y 107 en el estudio de citoquinas a nivel sistémico. Los hospitales participantes fueron: Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Ambas poblaciones de pacientes alérgicos se caracterizan por residir en áreas de alta exposición a alérgenos de olivo (Córdoba) y de ácaro (Gran Canaria).

Todos los sujetos fueron entrevistados en el departamento de alergia del hospital correspondiente para establecer su historial clínico, y fueron sometidos a una prueba de punción cutánea para alérgenos de olivo y/o ácaros de acuerdo con el procedimiento estándar (171). En la prueba se incluyeron los siguientes extractos: ácaros (*Dermatofagoides. Pteronyssinus*, *D. Farinae*, *Euroglyphus Maynei*, *Blomia Tropicalis*, *Acarus Siro*, *Tyrophagus Putrescentiae*, *Lepidoglyphus Destructor*) y extracto de *Olea europaea*, además de diluyente (control negativo) e histamina 1:100 como control positivo de la prueba. La manifestación de una pápula con diámetro 3 mm mayor que el del control negativo 15 minutos después de la punción se consideró como resultado positivo. Además, se midieron los niveles de anticuerpos IgE en sangre frente a antígenos de ácaros o aeroalérgenos mediante ImmunoCAP ISAC® (Phadia) de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

Los sujetos sensibilizados a panalérgenos o con un historial clínico de alergia alimentaria fueron excluidos del estudio.

Los pacientes reclutados fueron clasificados en grupos de acuerdo con los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión: estudio de la mucosa oral en alergia respiratoria
- **Pacientes con alergia a olivo** (n=5). Test cutáneo positivo para extracto de olivo y sensibilización al alérgeno minoritario Ole e7 (31).
- **Pacientes con alergia a ácaros** (n=6). Historia de reacción sistémica a la ingesta de harinas contaminadas con ácaros (170).
- **Sujetos control** (n=5). Sujetos no alérgicos con test cutáneo negativo tanto para olivo como para ácaros.

Los datos clínicos de los pacientes se recogen en la **Tabla 4**.

De cada sujeto, se obtuvieron:

- **Una biopsia de mucosa oral**, incluida en paraformaldehído al 4% para análisis histológicos.
- **Veinte mililitros de sangre heparinizada**, empleados en la obtención plasma para determinaciones EILE simple y Multiplex.

Todas las muestras de pacientes alérgicos a ácaros fueron recogidas entre 6 meses y 7 años tras el episodio de anafilaxia. Las muestras de pacientes alérgicos al polen de olivo fueron recogidas fuera de la temporada de polinización.

- Criterios de inclusión: estudio sistémico de alergia respiratoria

La clasificación de los pacientes para el estudios sistémico se realizó siguiendo las pautas de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) 4.0 (172).

- **Pacientes con alergia moderada a olivo** (n = 17). Test cutáneo positivo para extracto de olivo con sintomatología moderada y controlada con medicación. Uso de medicación de alivio no diario (agonista β 2-adrenergico de acción corta) y una o ninguna exacerbación asmática al año.

- **Pacientes con alergia grave a olivo** (n = 19). Test cutáneo positivo para extracto de olivo con sintomatología moderada y no controlada con medicación. Uso diario de medicación de alivio y 2 o más exacerbaciones

asmáticas al año (172).

- o **Pacientes con alergia moderada a ácaros** (n = 17). Test cutáneo positivo para alérgeno de ácaro doméstico con sintomatología controlada mediante el uso de corticoides inhalados. Los pacientes se consideraron controlados únicamente al no haber sufrido ninguna exacerbación asmática durante el año anterior a la inclusión en el estudio.

- o **Pacientes con alergia grave a ácaros** (n = 25). Test cutáneo positivo para alérgeno de ácaro doméstico y asma no controlado tras tratamiento con corticoides, IT o biológicos. Se consideró asma no controlado a aquel que manifestó al menos 5 exacerbaciones por año durante los años anteriores a la inclusión en el estudio.

- o **Sujetos control** (n = 29). Sujetos no alérgicos con test cutáneo negativo tanto para olivo como para ácaros, residentes en áreas de alta exposición a olivo (Córdoba, n= 7) o ácaros (Gran Canaria, n=22).

Los datos clínicos de los pacientes se recogen en las **Tabla 5 y Tabla 6**.

De cada sujeto, se obtuvieron:

- o **Veinte mililitros de sangre heparinizada**, empleados en la obtención plasma para determinaciones EILE simple y Multiplex.

De acuerdo con el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Real Decreto ley 5-2018, todos los sujetos firmaron un consentimiento informado. Además, el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de los dos los hospitales incluidos en el estudio.

B. ENFERMEDAD CELIACA

Se reclutaron un total de 21 sujetos en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital San Agustín de Avilés (Asturias), y éstos se dividieron en los siguientes grupos experimentales de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

- Criterios inclusión: estudio de la mucosa oral y marcadores sistémicos en enfermedad celiaca
- **Grupo I: Pacientes *de novo*** (n=6). Pacientes recién diagnosticados de EC. Los criterios para el diagnóstico y la inclusión en el estudio fueron 1) histológicos: biopsia duodenal con clasificación Marsh III (atrofia vellositaria), 2) serológicos: presencia significativa de Anticuerpos Anti-Transglutaminasa (AAGT) y 3) genéticos: Antígeno Leucocitario Humano (ALU)-DQ2+.
- **Grupo II: Pacientes en Dieta Sin Gluten (DSG)** (n=7). Pacientes celíacos previamente diagnosticados y actualmente en tratamiento con DSG durante al menos 1 año y con buena respuesta clínica y pérdida de AAGT.
- **Grupo III: Control** (n= 8). Sujetos sanos, no celíacos, no alérgicos.

Los niveles de AAGT-2 (clase IgA) fueron obtenidos empleando un analizador automático de EILE Triturus (Grifols). Los niveles totales de IgA fueron analizados por inmunoturbidimetría mediante el analizador modular Bobas 8000 (Hoffman-La Roche) para descartar posible déficit de IgA y, por lo tanto, un falso negativo en los niveles de AAGT-2.

El historial clínico de todos los sujetos fue revisado por el médico gastroenterólogo responsable. Todos los pacientes con una historia reciente de enfermedad nasofaríngea o alergia respiratoria grave fueron excluidos del estudio.

Los datos clínicos de los pacientes se recogen en la **Tabla 7**.

De cada sujeto, se obtuvieron:

- **Dos biopsias de mucosa oral**, una incluida en paraformaldehído al 4% para análisis histológicos, y otra incluida en RNALater™ (ThermoFisher) para estudios de qPCR.
- **Veinte mililitros de sangre heparinizada**, empleados en la obtención de PBMCs para estudios de RT-cRCP y plasma para determinaciones

EILE simple y Multiplex.

De acuerdo con el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Real Decreto ley 5-2018, todos los sujetos firmaron un consentimiento informado. Además, el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital San Agustín de Avilés.

Todos los sujetos incluidos en el estudio, previamente a la obtención de muestras, fueron investigados para asegurar la ausencia de lesiones orales evidentes que pudieran interferir en el estudio.

Las muestras obtenidas, su procesamiento y los análisis realizados aparecen resumidos en la **Figura 12**.

2. Estudios histológicos y expresión génica en biopsias

2.1. Obtención de biopsias de mucosa oral

Las biopsias de la mucosa oral se obtuvieron por cirugía menor ambulatoria por el Servicio de Alergia en el caso de los pacientes alérgicos y por el Servicio de Otorrinolaringología en el caso de los pacientes celíacos.

- Obtención de biopsias de mucosa oral en sujetos para el estudio de alergia respiratoria

Para el estudio de la mucosa oral en alergia se extrajeron biopsias de longitud variable (~5mm de longitud) empleando la técnica de incisión con bisturí. Tras tratar mediante infiltración anestésica la periferia de la zona a biopsiar, sin aplicar directamente el anestésico en la zona a extraer, la incisión se llevó a cabo hasta el tejido celular subcutáneo. La muestra de tejido a extraer se separó de las fibras de colágeno de la dermis reticular y se levantó sobre la mucosa circundante al retirar el bisturí. La extracción se realizó con pinzas con sumo cuidado para evitar artefactos por contusión. La muestra se sumergió inmediatamente en PFA 4% durante un máximo de 24-48h (**Figura 13 a**).

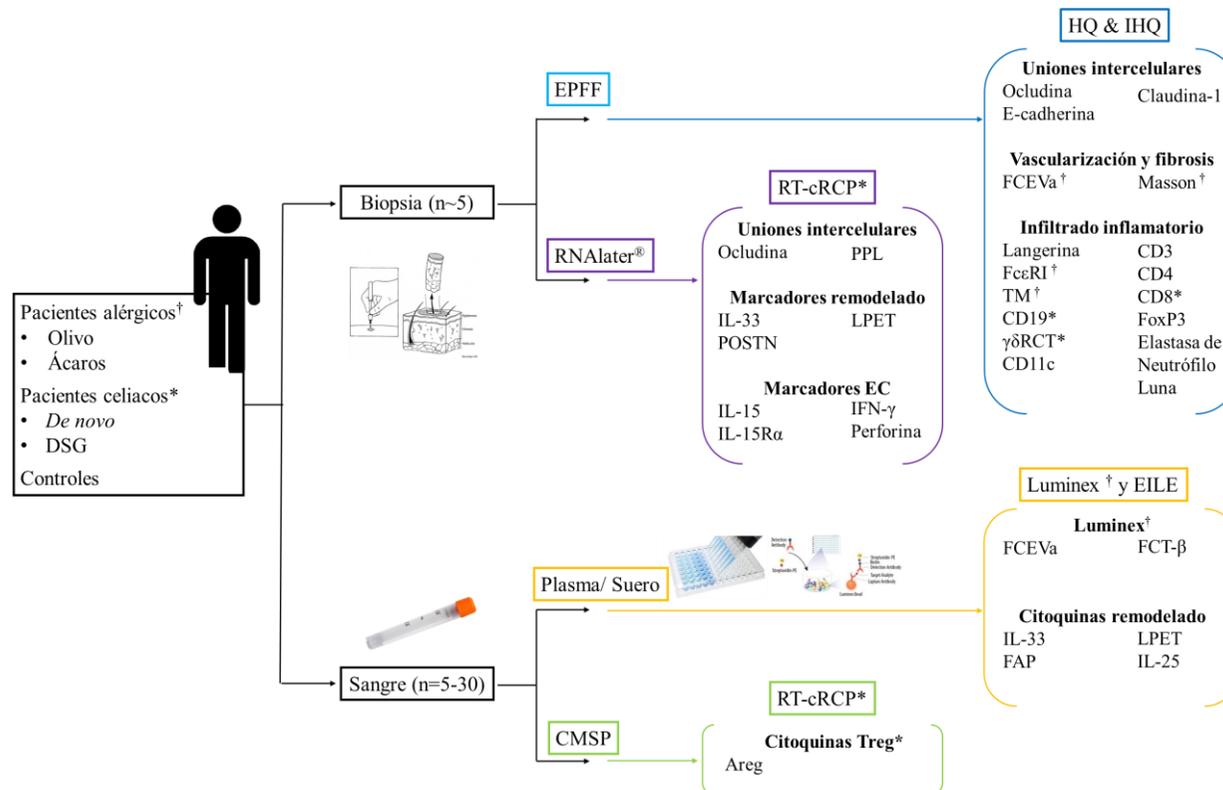


Figura 12. Resumen de la muestras obtenidas, su procesamiento y técnicas aplicadas para todos los sujetos y pacientes celíacos y alérgicos. *Técnica exclusivamente llevada a cabo en el estudio de EC. †Técnica exclusivamente llevada a cabo en el estudio de alergia. DSG: dieta sin gluten, EPFF: embebidos en parafina y fijados en formaldeído, CMSP: células mononucleares de sangre periférica, RT-cRCP: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa, HQ: histoquímica, IHQ: inmunohistoquímica, IL: Interleucina, IFN: interferón, PPL: periplaquina, POST: periostina, FAP: factor activador de plaquetas, FCEVa: factor endotelial vascular a, Areg: anfirregulina, RCT: receptor de célula T, FcεRI: receptor de alta afinidad para IgE, EILE: ensayo por inmuoadsorción ligado a enzimas, LPET: linfopoyetina estromal tímica, TM: triptasa de mastocitos, CD: cúmulo de diferenciación.

- Obtención de biopsias de mucosa oral en sujetos para el estudio de enfermedad celiaca

Para el estudio de la mucosa oral en EC se extrajeron biopsias de 3mm de diámetro de cada sujeto empleando un sacabocados (en inglés, *punch*) (173) y anestesia local, lidocaína en espray. La punción se realizó hasta el tejido celular subcutáneo. La muestra de tejido a extraer se separó de las fibras de colágeno de la dermis reticular y se levantó sobre la mucosa circundante al retirar el *punch*. La extracción se realizó con pinzas (cocodrilo) con sumo cuidado para evitar artefactos por contusión y se sumergió inmediatamente en PFA 4% a temperatura ambiente durante un máximo de 24-48h o RNA later™ para su inmediata congelación (**Figura 13 b**).

Posteriormente, la herida se cubrió con una gasa impregnada en anestésico y se hizo presión hasta el cese del sangrado. No fueron necesarios puntos, a no ser que se observase sangrado que no remitiese.

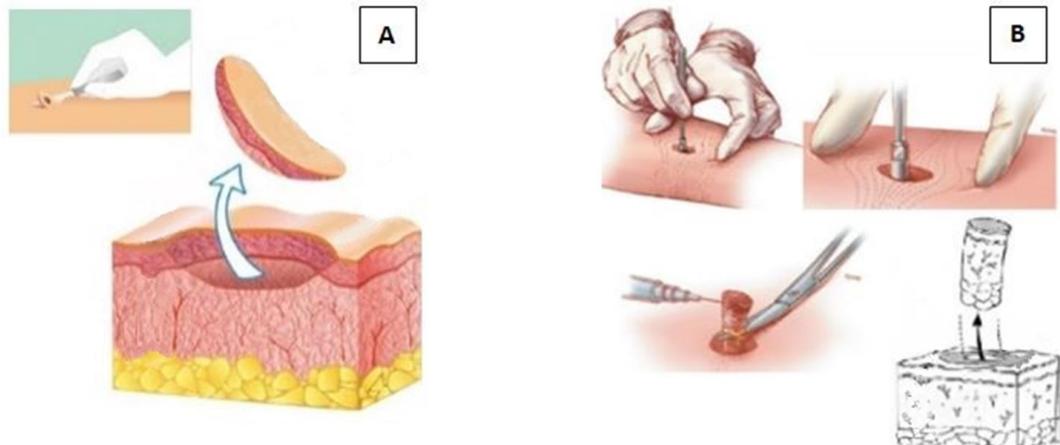


Figura 13. Técnicas empleadas para la extracción de biopsias de mucosa oral. a) Incisión con bisturí. Para el estudio de la mucosa oral en alergia se extrajeron biopsias de longitud variable (~5mm de longitud) empleando la técnica de incisión con bisturí. Tras tratar mediante infiltración anestésica la periferia de la zona a biopsiar la incisión se llevó a cabo hasta el tejido celular subcutáneo. b) Punción con sacabocados. Para el estudio de la mucosa oral en enfermedad celiaca se extrajeron biopsias de 3mm de diámetro de cada sujeto empleando un sacabocados y anestesia local en espray. La punción se realizó hasta el tejido celular subcutáneo. Imágenes adaptadas de Zuber et al., 2002 (173).

2.2. Procesado de biopsias de mucosa oral

- Procesado para análisis histológico

Las biopsias previamente fijadas en paraformaldehído al 4% se incluyeron en parafina y se procesaron empleado el equipo Leica TP1020.

El protocolo seguido y programado en el equipo para el procesado de muestras pequeñas fue el siguiente:

- a) Cubeta 1: Etanol 70° - 45min
- b) Cubeta 2: Etanol 70° - 45min
- c) Cubeta 3: Etanol 96° - 1hora
- d) Cubeta 4: Etanol 96° - 1hora
- e) Cubeta 5: Etanol 96° - 1hora
- f) Cubeta 6: Etanol 96° - 1hora
- g) Cubeta 7: Etanol 100°- 1hora y 30minutos
- h) Cubeta 8: Etanol 100°. 1hora y 30minutos
- i) Cubeta 9: Xilol- 1 hora
- j) Cubeta 10: Xilol -1 hora
- k) Cubeta 11: Parafina – 1hora
- l) Cubeta 12: Parafina – 1hora

Posteriormente, las muestras se conservaron en bloques 24horas a temperatura ambiente y, por último, se procedió a la obtención de cortes histológicos de 1µm de grosor empleando el microtomo Microm HM 325 (ThermoFisher Scientific). Estos cortes se colocaron en portaobjetos de adhesión con polisina (ThermoFisher Scientific). Previo a la tinción, los portaobjetos se mantuvieron en la estufa dos horas para facilitar el eliminado de la parafina excedente. Para evitar el deterioro de la muestra, cualquier corte con una antigüedad superior a 2 semanas fue desechado y reemplazado por un corte nuevo obtenido del bloque de origen.

2.3. Tinciones histológicas

- Hematoxilina-Eosina

El análisis morfológico de todas las muestras se realizó con tinción convencional de Hematoxilina-Eosina (H-E). Las secciones cortadas situadas sobre los portaobjetos se sumergieron en Xilol, dos veces durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se hidrataron en pases seriados a concentraciones de Etanol decrecientes para finalmente ser hidratadas en agua destilada durante 5 minutos. Las muestras se tiñeron entonces con Hematoxilina durante 90 segundos, se lavaron con agua para quitar el exceso de colorante y se tiñeron con Eosina durante 3 minutos. Después de deshidratarlas, las muestras se montaron colocando una gota de DPX y un cubreobjetos sobre ellas.

- Tinción tricrómica de Masson

La tinción de Masson se llevó a cabo utilizando el kit Masson Trichrome Staining (04-011802 – Bio-Optica). Después de desparafinar e hidratar, las muestras fueron tratadas (siguiendo el protocolo de tinción recomendado por el fabricante) con 4 tinciones diferentes: Hematoxilina férrica de Weigert (15 minutos) para teñir los núcleos, ácido pícrico (6 minutos) para teñir eritrocitos, una mezcla de tintes ácidos para resaltar el citoplasma (6 minutos) y una solución verde claro para teñir el colágeno (15 minutos). Después de lavar en agua destilada y deshidratar con concentración creciente de etanol, las secciones se montaron como previamente ha sido explicado para la tinción H-E.

- Tinción de Luna

Tras desparafinar e hidratar, las muestras se tiñeron durante 5 minutos en una solución mixta 1:10 formada por escarlata de Biebrich al 1% y Hematoxilina de Weigert. Las muestras se diferenciaron en Alcohol Ácido 1% hasta alcanzar la tinción nuclear deseada. Posteriormente, las muestras se lavaron en agua y se sumergieron en carbonato de litio 0,5% hasta obtener el tinte azul deseado y observar los eritrocitos rojos brillantes.

Después de lavar en agua durante 2 minutos y deshidratar en alcohol y xilol, las muestras se montaron con DPX.

2.4. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se llevó a cabo empleando el teñidor automático BOND-MAX Automated IHC/ISH Stainer (Leica Biosystems) y el kit de detección Bond Polymer refine Detection kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos empleados son los siguientes (**Tabla 3**):

- Anticuerpos empleados en el estudio de enfermedad alérgica

Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 humano (MCA1477, Bio-Rad), anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 humano (NCL-L-CD4-368, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD11c humano (NCL-L-CD11c, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Claudina-1 humana (ab56417, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-E-cadherina humana (PA0387, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-FcεRI humano (ab54411, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-FoxP3 humano (ab22510, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Langerina humana (ab49730, Abcam), anticuerpo monoclonal de conejo anti-Triptasa de mastocitos (ab134931, Abcam), anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ocludina humana (ab216327, Abcam), anticuerpo policlonal de conejo anti-Elastasa de neutrófilo humana (ab68672, Abcam) and anticuerpo policlonal de conejo anti-FCEV-a (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-A) humano (ab46154, Abcam).

- Anticuerpos empleados en el estudio de enfermedad celiaca

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD19 humano (NCL-L-CD19-163, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 humano (MCA1477, Bio-Rad), anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 humano (NCL-L-CD4-368, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD8 humano (NCL-L-CD8-4B11, Leica Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Claudina-1 humana (ab56417, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-E-cadherina humana (PA0387, Leica

Biosystems), anticuerpo monoclonal de ratón anti-FoxP3 humano (ab22510, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\gamma\delta$ -receptor de célula T (RCT) humano (sc-100289, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Langerina humana (ab49730, Abcam), anticuerpo monoclonal de conejo [EPR20992] anti-Ocludina humana (ab216327, Abcam), y anticuerpo policlonal de conejo anti-Elastasa de neutrófilo humana (ab68672, Abcam).

En todas las tinciones se incluyeron controles positivos y negativos obteniendo siempre ausencia de señal en los controles negativos y la presencia esperada de señal en los controles positivos. Como controles positivos se emplearon muestras de pólipo nasal (eosinófilos, neutrófilos, linfocitos B), muestras de bazo (población linfocitaria T) o piel de paciente con dermatitis atópica (CPAs, CDs, linfocitos $\gamma\delta$). Como control negativo se empleó una muestra de mucosa oral incluida en el mismo procedimiento que las muestras teñidas omitiendo el paso de incubación con el anticuerpo primario.

2.5. Análisis de imagen

Las muestras teñidas fueron escaneadas a una resolución de 40 aumentos empleando el escáner de portaobjetos Leica SCN400 (Leica Biosystems). Para la lectura de las imágenes se empleó el programa Leica SCN400 Image Viewer, el cual permite acercar y alejar la imagen hasta el aumento deseado además de realizar capturas de pantalla.

- Uniones intercelulares y FCEVa

La cuantificación de las uniones intercelulares y FCEV-a se realizó sobre capturas de pantalla obtenidas en formato “.tiff” a partir de los archivos escaneados. A un aumento adecuado, de cada muestra y tinción se obtuvieron entre 2 y 5 capturas, las suficientes para cubrir el total de la muestra.

Una vez obtenidas las capturas, la cantidad de diaminobencidina (DAB) fue cuantificada empleando el programa Image-Pro Plus v4.5.0.29 (Media

Cybernetics). La herramienta *threshold* de este programa permitió segmentar la imagen, obteniendo un umbral capaz de separar los píxeles correspondientes al color marrón asociado al DAB del resto de píxeles de la imagen (**Figura 14 b**). Una vez seleccionado el umbral, el programa fue capaz de cuantificar en cada imagen el área específica de DAB y relativizarla porcentualmente a la superficie de tejido epitelial, tejido conjuntivo o total de la muestra.

Para asegurar un umbral adecuado se impusieron los siguientes requisitos: 1) todas las imágenes de una misma muestra se evaluaron siempre con el mismo valor umbral y 2) la selección del umbral fue siempre realizada por al menos dos observadores independientes. El valor final de porcentaje de tinción para cada muestra fue el resultante de la media ponderada de todas las medidas obtenidas para cada una de las capturas obtenidas de la muestra.

- Infiltrado celular y densidad capilar

El análisis del infiltrado celular y la densidad capilar (Tinción tricrómica de Masson) se llevó a cabo directamente sobre los archivos escaneados empleando la herramienta de conteo “counter tool” integrada en el programa Aperio ImageScope v12.3.8.8013 (Leica Biosystems). Una vez obtenido el número de células positivas para cada tinción o de capilares, éste se relativizó respecto al área investigada (epitelio, conjuntivo o total de la mucosa), expresándose el valor resultante como “número de células/mm² de tejido” o “capilares/mm² de tejido” (**Figura 14 b**). En todas las tinciones, tanto el área como el número de células o el número de capilares fueron determinados por al menos 3 observadores independientes.

2.6. Aislamiento de ARN de biopsias de mucosa oral y CMSPs

Las biopsias de pacientes celíacos y sujetos control conservadas en RNA Later fueron digeridas con TRIzol™ (ThermoFisher). Para facilitar la digestión, inicialmente la muestra se diseccionó con la ayuda de un bisturí

Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados en las diferentes tinciones inmunohistoquímicas llevadas a cabo sobre la mucosa oral.

Antígeno	Diana	Origen	Clonalidad	Casa comercial	Referencia	Dilución	Desenmascaramiento
CD3	Linfocitos T	Rata	Monoclonal	Bio-Rad	MCA1477	1:100	Básico (20')
CD4	Linfocitos T colaboradores	Ratón	Monoclonal	Leica Biosystems	NCL-L-CD4-368	1:100	Básico (20')
CD11c	Células dendríticas	Ratón	Monoclonal	Leica Biosystems	NCL-L-CD11c	1:60	Ácido (20')
Claudina-1	Uniones estrechas	Ratón	Monoclonal	Abcam	ab56417	1:200	Ácido (20')
E-cadherina	Uniones adherentes	Ratón	Monoclonal	Leica Biosystems	PA0387	-	Básico (20')
FcεRI	Receptor IgE	Ratón	Monoclonal	Abcam	ab54411	1:75	Ácido (20')
FoxP3	Treg	Ratón	Monoclonal	Abcam	ab22510	1:50	Básico (20')
Langerina	Células de Langerhans	Ratón	Monoclonal	Abcam	ab49730	1:200	Ácido (20')
Triptasa de mastocitos	Mastocitos	Conejo	Monoclonal	Abcam	ab134931	1:750	Ácido (20')
Ocludina	Uniones estrechas	Conejo	Monoclonal	Abcam	ab216327	1:100	Básico (20')
Elastasa de neutrófilos	Neutrófilos	Conejo	Policlonal	Abcam	Ab68672	1:1000	Ácido (20')
FCEV-a	Angiogénesis	Conejo	Policlonal	Abcam	ab46154	1:100	Ácido (20')
CD19	Linfocitos B	Ratón	Monoclonal	Leica Biosystems	NCL-L-CD19-163	1:50	Ácido (20')
CD8	Linfocitos T citotóxicos	Ratón	Monoclonal	Leica Biosystems	NCL-L-CD8-4B11	1:50	Básico (20')
γδ-RCT	Linfocitos γδ	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz Biotech	sc-100298	1:100	Básico (20')

RCT: receptor de célula T, Ig: inmunoglobulina, IL: interleucina, FCEVa: factor de crecimiento endotelial vascular a, FCεRI: receptor de alta afinidad para IgE, Treg: linfocito T regulador.

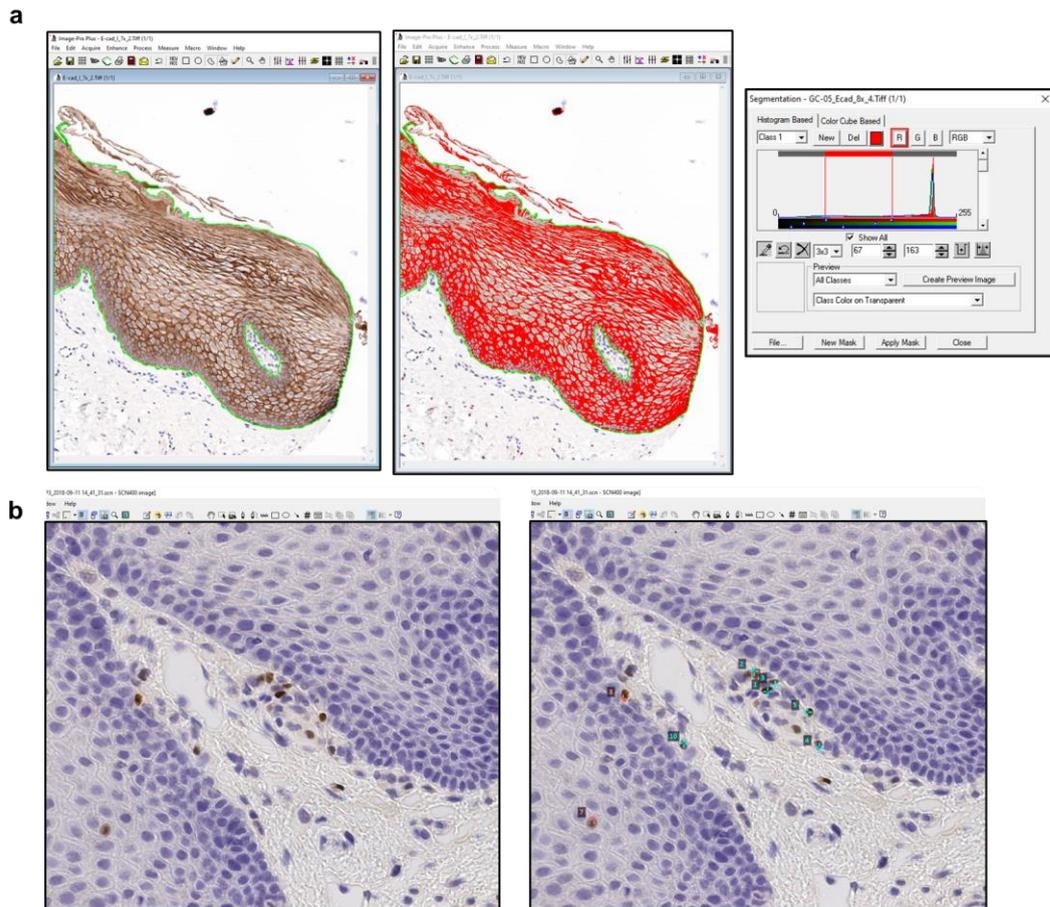


Figura 14. Imágenes representativas de la metodología de análisis de imagen. a. A la izquierda, captura de pantalla a 70 aumentos obtenida en formato “.tiff” a partir de los archivos escaneados para la tinción con inmunohistoquímica frente a E-cadherina. Aparece en verde seleccionado el área de interés, en este caso, el epitelio. Izquierda, la herramienta *threshold* del programa ImageProPlus permitió segmentar la imagen, seleccionando un umbral capaz de separar los píxeles correspondientes al color marrón asociado al DAB del resto de píxeles de la imagen. b. El análisis del infiltrado celular y la densidad capilar se llevó a cabo directamente sobre los archivos escaneados empleando la herramienta de conteo integrada en el programa Aperio ImageScope. Izquierda. Imagen a 200 aumentos para la tinción inmunohistoquímica frente a linfocitos FoxP3+. Derecha, resultado del conteo para ese área, en verde aparece el conteo para los linfocitos de la lámina propia, en naranja pálido se observan los linfocitos en el epitelio. Posteriormente este conteo se relativizó al área de interés (epitelio o lamina propia) expresándose el valor resultante como “número de células/ mm² de tejido”.

y posteriormente, el tejido fue homogeneizado empleando el lisador TissueLyser (Qiagen). Tras la centrifugación, la fase acuosa que contenía el material genético fue purificada empleando las columnas de elución de RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen) con tratamiento con ADNasa y siguiendo el

protocolo del fabricante. Posteriormente el ARN purificado fue retrotranscrito a ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario empleando el kit de retrotranscripción High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems).

Para el estudio cuantitativo mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-cRCP) se empleó el kit de mezcla maestra SYBR Green master mix (Takara) y el equipo de amplificación a tiempo real Real Time HT 7900 (Applied Biosystems).

Los datos de expresión génica fueron normalizados con la mediana de 2 genes de expresión constitutiva, referidos en inglés como genes *housekeeping* β -actina y la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y los resultados fueron analizados siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (174). Los oligonucleótidos seleccionados para amplificar los diferentes genes fueron diseñados empleando las herramientas informáticas Primer3, NIH PrimerBlast y Olygoanalyzer tool (IDT).

3. Estudios sistémicos

3.1. Obtención de suero, plasma y CMSPs a partir de sangre periférica

De cada sujeto del estudio se extrajeron veinte mililitros de sangre heparinizada. Para separar los componentes sanguíneos, se llevó a cabo una centrifugación mediante gradiente de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare™). Tras la centrifugación se aisló el plasma y las células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP), el plasma se almacenó a -80°C para la cuantificación de citoquinas, mientras que las CMSP fueron lisadas en tampón RLT (Quiagen) y almacenadas a -80°C para la posterior extracción de ARN.

3.2. Obtención del ARN de las CMSPs

El ARN de las CMSPs lisadas se extrajo empleando las columnas de elución RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo para la RT-cRCP fue el mismo que el seguido para las biopsias orales (ver apartado 1.6 de Materiales y Métodos).

3.3. EILE multiplex: FCEV-a, PQM-1 y FCT- β

Para la detección de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (PQM-1) y el FCEV-a mediante EILE multiplex se empleó un panel customizado de detección simultánea de citoquinas (Invitrogen). Este ensayo fue llevado a cabo en placas de 96 pocillos, y mediante el uso de microesferas a una concentración de 5000 por marcador siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se empleó el analizador xMAP 200 para detectar los anticuerpos biotinizados marcados con streptavidina-RPE (streptavidina-R-ficoeritrina) y los resultados fueron analizados empleando el software Luminex xPONENT v4.2. Los datos brutos obtenidos en forma de mediana de la intensidad de fluorescencia fueron empleados para calcular la concentración de cada citoquina. Para ello, se generó una curva de regresión logística de 5 parámetros como referencia empleando los 7 estándares suministrados por el fabricante para cada citoquina.

El análisis del factor de crecimiento transformante β (FCT- β) se llevó a cabo empleando el kit EPX01A-10249-901 (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante de la misma manera que para el panel descrito en el párrafo anterior.

3.4. EILE simple: IL-25, IL-33, LPET y FAP

Se emplearon kits EILE para el análisis de IL-33 (CSB-E13000h-96T), IL-25 (CSB-E11715h-96T) y linfopoyetina estromal tímica (LPET) (CSB-E03316h-96T) (Cusabio) en el plasma siguiendo el protocolo del fabricante. Para la detección del FAP en plasma se empleó el kit de FineTest EILE kit (EH4331).

La densidad óptica de los resultados fue analizada por un lector de placas Varioskan. Con los datos obtenidos de los 7 patrones estándar se obtuvo una curva patrón de 5 parámetros (5PL) que fue empleada para

interpolan los datos de las muestras.

4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism v8.0.1. (GraphPad Software).

Las comparaciones entre grupos experimentales se llevaron a cabo en 3 pasos. Inicialmente se comprobó si dentro de cada grupo los datos se comportaban siguiendo una distribución normal. Para ello se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Posteriormente se compararon las medias de los grupos experimentales, mediante la prueba paramétrica ANOVA unifactorial. En caso de que alguno de los grupos no se comportara siguiendo una distribución normal se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis que compara las medianas de los grupos experimentales. Finalmente, en caso de encontrar diferencias en las medias/medianas se evaluó entre qué grupos se encontraban éstas empleando la comparación múltiple de Dunn's para los datos no paramétricos y la comparación múltiple de Tukey para los paramétricos.

Para los análisis de correlación en caso de normalidad se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, en su defecto se empleó el coeficiente de correlación de Spearman.

En todos los análisis se estableció un nivel de significación inferior a 0,05 como significativo.

En el texto, la estadística descriptiva se expresa como “media (s= desviación estándar)”. La estadística inferencial se expresa como “diferencia media \pm desviación estándar (DE) de la diferencia, p-valor” cuando la prueba es paramétrica y “(mediana, p-valor)” cuando la prueba es no paramétrica.

Resultados Alergia Estudio Mucosa Oral

1. Características clínicas de los sujetos control y pacientes alérgicos

De los sujetos del estudio 81,25% eran mujeres: 60,0% en el grupo de pacientes alérgicos a olivo, 100,0% en el grupo de pacientes alérgicos a ácaros y 80,0% en el grupo control (**Figura 15 a**). La edad media fue de 34,75 años: 26,40 (s = 9,34 años) en el grupo de alérgicos a olivo, 38,5 años (s= 2,67 años) en el grupo alérgico a ácaros y 38,6 años (s = 11,61 años) en el grupo control (**Figura 15 b**).

Aunque todos los pacientes alérgicos a olivo presentaron sensibilización al extracto de olivo durante la prueba cutánea, su perfil de sensibilización a alérgenos de olivo fue diverso. Un 20% presentó IgE frente a Ole e 1, mientras que un 40% presentó sensibilización a Ole e 1 y al alérgeno minoritario Ole e 7, o a Ole e 1 y a ambos alérgenos minoritarios Ole e 7 y Ole e 9 (**Figura 15 c**).

En la prueba de punción cutánea llevada a cabo en los pacientes alérgicos a ácaros, un 33,33% mostraron sensibilización a 5 especies de ácaros distintas, mientras que el 66,66% restante mostraron sensibilización a al menos 6 ácaros diferentes (**Figura 15 d**). Los ácaros a los que más frecuentemente reaccionaron los pacientes fueron *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* y *L. destructor* mostrando reacción el 100% de los pacientes, seguido de *T. putrescentiae* en un 88,24% y *A. siro* en un 50% de los pacientes (**Figura 15 e**). El perfil de sensibilización más común fue *D. pteronyssinus* + *D. farinae* + *L. destructor* + *T. putrescentiae* + *B. tropicalis* (**Tabla 4**). Además, todos los pacientes en los que se determinaron los niveles de IgE presentaban niveles frente *D. farinae*, *D. pteronyssinus* y *L. destructor* (**Tabla 4**).

En cuanto a las manifestaciones clínicas, las más frecuentes en los pacientes alérgicos a olivo durante la estación polínica fueron: congestión

nasal, dificultad respiratoria y rinitis, presentes en el 100,00% de los pacientes, y prurito en el 20,08% de ellos. Los síntomas de los pacientes alérgicos a ácaros fueron recogidos durante el episodio de shock anafiláctico, siendo los más frecuentes prurito (83,33%), dificultad respiratoria (66,66%) y rinitis o tos (50%) (**Figura 15 f**) (**Tabla 4**).

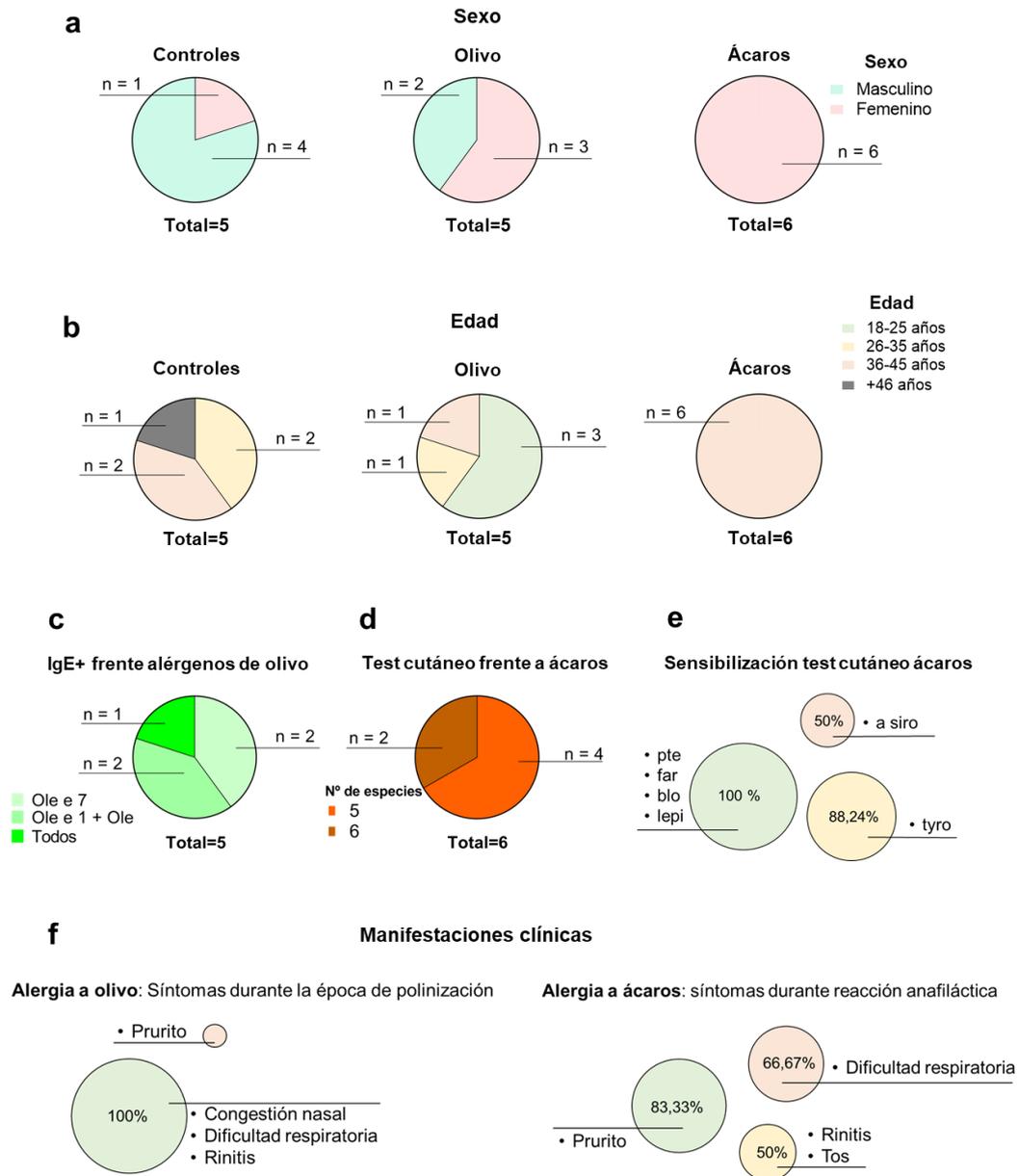


Figura 15. Datos demográficos y clínicos de los sujetos control y pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de la mucosa oral. Los gráficos circulares muestran la distribución por sexo (a) y por edades (b) de los distintos grupos control (izquierda), alérgicos a olivo (centro) y alérgicos a ácaros (derecha) involucrados en el estudio de la mucosa oral. (c) Los gráficos circulares muestran la frecuencia de aparición de IgE frente a los distintos alérgenos del polen de olivo presentes en los pacientes alérgicos a olivo. (d) Número de especies diferentes al que se encontraron sensibilizados y (e) porcentaje de pacientes sensibilizados a las tres especies más frecuentes de ácaros en la prueba de punción cutánea llevada a cabo en los pacientes alérgicos a ácaros. (f) Manifestaciones clínicas asociadas a la alergia durante la época de polinización de polen de olivo para los pacientes de olivo (derecha) y durante la reacción anafiláctica a harinas contaminadas en pacientes alérgicos a ácaros (izquierda). pte: *Dermatophagoides pteronyssinus*, far: *Dermatophagoides farinae*, lepi: *Lepidoglyphus destructor*, tyro: *Tyrophagus putrescentiae*, blo: *Blomia tropicalis*, a siro: *Acarus siro*.

2. Análisis descriptivo preliminar de la mucosa oral

Todas las biopsias de mucosa oral fueron teñidas con H-E para asegurar la correcta orientación, la ausencia de artefactos y la adecuada toma de la muestra.

Se comprobó la disposición correcta del corte asegurando observar en todo caso el tejido epitelial y el tejido conjuntivo suficiente para el análisis. Para el estudio de alergia, las biopsias fueron tomadas con la técnica de incisión con bisturí, observándose una pequeña parte del tejido muscular subyacente en algunas muestras más profundas (**Figura 16**).

3. Integridad de la mucosa oral de pacientes alérgicos

3.1. Integridad de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes alérgicos

Los niveles de expresión de las proteínas asociadas a uniones intercelulares fueron estudiados empleando inmunohistoquímica (IHQ) en las secciones histológicas de la mucosa oral. Todas las muestras embebidas en parafina y fijados con formalina (EPFF) fueron teñidas con anticuerpos anti-occludina y anti-claudina-1, miembros de la familia de las uniones intercelulares estrechas, además de con anticuerpos anti-E-

Tabla 4. Información detallada de los pacientes alérgicos implicados en el estudio de la mucosa oral.

	Edad (años)	Sexo	Total IgE (kU/l)	IgE Específico (kU/l)						Test cutáneo	I. Tiffenau	CVF	VEF1	Test de BD	Manifestaciones clínicas ^A	Intolerancia AINES
				Ole e1	Ole e7	Ole e9	D. pte	D. farinae	L. destructor							
Olivo	25	M	193	0	79,4 0	0	Nd	Nd	Nd	Ole	90	13 4	11 8	-	CN, RIN, RESP	No
	18	M	193	0	85,5 0	0	Nd	Nd	Nd	Ole, lol, cyp	102	99	98	-	CN, RIN, RESP, PRU	No
	40	F	Nd	8,05	72,2 0	0	0,82	Nd	0	Ole, pte	98	12 5	12 3	-	CN, RIN, RESP	No
	18	F	3301	241	696	181	Nd	Nd	Nd	Ole, lol, sal, cyp, alt, cat, dog	95	11 5	11 1	-	CN, RIN, RESP	No
	31	M	240	7,47	19,6 0	0	Nd	Nd	0	Ole, lol, cyp, cat, lepi	94	81	75	+	CN, RIN, RESP	No
Ácaros	39	F	1113	Nd	Nd	Nd	22	14	5	Pte, far, lepi, tyro, blo	107	95	99	+	UR, EP, RESP, MAR	Sí
	39	F	47				1,57	1,42	0,70	Pte, far, lepi, tyro, blo	92	85	74	+	RIN, RESP, PRU, EP, UR	Sí
	36	F	Nd				Nd	Nd	Nd	Pte, far, lepi, tyro, blo, a siro	106	79	86	-	RIN, RESP, PRU, TOS	Sí
	44	F	180				4	4	0,80	Pte, far, lepi, blo, a siro	105	88	91	+	RHI, RESP, PRU, AE, TOS	Sí
	40	F	116				20	13	1,60	Pte, far, lepi, tyro, blo, a siro	93	97	87	+	CN, DA, D, VO, MAR, PRU	Sí
	37	F	67				8,50	Nd	1,30	Pte, far, lepi, tyro, blo	96	11 1	10 2	-	TOS, DT, AE, PRU, HT↓, DES	Sí

M/F, masculino/femenino; Nd, parámetro no determinado AINES: antiinflamatorio no esteroideo. Test Test: I. Tiffenau: Índice Tiffenau-Pinelli. CVF: capacidad vital forzada. VEF1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo. Test de BD: test de broncodilatación. Test cutáneo: ole: *Olea europea*, lol: *Lolium perenne*, sal: *Salsola kali*, cyp: *Cupressus arizonica*, alt: *Alternaria alternata*; pte: *Dermatophagoides pteronyssinus*, far: *Dermatophagoides farinae*, lepi: *Lepidoglyphus destructor*, tyro: *Tyrophagus putrescentiae*, blo: *Blomia tropicalis*, a siro: *Acarus siro*. Manifestaciones clínicas: Alergia al polen de olivo: reacciones durante la época de polinización/Alergia a ácaros: síntomas durante el episodio anafiláctico. AE: angioedema, CN: congestión nasal, D: diarrea, DA: dolor abdominal, DES: desmayo, DT: dolor torácico, EP: edema parpebral, HT↓: hipotensión, MA: mareo, PRU: prurito, RESP: dificultad respiratoria, RI: rinitis, TOS: tos, UR: urticaria, VO: vómito. AINES: medicamentos antiinflamatorios no esteroideos.

cadherina miembro de la uniones adherentes.

Se encontró una disminución significativa en la expresión de ocludina en ambos grupos de pacientes alérgicos comparado con el grupo control (alergia a olivo $-29,24 \pm 4,16\%$, $p < 0,01$ y a ácaros $-23,26 \pm 3,99\%$, $p < 0,01$) (**Figura 17 a, b**)

La expresión de E-cadherina también fue significativamente menor en ambos grupos de pacientes alérgicos al compararlo con el control: alergia a olivo ($-10,81 \pm 3,28\%$, $p < 0,05$) y a ácaros ($-10,60 \pm 3,14\%$, $p < 0,05$) (**Figura 17 c, d**).

Sin embargo, para la claudina-1 se observó únicamente una tendencia al descenso en los grupos alérgicos que no fue significativa (**Figura 17 e, f**).

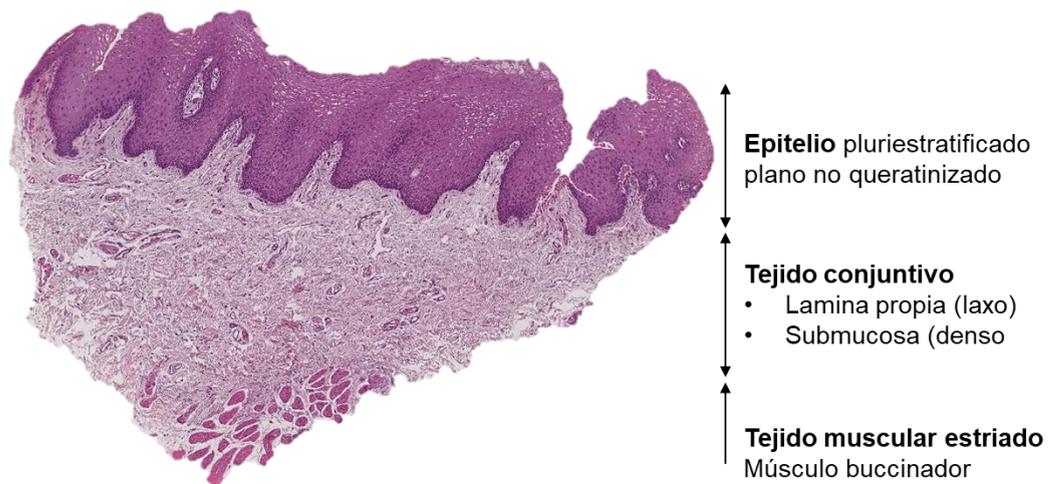


Figura 16. H-E de la mucosa oral extraída con la técnica de incisión con bisturí. Hematoxilina-eosina representativa de las biopsias orales tomadas mediante incisión con bisturí. Se observa la correcta orientación del tejido mostrando el epitelio y el conjuntivo (lamina propia), y profundizando la biopsia hasta el límite con la capa de tejido muscular subyacente. Imagen capturada a 50x aumentos.

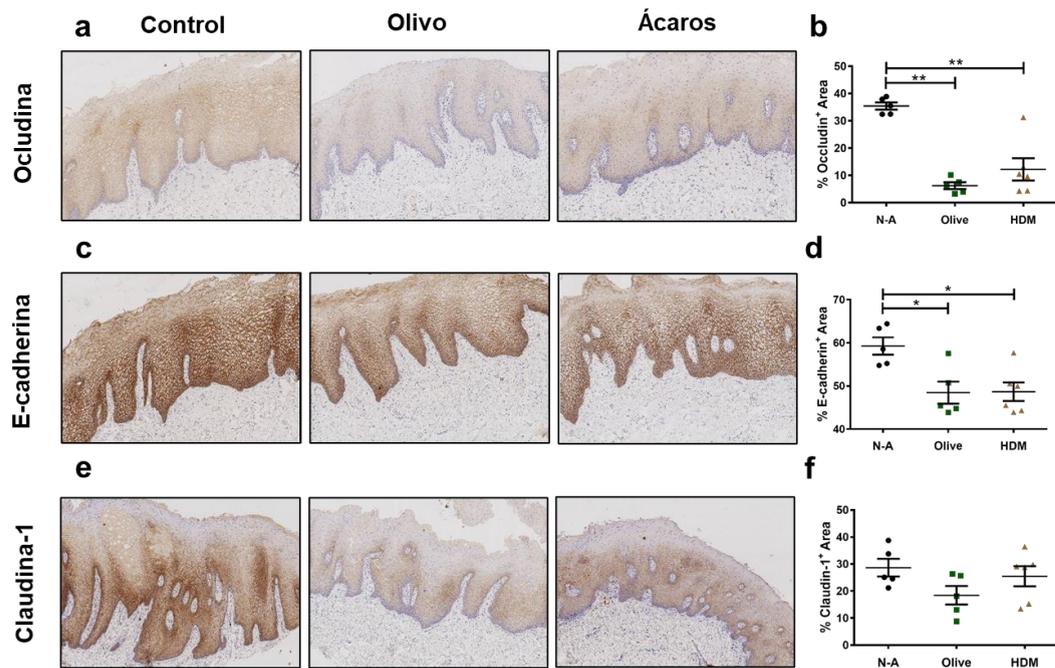


Figura 17. Cuantificación de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes alérgicos y controles. Imágenes representativas y cuantificación de la IHQ de las secciones de mucosa oral tratadas mediante EPFF para E-cadherina (a, b), ocludina (c, d), y claudina-1 (e, f) de pacientes alérgicos al polen de olivo (n=5), polen de ácaros (n=6) y sujetos control (n=5). Las imágenes aparecen capturadas a un aumento de 8x. La cuantificación se expresa como porcentaje de área teñida con DAB respecto al total de epitelio (b, d, f). Los gráficos de dispersión muestran la media \pm DE, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2. Deposición de fibras de colágeno en la mucosa oral de pacientes alérgicos

Se estudió la fibrosis en el tejido conectivo de la mucosa oral de los pacientes alérgicos. Para ello se cuantificó el área teñida de verde en la tinción tricrómica de Masson, la cual se corresponde a los depósitos de fibras de colágeno. Se observó un aumento significativo en la deposición de fibras en los dos grupos de pacientes alérgicos a olivo ($+8,17 \pm 2,25\%$, $p < 0,05$) y a ácaros ($+10,64 \pm 2,16\%$, $p < 0,01$) con respecto al grupo control (Figura 18 a, c).

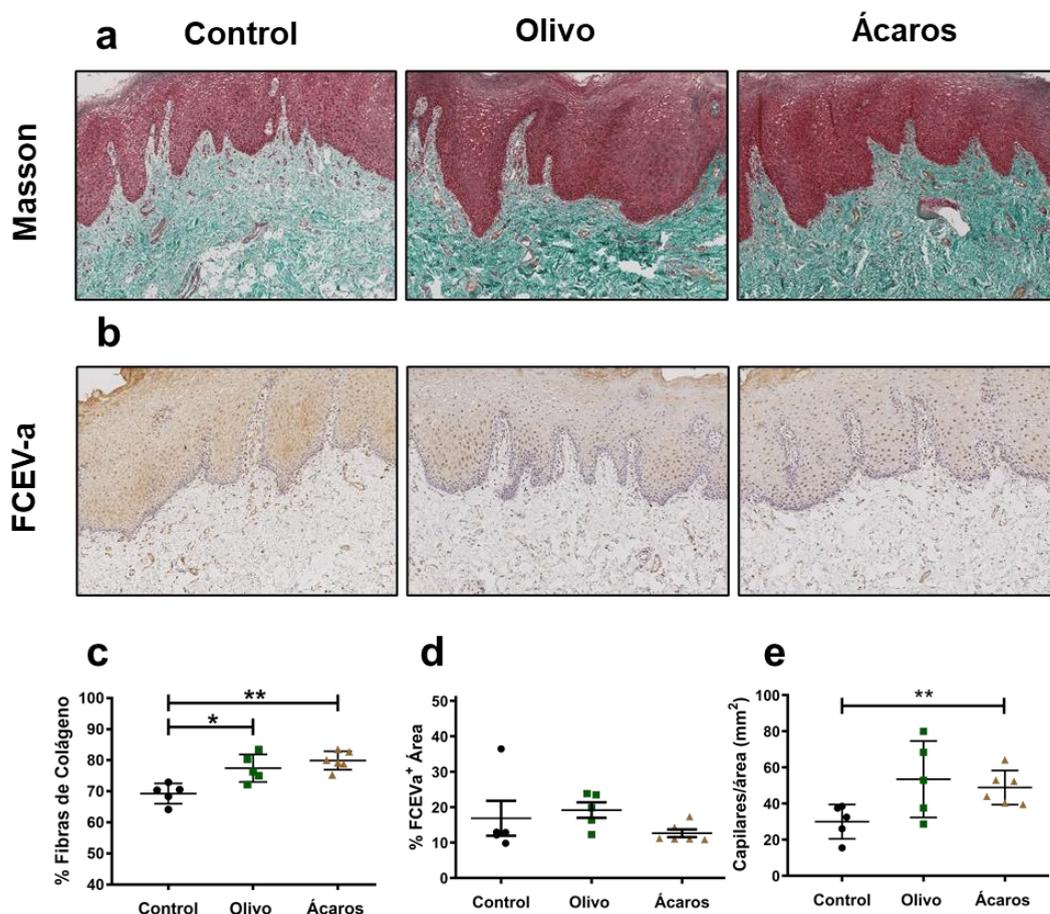


Figura 18. Cuantificación de las fibras de colágeno y angiogénesis en la mucosa oral de pacientes alérgicos y controles. Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson (a) e inmunohistoquímica frente a FCEV-a (b) de las secciones de mucosa oral embebidas en parafina y fijadas en formaldehído de pacientes alérgicos al polen de olivo (n=5), polen de ácaros (n=6) y sujetos control (n=5). Las imágenes aparecen capturadas a un aumento de 8x para Masson y 10x para FCEV-a. (c) La deposición de fibras de colágeno se corresponde al área verde de la tinción tricrómica de Masson y se expresa como porcentaje de área teñida con respecto al total de conjuntivo. (d) Densidad de capilares expresada como capilar sanguíneo/mm² de tejido conectivo y medida en muestras teñidas con tinción tricrómica de Masson. (e) Cuantificación de la presencia de FCEV-a en el total de la muestra, expresada como porcentaje de área teñida con diaminobencidina respecto al total del tejido. Los gráficos de dispersión muestran la media \pm desviación estándar, * p<0,05, **p<0,01. FCEV-a: factor de crecimiento endotelial vascular a.

3.3. Angiogénesis en la mucosa oral de pacientes alérgicos.

La angiogénesis fue estudiada midiendo los niveles de expresión de FCEV-a en el tejido, y la densidad capilar fue medida como capilares

sanguíneos por mm² de tejido.

La expresión de FCEV-a fue estudiada mediante IHQ en las secciones histológicas de la mucosa y cuantificando la cantidad de DAB presente con respecto al total del tejido. No se encontraron diferencias significativas en la presencia de FCEV-a entre los distintos grupos de estudio (**Figura 18 b, d**).

La tinción de Masson también fue útil para la cuantificación de vasos sanguíneos que son fácilmente distinguibles en contraste con el verde del colágeno del tejido conjuntivo (**Figura 18 a**). Al medir la cantidad de capilares sanguíneos en las biopsias orales se observó un aumento significativo en la cantidad de capilares en el grupo de pacientes alérgicos a ácaros ($+23,52 \pm 8,94\%$, $p < 0,01$) con respecto al grupo control, pero no en el de alérgicos a olivo ($p=0,0952$) (**Figura 18 e**).

4. Respuesta inmune desarrollada en la mucosa oral de pacientes alérgicos

4.1. Infiltrado linfocitario: CD3, CD4 y FoxP3

Las biopsias de mucosa oral fueron teñidas con distintos marcadores para los linfocitos T: CD3, CD4 (linfocitos Th) y FoxP3 (linfocitos T reguladores).

Entre todos los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas en los contajes absolutos para CD3, en el conjunto de la mucosa oral, ni para los localizados en el epitelio, ni en lámina propia (**Figura 19 a, b**).

En cuanto a la presencia de células CD4+, se encontraron diferencias significativas en el contaje de células en el tejido conjuntivo entre el grupo control y el grupo de pacientes alérgicos a ácaros ($-96,67 \pm 30,01$ células/mm², $p < 0,05$). En los pacientes alérgicos a ácaros la población de CD4+ se encontró disminuida con respecto al grupo control. Esto no ocurrió en la población alérgica a polen de olivo ($p=0,1349$) (**Figura 19 c, d**).

Los números de células T reguladoras fueron estudiados en el tejido oral mediante IHQ frente a FoxP3+. Los contejes de células FoxP3+ en el epitelio fueron despreciables en la mayoría de los casos, localizándose preferentemente en el tejido conjuntivo subyacente (**Figura 19 e, f**).

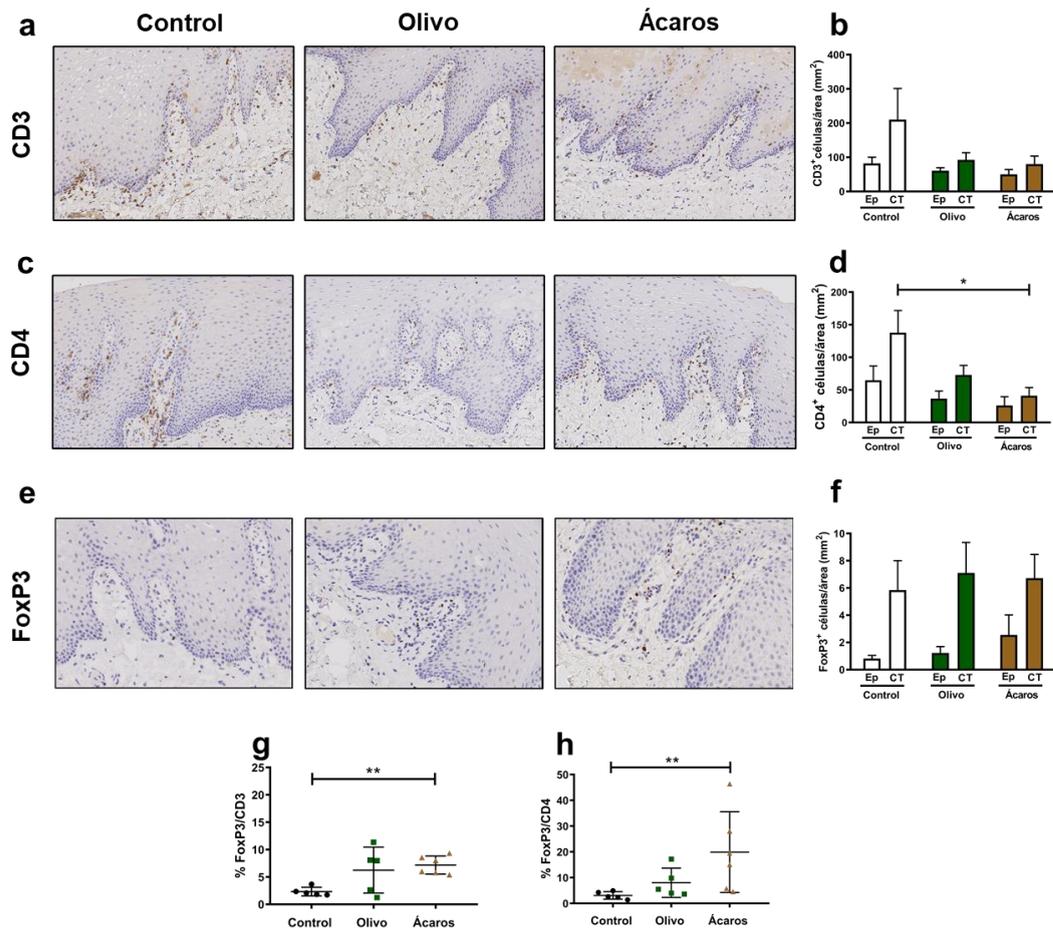


Figura 19. Cuantificación de linfocitos T en la mucosa oral de pacientes alérgicos y sujetos control. Imágenes representativas de la tinción para CD3 (a), CD4 (c) y FoxP3 (e) en secciones de mucosa oral embebidas en parafina y fijadas en formaldehído para sujetos no alérgicos (control) (n=5), pacientes alérgicos al polen de olivo (n=5) y pacientes alérgicos a ácaros (n=6). Contajes absolutos de células CD3+ (b), CD4+(d) y FoxP3+ (f) en el tejido conjuntivo (CT) y el epitelio (Ep) oral. La cuantificación se expresa como células contadas por área (mm²) total de mucosa. Porcentaje de FoxP3 en relación con el total de células CD3+ (g) o CD4 (h) para el total de la mucosa. Imágenes capturadas a 200x aumentos. Los gráficos de dispersión expresan la media ± desviación estándar. *p<0,05, **p<0,01.

No se encontraron diferencias en los números absolutos de células FoxP3+ en toda la mucosa entre los distintos grupos (**Figura 19 f**). Sin embargo, los contajes absolutos no son representativos si no se relativizan frente al número total de linfocitos. Cuando la población de Treg fue evaluada con respecto al total de CD3+ y CD4+, sí se encontraron diferencias entre grupos. La relación FoxP3+/CD3+ fue mayor en el grupo de pacientes alérgicos a ácaros ($+4,86\% \pm 1,63\%$, $p < 0,01$) con respecto al control (**Figura 19 g**). Éste no fue el caso para los alérgicos a olivo ($p=0,0768$). La relación FoxP3+/CD4+ siguió un patrón similar al anterior, encontrándose también incrementado en el grupo de pacientes alérgicos a ácaros ($+12,33 \pm 8,33\%$, $p < 0,0001$) con respecto a los controles, pero no así en los alérgicos a olivo ($p=0,4318$) (**Figura 19 h**).

4.2. Infiltrado células presentadoras de antígeno: Langerhans y CD11c

Las biopsias de mucosa oral se tiñeron con anticuerpos frente a los marcadores de células presentadoras de antígenos CD11c y langerina. En cuanto a su localización, la mayoría de las células CD11c+ se concentraron en el conjuntivo, mientras que la mayoría de las células langerina+ aparecieron preferentemente en el epitelio (**Figura 20 a, c**).

Al estudiar los contajes de células CD11c+ por unidad de tejido, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de alérgicos a olivo. En el epitelio de la mucosa oral de los pacientes alérgicos al polen de olivo, se encuentran menos células CD11c+ con respecto al control ($-50,32 \pm 25,82\%$, $p < 0,05$) (**Figura 20 a, b**).

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos para la población de células langerina+ (**Figura 20 c, d**).

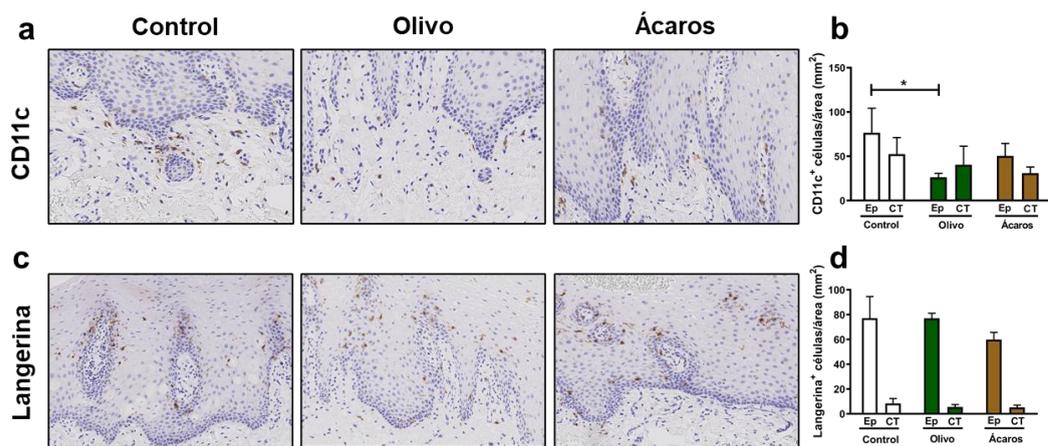


Figura 20. Cuantificación de células presentadoras de antígeno en la mucosa oral de los pacientes alérgicos y sujetos control. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica frente a (a) CD11c y (c) langerina en secciones de mucosa oral embebidas en parafina y fijadas en formaldehído para los diferentes grupos experimentales. Contajes de CD11c (b) y células de Langerhans (d) en el tejido conjuntivo (CT) y epitelio (Ep) de los sujetos control (n=5), los pacientes alérgicos a olivo (n=5) y a ácaros (n=6). La cuantificación se expresa como número de células por área total de mucosa (mm²). Las imágenes fueron capturadas a 20x aumentos. Los gráficos de dispersión muestran media \pm desviación estándar.

4.3. Infiltrado característico de alergia: eosinófilos, mastocitos y receptor Fc ϵ RI

Se estudió la presencia de mastocitos en la mucosa oral mediante IHQ frente a la triptasa de mastocitos (TM).

En cuanto a su localización en el tejido, las células se encuentran únicamente en el tejido conjuntivo subyacente, encontrándose algunas a cierta profundidad, más allá de la lámina propia (**Figura 21 a**). Entre todos los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas en los contajes absolutos (**Figura 21 a, b**).

Además, se estudió la presencia del Fc ϵ RI. Los contajes absolutos de células positivas para este receptor no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (**Figura 21 c**).

Cuando se examinó la cantidad relativa de células que expresaban Fc ϵ RI+ con respecto a las TM+, se observó que las células Fc ϵ RI+ en el

tejido conjuntivo de los sujetos control correspondían a los mastocitos, y representaban en torno al 100% de las células que expresan FcεRI+. Sin embargo, en los pacientes alérgicos aparecieron en el conjuntivo otros tipos de células FcεRI+, siendo la relación FcεRI /TM mayor al 100% en estos grupos. La presencia de células FcεRI+ con respecto a TM+ fue mayor en las dos poblaciones de pacientes alérgicos a olivo (+82,23% ± 25,30 %, $p < 0,05$) o a ácaros (+42,05% ± 24,22%, $p < 0,05$) con respecto al grupo control (**Figura 21 d**).

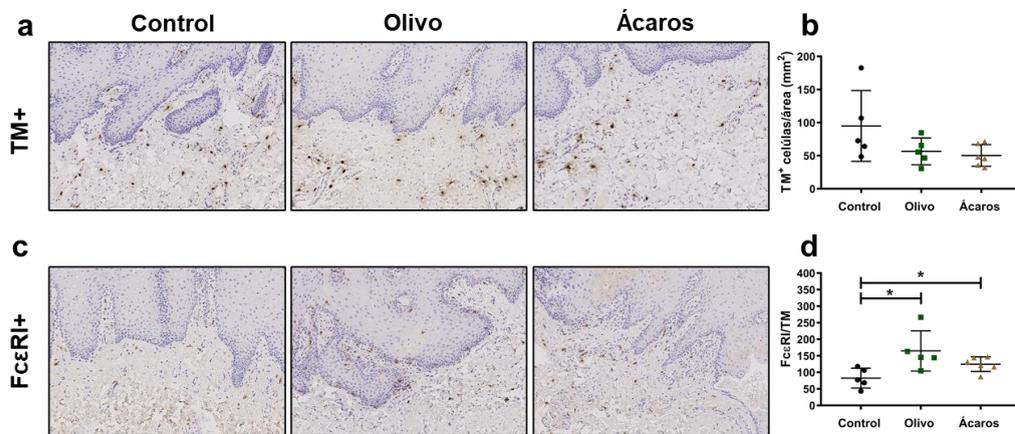


Figura 21. Cuantificación de mastocitos y células FcεRI en la mucosa oral de los pacientes alérgicos y sujetos control. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica frente a (a) TM y (c) FcεRI en secciones de mucosa oral embebidas en parafina y fijadas en formaldehído para los sujetos control (n=5), los pacientes alérgicos a olivo (n=5) y a ácaros (n=6). (b) Contajes de mastocitos (TM+) en el tejido conjuntivo, la cuantificación se expresa como número de células por área total de mucosa (mm²). (d) Relación de células FcεRI+ con respecto al total de mastocitos en el conjuntivo de la mucosa. Las imágenes fueron capturadas a 200x aumentos. Los gráficos de dispersión muestran media ± DE. TM: triptasa de mastocitos, FcεRI: receptor de alta afinidad para IgE.

4.4. Infiltrado de neutrófilos y eosinófilos

También se estudiaron otras poblaciones celulares minoritarias en la mucosa oral. Las tinciones anti-elastasa de neutrófilo y la tinción de Luna revelaron baja presencia de neutrófilos y ausencia de eosinófilos, respectivamente, en la mucosa bucal en todos los grupos experimentales (**Figura 22 a, c**).

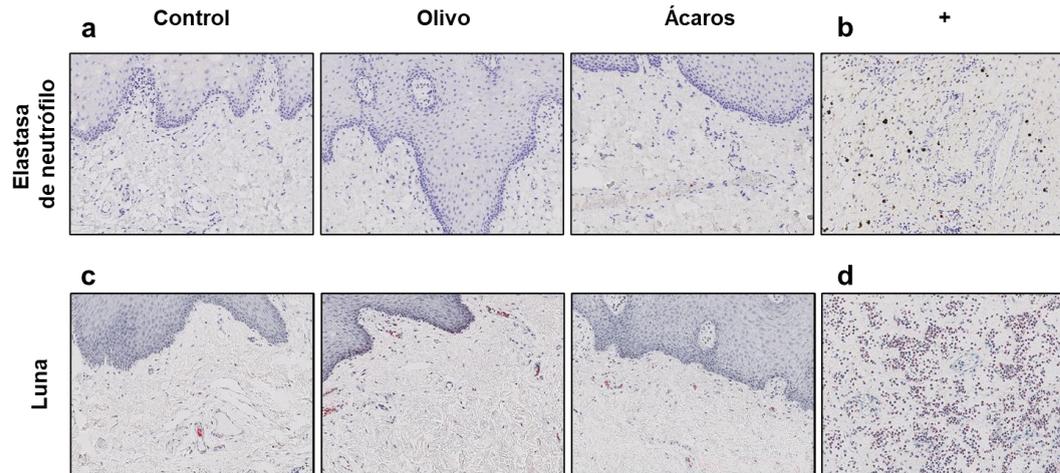


Figura 22. Cuantificación de neutrófilos y eosinófilos en la mucosa oral de pacientes alérgicos y sujetos control. Imágenes representativas para las tinciones frente a elastasa de neutrófilos (a) y luna (eosinófilos) (c). No aparece señal diaminobencidina en la mucosa oral para la elastasa de neutrófilos (a). En la tinción de luna el rosa característico aparece únicamente en los capilares sanguíneos, no se observan eosinófilos en el tejido (c). Biopsias de pólipos nasales como control positivo para elastasa de neutrófilo (b) y eosinófilos (d). Todas las imágenes fueron capturadas a 150x aumentos.

Resultados Alergia: Marcadores Sistémicos

1. Características clínicas de los sujetos control y pacientes alérgicos

- Datos demográficos

En el estudio de citoquinas a nivel sistémico se incluyeron 3 grupos de sujetos: pacientes alérgicos moderados, pacientes alérgicos graves y sujetos no alérgicos con alta exposición a alérgeno. Estos 3 grupos a su vez fueron considerados para dos modelos de alergia distinta: alergia a polen de olivo (Córdoba) y alergia a ácaros (Gran Canaria). Consecuentemente se analizaron un total de 6 grupos: 1) sujetos no alérgicos con alta exposición a polen de olivo (Córdoba), 2) sujetos alérgicos moderados a olivo, 3) sujetos alérgicos graves a olivo, 4) sujetos no alérgicos con alta exposición a ácaros (Gran Canaria), 5) pacientes alérgicos moderados a ácaros y 6) pacientes alérgicos graves a ácaros.

Del total de sujetos del estudio sistémico de citoquinas, el 68,70% fueron mujeres: 68,57% en el grupo de alergia moderada, 74,51% en el grupo de alergia grave y 58,62% en el grupo control (**Figura 23 e**). Discriminando entre los dos tipos de alergia incluidos en el estudio, en el grupo de población expuesta a altas concentraciones de polen de olivo (Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba), el 64,47% eran mujeres: 61,11% en el grupo de pacientes alérgicos moderados, 72,00% en el grupo de pacientes alérgicos graves y 57,14% en el grupo de control (**Figura 23 a**). En el grupo de población expuesta a altas concentraciones ácaros (Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín), el 70,77% eran mujeres: 76,47% en el grupo de pacientes alérgicos moderados, 76,92 en el grupo de pacientes alérgicos graves y 59,10% en el grupo de control (**Figura 23 c**).

La edad media de los sujetos fue de 34,65 años (s= 12,26 años): 33,14 (s = 9,84 años) en el grupo de alérgicos moderados, 38,84 años (s= 12,96

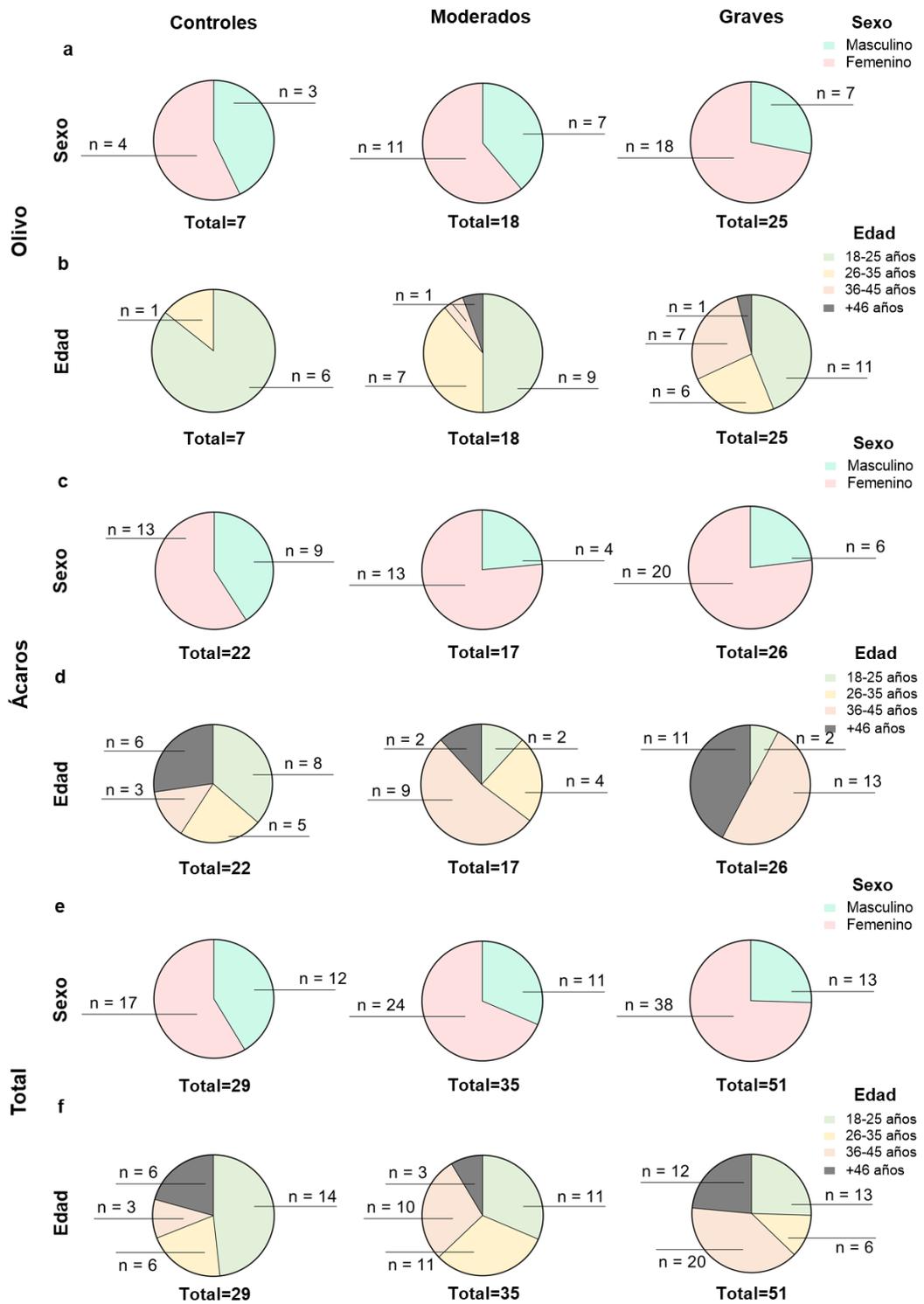


Figura 23. Datos demográficos de los sujetos control y pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de citoquinas a nivel sistémico. Los gráficos circulares muestran la distribución por sexo (a, c y d) y por edades (b, d y e) de los distintos grupos: control (izquierda), alérgicos moderados (centro) y alérgicos graves (derecha) involucrados en el estudio de citoquinas a nivel sistémico. (a, b) Datos demográficos para los pacientes alérgicos a olivo y controles no alérgicos expuestos a altas concentraciones del polen de olivo. (c, d) Datos demográficos para pacientes alérgicos a ácaros y controles no alérgicos expuestos a altas concentraciones de ácaros. (d, e) Datos demográficos para ambos grupos de alérgicos en conjunto y todos los sujetos no alérgicos del estudio.

años) en el grupo alérgicos graves y 37,96 años ($s = 12,85$ años) en el grupo control (**Figura 23 f**). Discriminando entre grupos de exposición, la edad media en el grupo de Córdoba fue de 28,25 años ($s = 9,10$ años): 28,72 años ($s = 8,52$ años) en el grupo de pacientes alérgicos moderados, 29,48 años ($s = 8,75$ años) en el grupo de pacientes alérgicos graves y 22,71 años ($s = 2,14$ años) en el grupo control (**Figura 23 b**). En el grupo de Gran Canaria, la edad media fue de 39,57 años ($s = 12,65$ años): 37,82 años ($s = 9,14$ años) en el grupo de pacientes alérgicos moderados, 46,11 años ($s = 10,75$ años) en el grupo de pacientes alérgicos graves y 33,18 años ($s = 13,71$ años) en el grupo de control (**Figura 23 d**).

- Datos clínicos

Todos los pacientes alérgicos a olivo presentaron sensibilización al extracto de olivo durante la prueba cutánea; sin embargo, también se estudiaron sus niveles de IgE frente al alérgeno de olivo mayoritario Ole e 1 y dos alérgenos minoritarios Ole e 7 y Ole e 9 (**Tabla 5**). Entre los pacientes alérgicos a olivo, en el grupo moderado un 61,11% presentó IgE frente a Ole e 1 y a ambos alérgenos minoritarios Ole e 7 y Ole e 9, un 33,33% presentó sensibilización a Ole e 1 y a Ole e 7 y, por último, un 5,56% presentó sensibilización exclusivamente frente al alérgeno minoritario Ole e 7. En el grupo de alergia grave, un 32,00% presentó sensibilización frente a Ole e 1 y a ambos alérgenos minoritarios Ole e 7 y Ole e 9, un 40,00% presentó sensibilización frente a Ole e 1 y Ole e 7, y un 16,00% presentó sensibilización únicamente frente a Ole e 7 y un 12%

Tabla 5. Información detallada de los pacientes alérgicos a olivo implicados en el estudio de alarminas y citoquinas a nivel sistémico.

Grupo	Edad	Sexo	Fuma	Edad Inicio	IgE total (mg/dl)	IgE Específica (kU/l)			FVC	FEV1	I. Tiffenau	Test de BD
						Ole e1	Ole e7	Ole e9				
MODERADO												
	35	M	no	15	697,50	37,8	12,10	0	103	98	97	-
	22	F	no	15	3620	403	4,37	312				-
	26	F	no	infancia	1601	48,20	380	0,55	92	93	104	-
	48	F	no	36	27,10	0	5,62	0				-
	19	M	sí	10	1780	75,10	234	89,50	116	89	79	-
	24	F	no	18	76,30	9,43	32,10	3,19	121	115	99	-
	33	M	sí	25	666	19,40	86,80	64	134	131	102	-
	25	F	sí	5	303	25,90	60,60	57,80	99	108	109	-
	35	F	no	29	253,30	91,30	0,55	0	103	96	99	-
	29	M	no	15	Nd	15,5	56,7	15,9	75	78	104	-
	44	F	sí	30	209	1,06	22,80	0,32	119	112	81	-
	35	F	no	25	Nd	7,5	61,4	0	129	114	82	-
	21	M	no	10	Nd	17,20	28,20	4,77	101	99		-
	21	F	sí	infancia	246	2,11	75,20	0	88	83	97	-
	23	F	no	15	Nd	2,78	82,90	39,80	96	91	82	-
	25	F	no	15	Nd	12,10	160	0	89	91	84	-
	34	M	no	20	Nd	37	32,60	10,20	77	82	111	-
	18	M	no	11	Nd	15,80	36,90	0	81	90	111	-
												n = 18
GRAVE												
	20	M	sí	infancia	1719	288	52,10	177	92	80	89	-
	20	M	no	infancia	193	0	85,50	0	106	109	105	-
	36	F	no	15	Nd	1,66	380	0	102	110	108	-
	37	F	no	infancia	Nd	0	30,30	0,50	101	98	101	-
	47	M	no	infancia	436	0	193	0	110	95	110	-
	28	F	no	infancia	Nd	6,11	153	0	105	106	105	-
	25	M	sí	19	193	0	79,40	0	134	118	90	-
	18	M	no	infancia	193	0	85,50	0	99	98	102	-
	40	F	no	25	Nd	8,05	72,20	0	125	123	98	-
	18	F	sí	10	3301	241	696	181	115	111	95	-
	31	M	no	10	240	7,47	19,60	0	81	75	94	+
	38	F	no	24	74,90	4,68	34,60	9,63	126	120	100	-
	25	F	no	5	100,60	21,40	29,70	0	86	94	111	-
	24	F	sí	18	45,50	1,78	13,80	0	91	85	93	-
	24	F	no	5	130	2,34	59	0	96	109	110	-
	42	F	no	30	Nd	0	8,43	0,55	91	105	114	-
	18	F	no	infancia	588	3,26	125	0	99	98	102	-
	39	F	no	29	Nd	0	201	111	97	83	73	-
	32	F	no	22	Nd	67	442	0,32	85	75	94	+
	32	F	no	24	551	20,20	190	2,96	103	100	84	-
	32	F	sí	24	214	28,60	65	0	119	85	62	-
	40	F	no	30	259	44,10	240	71,80	101	93	79	-
	22	F	no	17	Nd	10,7	77	0	101	101	87	-
	18	M	no	infancia	Nd	3,12	75,20	2,37	114	90	67,3	-
	31	F	no	20	382,4	18,80	121	0,55	94	91	102	-
												n = 25

M/F, masculino/femenino; Nd, parámetro no determinado; Test: FEV1/FVC: Índice Tiffeneau-Pinelli. CVF: capacidad vital forzada. VEF1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo de la espiración. Test de BD: test de broncodilatación. Test cutáneo: ole: *Olea europea*.

Tabla 6. Información detallada de los pacientes alérgicos a ácaros implicados en el estudio de alarminas y citoquinas a nivel sistémico.

Grupo	Edad	Sexo	Fuma	Edad Inicio	Ácaros clínicamente relevantes	IgE total (mg/dl)	IgE específica (KU/L)			CVF	VEF1	I. Tiffenau	Test de BD
							D. pte	D. farinae	Lepidoglyphus				
MODERADO													
	30	F	no	5	pte + far + lepi + blo + a siro	160	12	11	1,2	93	89	100	-
	30	F	no	14	pte + far + lepi + blo + tiro	346	82	48	2,9	92	86	97	-
	28	F	no	8	pte + far	110	27	18	0,4	91	86	98	-
	26	M	no	7	pte + far + lepi + tyro + blo	1297	100	56	4	82	70	88	+
	21	F	no	20	pte + far + lepi + tyro + blo	76	22	13	1,04	88	91	107	-
	42	M	no	15	pte + far + blo + a siro	358	9	6	0,27	106	81	90	+
	39	F	si	9	pte + far	89	5,8	4,3	0	91	95	109	-
	40	F	no	21	blo	611	0,19	0,16	0	88	60	81	+
	40	F	si	11	pte + far + lepi + blo	365	100	100	100	78	72	103	+
	40	F	no	22	pte + far + lepi + blo + tiro + a siro	237	24	22	10	121	97	80	+
	31	F	no	6	pte + far + lepi + blo + tiro + a siro	2500	100	88	3,8	112	107	91	-
	43	M	no	40	pte + far + blo	116	12	5	0	92	92	102	-
	41	M	no	13	pte + far + lepi + blo + tyro	238	43	100	12	69	64	80	+
	51	F	ex	19	pte + far + blo	49	11	12	0,29	81	78	90	+
	57	F	no	40	pte + far + lepi + blo + tyro	547	73	44	11	91	90	106	-
	43	F	ex	6	pte + far + lepi + blo + tyro	206	25	22	2	98	93	101	+
	41	F	no	12	pte + tyro + euro	194	7,4	0	0	112	97	91	+
												n = 17	
GRAVES													
	40	F	no	12	pte + far + lepi + tyro + blo	79	32	34	1	98	87	93	+
	45	F	no	6	pte + far + lepi + tyro + blo	38	nd	nd	nd	96	96	106	+
	45	F	no	21	pte + far + blo	49	7	12	0	99	95	96	+
	49	M	no	11	pte + far + blo + a siro	122	21	nd	nd	88	91	105	+
	54	F	no	20	pte + far + lepi + tyro + blo + a siro	56	8	8	1,4	93	88	98	+
	62	F	no	25	pte + far + lepi + tyro + blo	68	3	4,5	10	100	93	96	-
	43	F	no	6	pte + far + blo	134	17	8	0	73	61	85	+
	53	F	no	20	pte + far + lepi + tyro + blo	525	65	54	10	126	116	97	+
	24	F	no	8	pte + far + lepi + tyro + blo + a siro	385	62	30	8	87	88	105	+
	61	F	no	9	pte + far + lepi + tyro + blo + a siro	359	72	28	5	57	61	113	+
	46	F	no	17	pte + far + lepi + tyro + blo	nd	nd	nd	nd	90	80	92	+
	39	F	no	20	pte + far + lepi + tyro + blo	68	1,2	2,8	2	89	79	85	+
	44	F	no	5	pte + far + lepi + tyro + blo	569	15	18	17	97	97	105	+
	49	F	no	25	pte + far + lepi + tyro + blo	32	30	23	10	99	101	107	+
	36	M	no	4	pte + far + lepi + tyro + blo + a siro	433	19	12	4	91	89	98	+
	44	F	no	12	pte + far + lepi + blo	74	0,1	0,18	0,38	89	90	107	+
	42	M	no	21	pte + far + lepi + tyro + blo	135	20	30	2	103	94	93	-
	53	M	no	15	pte + far + tyro + blo	679	73	100	0,5	71	66	93	+
	70	M	ex	20	pte + far + lepi + tyro	176	100	67	0,76	22	67	77	+
	44	M	no	12	pte + far + blo	202	16	9	0	68	52	72	+
	36	F	no	4	pte + far + tyro + blo	2000	25	13	0,97	66	48	72	+
	43	F	no	4	pte + far + lepi + tyro + blo	647	100	39	4,1	73	72	91	+
	24	F	no	2	pte + far + lepi + tyro + blo	1585	100	100	19	109	108	90	+
	48	F	ex	5	pte + far + lepi + tyro + blo	455	100	100	44	63	58	95	+
	64	F	no	15	pte + far + lepi	160	3,1	1,35	0,36	69	68	100	+
	41	F	no	9	pte + far + lepi + a siro	245	100	100	11	57	60	91	+
												n = 26	

M/F, masculino/femenino; Nd, parámetro no determinado; Test: I. Tiffeneau: Índice Tiffeneau-Pinelli. CVF: capacidad vital forzada. VEF1: volumen expiratorio forzado en el primer segundo de la espiración. Test de BD: test de broncodilatación. Test cutáneo: pte: *Dermatophagoides pteronyssinus*, far: *D. farinae*, lepi: *Lepidoglyphus destructor*, tyro: *Tyrophagus putrescentiae*, blo: *Blomia tropicalis*, a siro: *Acarus siro*, euro: *Leptotrombidium europaeum*.

frente a los dos alérgenos minoritarios Ole e 9 y Ole e 7 (**Figura 24 a**).

También se estudió la sensibilización a distintas especies de ácaros por prueba por punción cutánea en los pacientes alérgicos a ácaros con clínica moderada o grave. En el grupo moderado un 5,88% estaban sensibilizados a 1 único acaro, un 11,76% a 2 ácaros, un 17,65% a 3 ácaros, un 11,77% a 4 ácaros, un 41,18% a 5 ácaros y un 11,77% mostraron sensibilización a 6 especies de ácaros distintas en la prueba cutánea. En el grupo grave, un 15,38% estaban sensibilizados a 3 especies de ácaros distintas, un 23,08% a 4 especies, un 46,15% a 5 especies y un 15,38% a 6 especies distintas (**Figura 24 b**).

Los ácaros a los que más frecuentemente reaccionaron los pacientes en la prueba cutánea fueron *D. pteronyssinus* en un 94,12% de los pacientes, seguido de *D. farinae* en un 88,23%, *B. tropicalis* en un 82,35% y finalmente de *L. destructor* apareciendo reacción en el 58,82% de los pacientes. En el grupo grave, la reacción más frecuente fue frente a *D. pteronyssinus* y *D. farinae* en el 100% de los sujetos, seguido de *B. tropicalis* en un 88,46%, y de *L. destructor* y *T. putrescentiae* en un 76,92% de los pacientes (**Figura 24 c**). El perfil de sensibilización más frecuente en ambos grupos de pacientes alérgicos a ácaros fue *D. pteronyssinus* + *D. farinae* + *L. destructor* + *T. putrescentiae* + *B. tropicalis*, apareciendo en el 35,29% de los pacientes alérgicos moderados y el 34,61% de los casos graves (**Tabla 6**).

En cuanto a los niveles de IgE frente a ácaros en los pacientes moderados el 76,47% eran positivos para los tres ácaros testados (*D. farinae*, *D. pteronyssinus* y *L. destructor*), un 17,65% frente a *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, y un 5,88% únicamente frente a *D. pteronyssinus*. En los

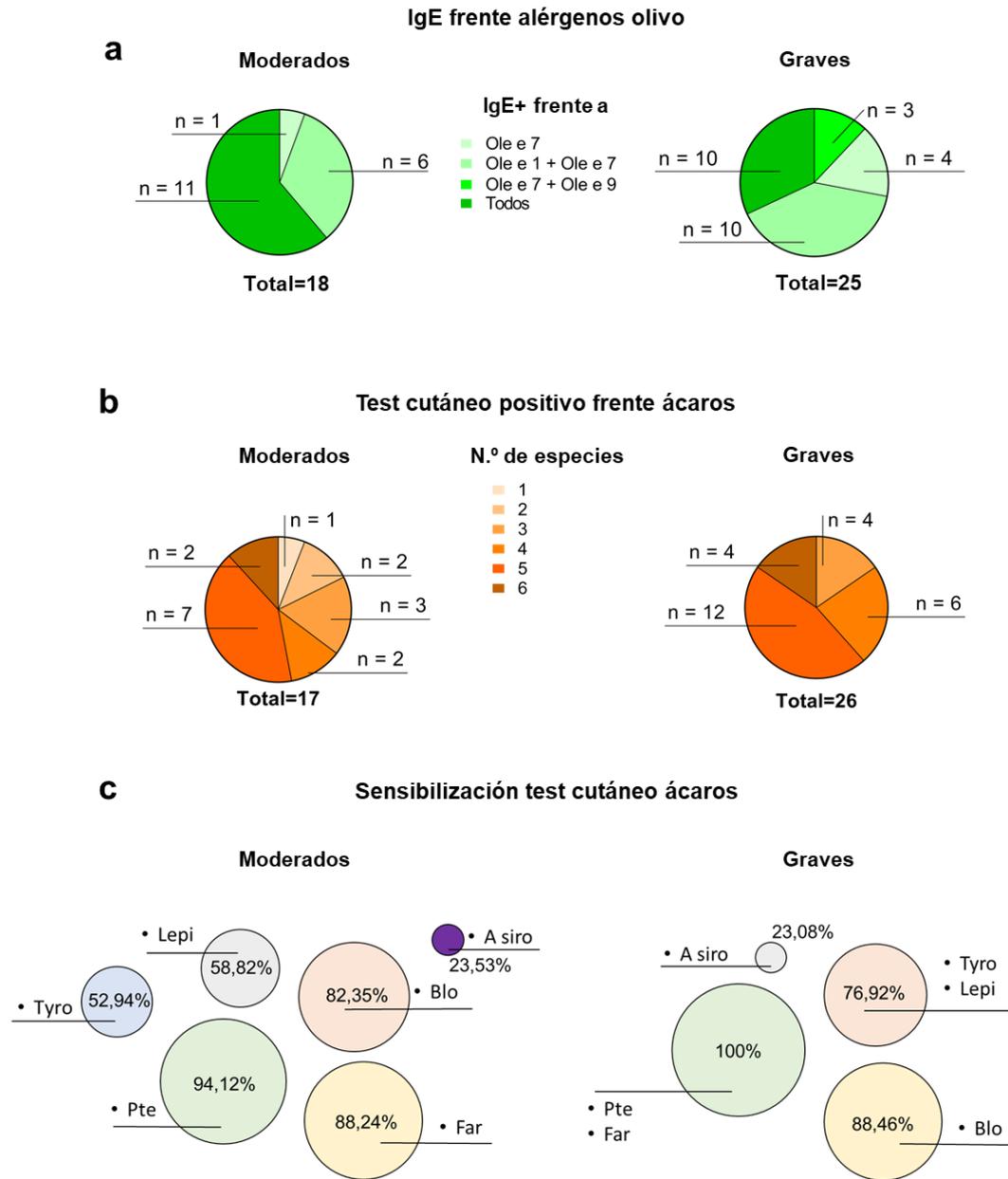


Figura 24. Datos clínicos de sensibilización de los pacientes alérgicos a ácaros y a polen de olivo involucrados en el estudio de citoquinas a nivel sistémico. (a) Los gráficos circulares muestran la frecuencia de aparición de IgE frente a los distintos alérgenos del polen de olivo presentes en los pacientes alérgicos a olivo moderados (izquierda) o graves (derecha). (b) Número de especies diferentes a las que se encontraron sensibilizados los pacientes alérgicos a ácaros moderados (izquierda) o graves (derecha) en la prueba de punción cutánea. (c) Porcentaje de pacientes sensibilizados a las distintas especies de ácaros empleados en la prueba de punción cutánea para los pacientes alérgicos a ácaros moderados (izquierda) o graves (derecha). pte: *Dermatophagoides pteronyssinus*, far: *Dermatophagoides farinae*, lepi: *Lepidoglyphus destructor*, tyro: *Tyrophagus putrescentiae*, blo: *Blomia tropicalis*, a siro: *Acarus siro*.

pacientes graves, un 91,30% presentaron niveles de IgE frente a las 3 especies determinadas y únicamente el 8,70% restante no presentó IgE frente a *L. destructor* (**Tabla 6**).

2. Niveles sistémicos de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral

Se examinaron los niveles séricos de diferentes marcadores de remodelado epitelial y moléculas asociadas IL-33, IL-25, LPET y FAP mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (EILE). Los resultados se agruparon en 3 grupos: niveles séricos en alérgicos a olivo, en alérgicos a ácaros, y en los pacientes alérgicos en general combinando ambos tipos de alergia. Además, cada grupo se dividió en 3 estratos: control, moderado o grave en función de la ausencia o gravedad clínica de la alergia.

Para la alarmina IL-25, se encontró un incremento en los niveles séricos en los pacientes alérgicos graves tanto para el grupo de pacientes alérgicos a ácaros (+13,34 pg/ml, $p < 0,05$), como para los dos grupos de pacientes alérgicos combinados (+22,35 pg/ml, $p < 0,01$) con respecto al grupo control no alérgico. Sin embargo, este incremento no fue significativo al tener en cuenta exclusivamente la población de pacientes alérgicos a olivo ($p = 0,5139$) (**Figura 25 a**).

Al examinar los niveles de IL-33, no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos experimentales para ninguna de los grupos alérgicos individuales, tampoco para los grupos alérgicos combinados (**Figura 25 b**).

Los niveles de LPET fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con alergia grave a olivo en comparación con el grupo de alérgicos moderados (+10,58 pg/ml, $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias frente al control (moderados: $p = 0,0320$; graves: $p = 0,3103$). No se hallaron diferencias significativas para los pacientes alérgicos a ácaros, ni al combinar ambos grupos de pacientes alérgicos

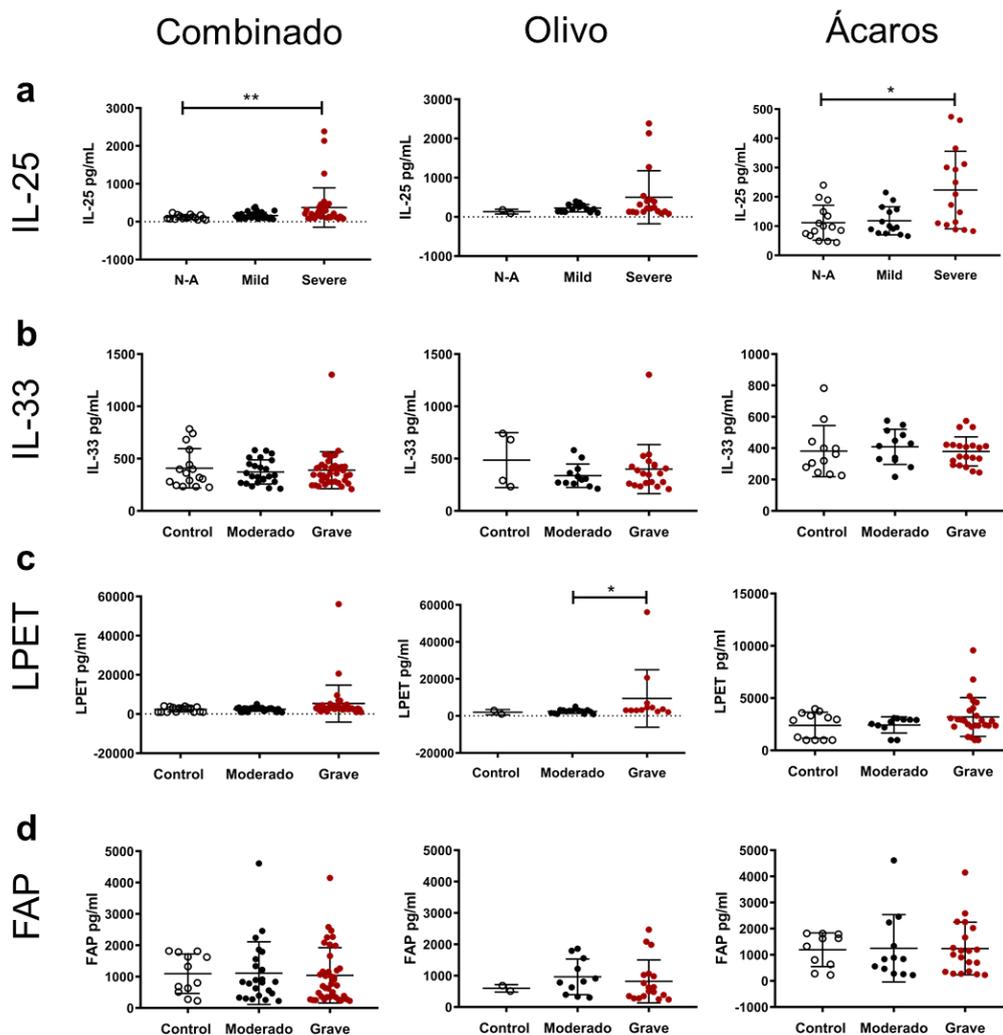


Figura 25. Niveles de alarminas epiteliales en suero medidos por EILE en pacientes alérgicos y sujetos control. Niveles proteicos de IL-25 (a), IL-33 (b), LPET (c) y FAP (d) en el suero de sujetos alérgicos tanto a polen de olivo como a ácaros (izquierda), alérgicos al polen de olivo (centro) y alérgicos a ácaros (derecha). Los puntos blancos representan sujetos control no alérgicos, los puntos negros representan pacientes alérgicos moderados y los puntos rojos pacientes con alergia grave. Los gráficos de dispersión se expresan como media \pm DE. * $p < 0.05$.

(Figura 25 Figura 25c).

También se determinaron los niveles de FAP, ya que, como se ha discutido previamente, es capaz de inducir la liberación de IL-33. No se hallaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales para ninguno de los grupos de pacientes alérgicos (Figura 25 d).

3. Niveles sistémicos de citoquinas asociadas a la inflamación alérgica.

Se examinaron los niveles séricos de diferentes citoquinas proinflamatorias asociadas a inflamación alérgica mediante el uso de la técnica de EILE multiplex.

Para el FCEV-a, se encontró un incremento en los niveles séricos en los pacientes alérgicos graves al combinar los dos grupos de pacientes alérgicos (+19,04 pg/ml, $p < 0,05$) con respecto al grupo control no alérgico. Sin embargo, este incremento no fue significativo al tener en cuenta exclusivamente la población de pacientes alérgicos a olivo independientemente de la gravedad de la alergia (Kruskal-Wallis olivo: $p = 0,2842$). En el caso de los ácaros se encontraron diferencias significativas en las medias (Kruskal Wallis ácaros $p = 0,0260$), pero las pruebas de comparación múltiple no revelaron diferencias significativas entre los grupos alérgicos y el control (moderados: $p = 0,1137$, graves: $p = 0,0798$) (**Figura 26 a**).

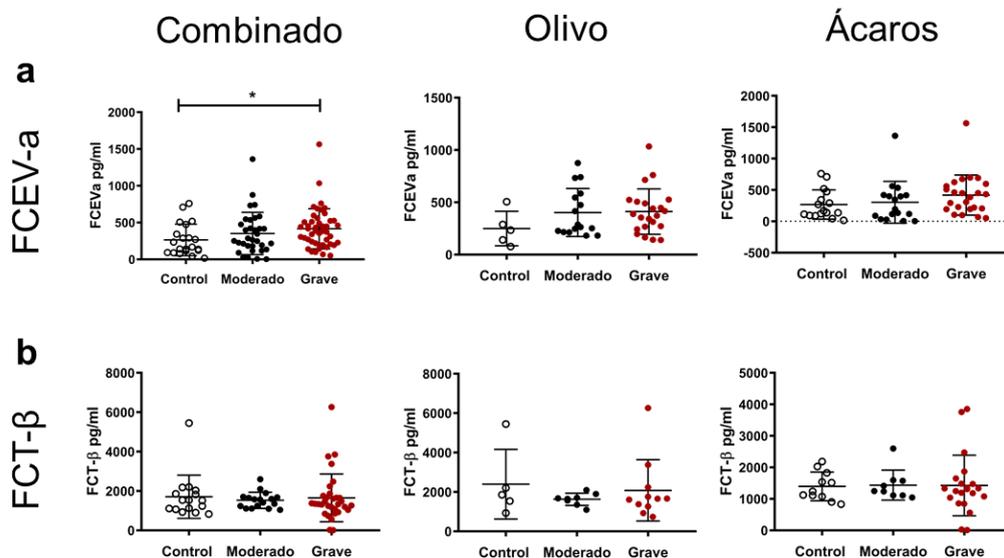


Figura 26. Niveles de citoquinas inflamatorias en suero medidos por EILE en pacientes alérgicos y sujetos control. Niveles proteicos de FCEV-a (a), y FCT- β (b) en el suero de sujetos alérgicos tanto a polen de olivo como a ácaros (izquierda), alérgicos al polen de olivo (centro) y alérgicos a ácaros (derecha). Los puntos blancos representan sujetos control no alérgicos, los puntos negros representan pacientes alérgicos moderados y los puntos rojos pacientes con alergia grave. Los gráficos de dispersión se expresan como media \pm DE. * $p < 0.05$.

También se determinaron los niveles de FCT- β . No se hallaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales para ninguno de los grupos de pacientes alérgicos (**Figura 26 b**).

4. Correlaciones entre citoquinas inflamatorias y alarminas epiteliales

Se evaluó la asociación entre las diferentes citoquinas de remodelado epitelial. Además, para determinar si el nivel de inflamación sistémica se correlacionaba con el incremento de citoquinas de remodelado epitelial, se evaluó la correlación entre ambos tipos. Estas comparaciones se llevaron a cabo para todos los sujetos y, además, teniendo en cuenta exclusivamente a los pacientes graves, combinando los alérgicos graves a olivo y a ácaros.

Se encontró una correlación positiva significativa entre la expresión de LPET e IL-25 en el suero de todos los sujetos, es decir, el daño epitelial se traduce en mayor liberación de LPET asociada con mayor liberación de IL-25 ($r = +0,38$, $p < 0,01$) para todos los grupos experimentales. Esta correlación también apareció al examinar únicamente la población de pacientes alérgicos graves tanto a polen de olivo como a ácaros ($r = +0,62$, $p < 0,01$) (**Figura 27 a**). No se encontró ninguna otra correlación significativa entre ninguno de las otras citoquinas de remodelado epitelial estudiadas.

La LPET se correlacionó positivamente con la expresión de FCT-b ($r = +0,49$, $p < 0,01$) en todos los sujetos, es decir, cuanto más daño epitelial hay, más LPET se libera, más inflamación se detecta, y, por tanto, más FCT-b se libera. Esta correlación se observó de manera más dramática al examinar únicamente la población de pacientes alérgicos graves ($r = +0,78$, $p < 0,001$) (**Figura 27 b**). No se encontró ninguna otra correlación entre ninguna de las citoquinas de remodelado estudiadas con ninguna otra citoquina proinflamatoria.

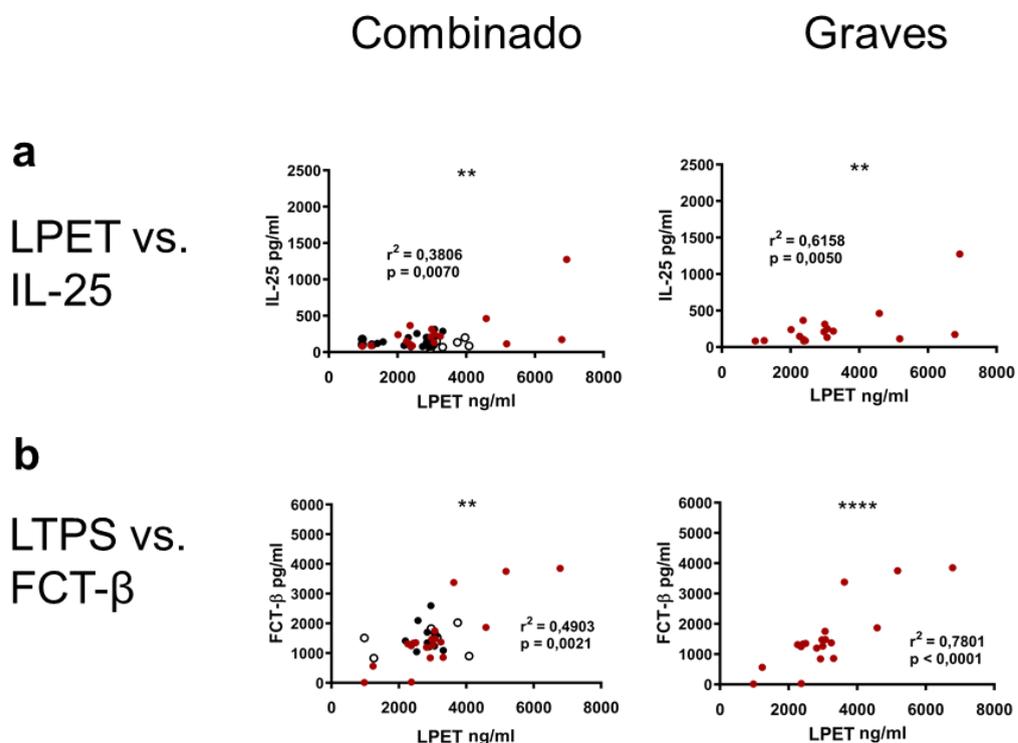


Figura 27. Correlaciones significativas entre alarminas epiteliales y citoquinas inflamatorias en pacientes alérgicos y sujetos control. Correlación de Spearman significativa entre la manifestación de la LPET frente a IL-25 (a) y frente a FCT-β (b) en el suero de sujetos alérgicos tanto a polen de olivo como a ácaros y controles (izquierda) y, únicamente pacientes alérgicos graves (derecha). Los puntos blancos representan sujetos control no alérgicos, los puntos negros representan pacientes alérgicos moderados y los puntos rojos pacientes con alergia grave. Los gráficos de dispersión se expresan como media \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Resultados Celiaquía

1. Características clínicas de los sujetos control y celíacos

De los sujetos del estudio 76,2% eran mujeres: 83,3% en el grupo *de novo*, 87,5% en el grupo DSG y 62,5% en el grupo control (**Figura 28 a**). La edad media fue de 44,69 años: 51 (s = 15,62 años) en el grupo *de novo*, 48,57 años (s= 13,16 años) en el grupo en DSG y 34,5 años (s = 12,12 años) en el grupo control (**Figura 28 b**).

En los pacientes celíacos, las manifestaciones clínicas más frecuentes en el momento del diagnóstico fueron deficiencia de hierro y diarrea, presente en el 38,46% de los pacientes celíacos, siendo el 23,08% de ellos diagnosticados con anemia. Otras manifestaciones clínicas frecuentes fueron dolor abdominal (30,77%), pérdida de peso (23,08%) y dispepsia (23,08%) (**Figura 28 e**). Entre las comorbilidades descritas en algunos pacientes se incluyeron enfermedades autoinmunes como el vitíligo o enfermedad reumática. Entre los pacientes en DSG un 25% presentaron signos de depresión (**Tabla 7**).

De acuerdo con los criterios de inclusión, todos los pacientes recién diagnosticados presentaron resultados positivos para anticuerpos anti-transglutaminasa 2 (AATG-2), genotipo ALH-DQ2+ y al menos clasificación Marsh III en la escala para las biopsias duodenales. Todos los pacientes mostraron niveles normales de anticuerpos clase IgA, excepto uno, que presentó deficiencia de IgA, pero niveles claros de AATG-2 (**Tabla 7**). En el grupos en DSG, el tiempo medio desde el inicio de la dieta fue de 6,42 años (s = 6,76 años), siendo el tiempo mínimo en dieta 1,17 años y el máximo 12,42 años (**Figura 28 c**).

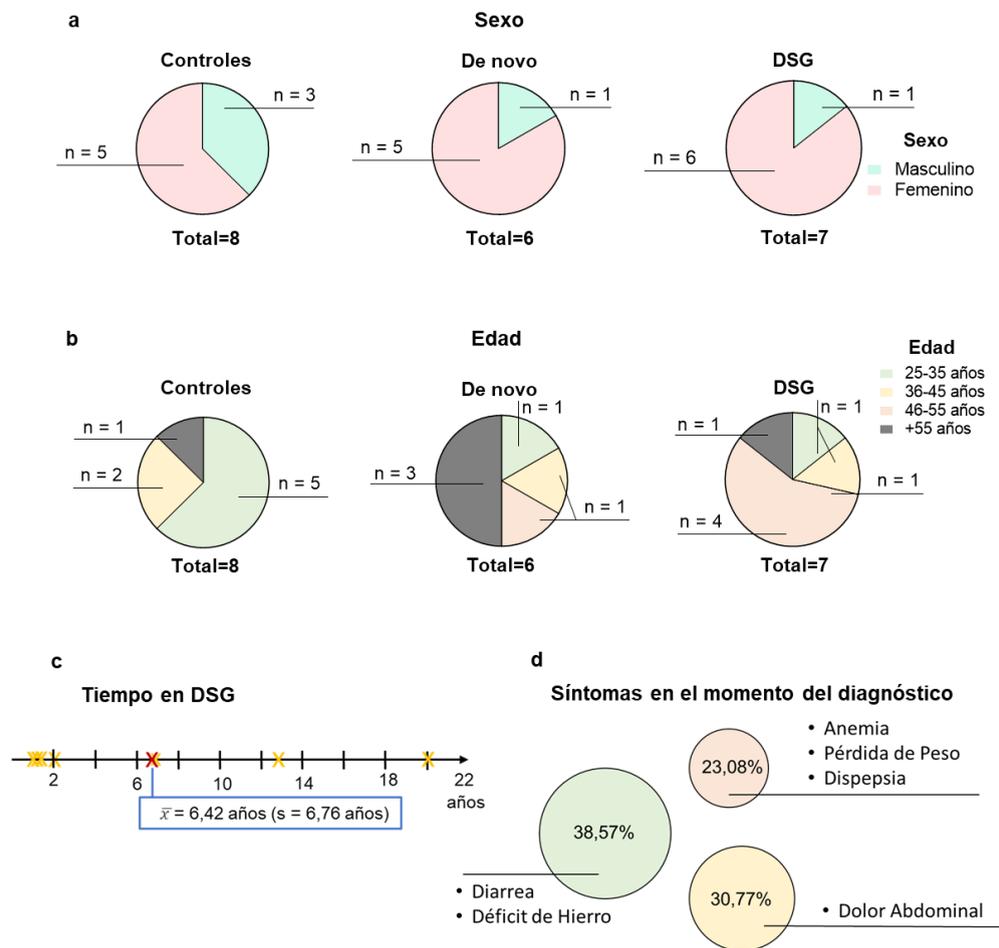


Figura 28. Datos demográficos y clínicos de los sujetos control y pacientes celíacos en el estudio de la mucosa oral. Los gráficos circulares muestran la distribución por sexo (a) y por edades (b) de los distintos grupos control (izquierda), pacientes *de novo* diagnosticados (centro) y celíacos en DSG (derecha) involucrados en el estudio de la mucosa oral. (c) La línea temporal muestra los años transcurridos desde el inicio del tratamiento con DSG en los pacientes celíacos y en el momento de la toma de la biopsia. Las cruces naranjas representan cada uno de los pacientes, la cruz roja representa la media. (e) Manifestaciones clínicas de los pacientes celíacos recogidas en el momento de diagnóstico de la enfermedad. DSG: Dieta Sin Gluten, \bar{x} = media, s = desviación estándar.

Tabla 7. Información detallada de los pacientes celíacos del estudio.

	Edad	Sexo	Serología		Tiempo desde DSG	Genotipo	Manifestaciones Clínicas	Otras enfermedades	Clasificación Marsh	Respuesta a DSG
			IgA Total (mg/dL)	IgA Anti-tTG2 (kU/L)		DQ2				
De novo	42	F	143	158	-	+	DH	V	3b	
	64	F	80	12	-	+	DH, DIS	-	3b	
	64	F	253	18,3	-	+	D, PP, N	HP	3b	
	25	F	<5*	26,1	-	+	DA, DH, RC	AS, ER	3a	
	62	M	370	45,7	-	+	AN, SGI	HT	3b	
	49	F	149	657	-	+	DIS, D/EST	-	3a	
DSG	48	F	133	>125/5	6a 9m	+	AN, DIS, DH	-	3c	+
	67	F	133	152/<5	20a	+	D, PP	HTI, FM, DE	3a	+
	26	F	152	>300/<5	1a 1m	+	DA, PP	-	3b	+
	38	F	277	41,2/?<5	12a 5m	+	AN, D	-	3b	+
	54	F	222	1,2	2a	+	B12, DH	VE, DE, GA	3a	+
	54	F	284	>300/9.8	1a 6m	+	DA, D/EST, VO	-	3b	+
	53	M	266	93/<5	1a 2m	+	DA	-	3b	+

M/F: masculino/femenino. a/m: años/meses. AN: anemia, AS: alergia a sulfamidas, B12: déficit de B12, DA: dolor abdominal, DE: depresión, D: diarrea, DH: déficit de hierro, DIS: dispepsia, ER: enfermedad reumática, EST: estreñimiento, FM: fibromialgia, GA: gastritis autoinmune, HP: *Helicobacter pylori*, HTI: hipotiroidismo, HT: hipertensión, N: náusea, PP: pérdida de peso, RC: rectorragia, SGI: sangrado gastrointestinal, V: vitíligo, VE: vértigo, VO: vómito. DSG: Dieta Sin Gluten.

2. Análisis descriptivo preliminar de la mucosa oral

Todas las biopsias de mucosa oral fueron teñidas con H-E para asegurar la correcta orientación, la ausencia de artefactos y la adecuada toma de la muestra.

Se comprobó la disposición correcta del corte asegurando observar en todo caso adecuadamente el tejido epitelial y el tejido conjuntivo suficiente para el análisis. Además, para garantizar que la biopsia fuera tomada con la profundidad adecuada, se debía observar el tejido muscular subyacente (**Figura 29**).

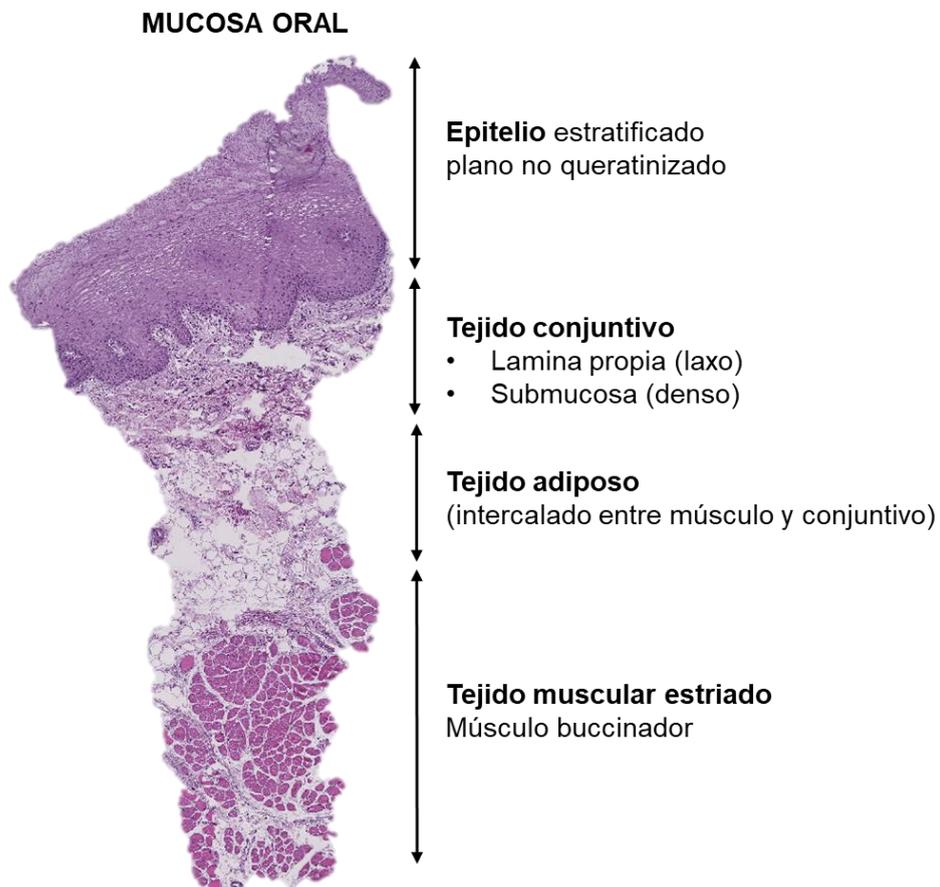


Figura 29. Análisis descriptivo de la mucosa oral tras biopsia por punción con sacabocados. Hematoxilina-eosina representativa de las biopsias orales tomadas con la técnica de sacabocados o “punch”. Se observa con detalle el epitelio, conjuntivo (lamina propia), profundizando la biopsia hasta la capa de tejido muscular subyacente. Imagen capturada a 30x aumentos.

3. Integridad de las uniones intercelulares en biopsias de mucosa oral de pacientes celíacos

3.1. Inmunohistoquímica de las uniones intercelulares

Los niveles de expresión de las proteínas asociadas a uniones intercelulares fueron estudiados empleando IHQ en las secciones histológicas de la mucosa oral. Todas las muestras EPFF fueron teñidas con anticuerpos anti-occludina y anti-claudina-1, miembros de la familia de las uniones intercelulares estrechas, además de con anticuerpos anti-E-cadherina miembro de las uniones adherentes.

Se encontró una disminución significativa en la expresión de E-cadherina para ambos grupos de pacientes celíacos: diagnosticados *de novo* ($-20,34 \pm 5,30\%$, $p < 0,01$) y pacientes en DSG ($-20,58 \pm 5,08\%$, $p < 0,01$) al compararlo con el grupo control **Figura 30 a, b**.

La expresión de claudina-1 también apareció significativamente disminuida en ambos grupos de pacientes celíacos al compararlo con el control (*de novo* diagnosticado $-12,97 \pm 2,99\%$, $p < 0,01$ y DSG $-11,81 \pm 2,99\%$) (**Figura 30 c, d**). Sin embargo, para la ocludina se observó únicamente una tendencia no significativa (**Figura 30 e, f**).

3.2. Expresión génica de las uniones intercelulares

Los niveles de expresión de las uniones intercelulares fueron también evaluados a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para las proteínas de unión epitelial ocludina y PPL, ésta última es un miembro de la familia de los desmosomas.

Según el método $-2\Delta\Delta Ct$ que cuantifica la expresión relativa de ARNm con respecto al grupo control se encontró un aumento significativo en la expresión de ARNm en pacientes en DSG tanto para la ocludina (cambio relativo de ARNm $+0,62 \pm 0,20$, $p < 0,05$) como para la PPL (cambio relativo de ARNm $+1,26 \pm 0,41$, $p < 0,05$) con respecto al grupo de pacientes *de novo* diagnosticados. Es decir, en los pacientes celíacos la expresión de

ARNm para estas proteínas intercelulares aumentó en la mucosa oral al retirar el gluten de la dieta (**Figura 30 g, h**).

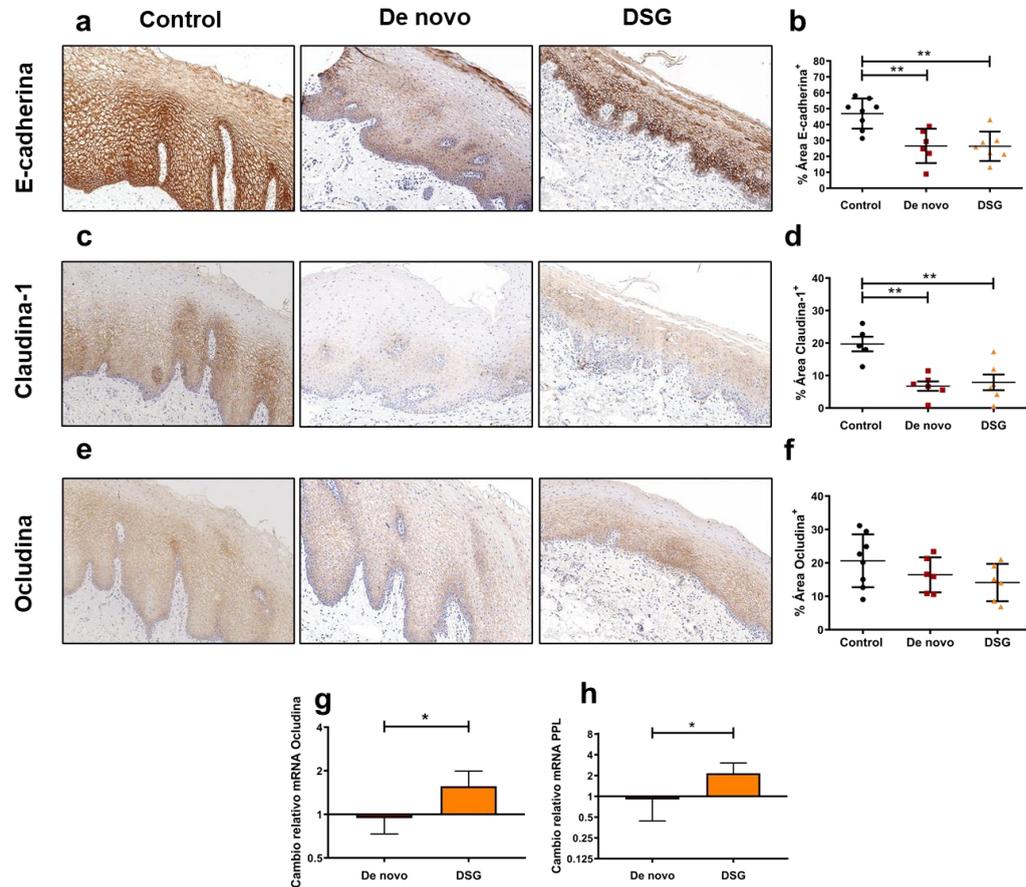


Figura 30. Cuantificación inmunohistoquímica y expresión de ARNm de las uniones intercelulares en la mucosa oral de pacientes celíacos y controles. Imágenes representativas y cuantificación de la IHQ de las secciones de mucosa oral tratadas mediante EPFF para e-cadherina (a, b), claudina-1 (c, d), y ocludina (e, f) de pacientes celíacos de novo diagnosticados (n=6), en DSG (n=7) y sujetos control (n=8). Las imágenes aparecen capturadas a un aumento de 8x. La cuantificación se expresa como porcentaje de área teñida con DAB respecto al total del epitelio (b, d, f). Los gráficos de dispersión muestran la media ± DE, * p<0,05, **p<0,01. El cambio relativo en la expresión de ARNm para ocludina (g) y periplaquina (PPL) (h) en la mucosa oral aparece referido a los sujetos no celíacos (control) empleando el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los datos fueron normalizados empleando dos genes de expresión constitutiva (GADPH y b-actina). Los gráficos de barras expresan la media ± DE, *p<0,05.

4. Respuesta inmune desarrollada en la mucosa oral de pacientes celíacos

4.1. Infiltrado linfocitario: CD3, CD4 y CD8

Las biopsias de mucosa oral fueron teñidas con distintos marcadores generales para los linfocitos T: CD3, CD4 (linfocitos Th) y CD8 (linfocitos T citotóxicos) (**Figura 31 a**).

Entre todos los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas en los contajes absolutos para ninguno de los marcadores de linfocitos T, ni para los localizados en el epitelio, ni en lamina propia (**Figura 31 b**).

Sin embargo, cuando se evaluó la localización preferente de las células en el tejido sí se observaron diferencias significativas. El porcentaje de células CD3+ localizadas en el epitelio con respecto al total de células CD3+ en la mucosa fue menor en los pacientes en DSG que en el grupo control ($-15,60 \pm 5,86\%$, $p < 0,05$) o diagnosticados *de novo* ($-20,32 \pm 6,30\%$, $p < 0,05$) (**Figura 31 c izquierda**). Es decir, al retirar el gluten de la dieta, el porcentaje de células CD3+ localizadas preferentemente en el epitelio disminuye, incluso con respecto al grupo control. La presencia proporcional de CD4+ en el epitelio también fue significativamente menor en los pacientes en DSG, pero en este caso, únicamente con respecto a los sujetos control ($-28,91 \pm 7,27$, $p < 0,01$) (**Figura 31 c centro**). No se observaron estas diferencias para el grupo de linfocitos T citotóxicos CD8+ (**Figura 31 c derecha**).

La proporción de linfocitos con RCT- $\gamma\delta$ entre los localizados en la mucosa oral fue despreciable (**Figura 32 a**).

4.2. Infiltrado de linfocitos T reguladores (Treg)

Para el estudio de células T reguladoras se utilizó IHQ frente a FoxP3+.

En cuanto a la localización de estas células en el tejido, los contejes de células FoxP3+ en el epitelio fueron despreciables en la mayoría de los casos, localizándose preferentemente en el tejido conjuntivo subyacente (Figura 33 b).

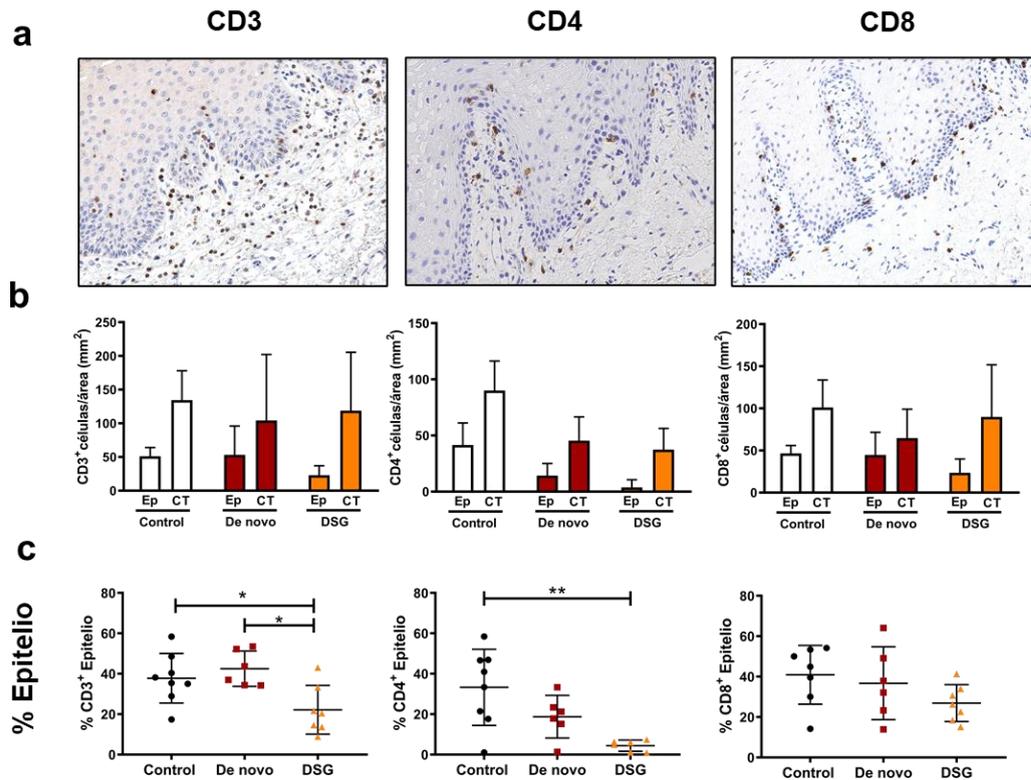


Figura 31: Cuantificación de las linfocitos T CD3, CD4 y CD8 en pacientes celíacos y sujetos control. (a) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para CD3 (izquierda), CD4 (centro) y CD8 (derecha). Las imágenes fueron capturadas a un aumento de 15x. Contajes absolutos en epitelio (Ep) y lamina propia (Ct). Frecuencia relativa de células en el epitelio con respecto al total en el tejido (%) (d) para células CD3+ (izquierda), CD4+ (centro) y CD8+ (derecha) de pacientes no celíacos (control) (n=8), pacientes celíacos *de novo* diagnosticados (n=6) y en DSG (N=7). Los gráficos de dispersión muestran media \pm DE * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

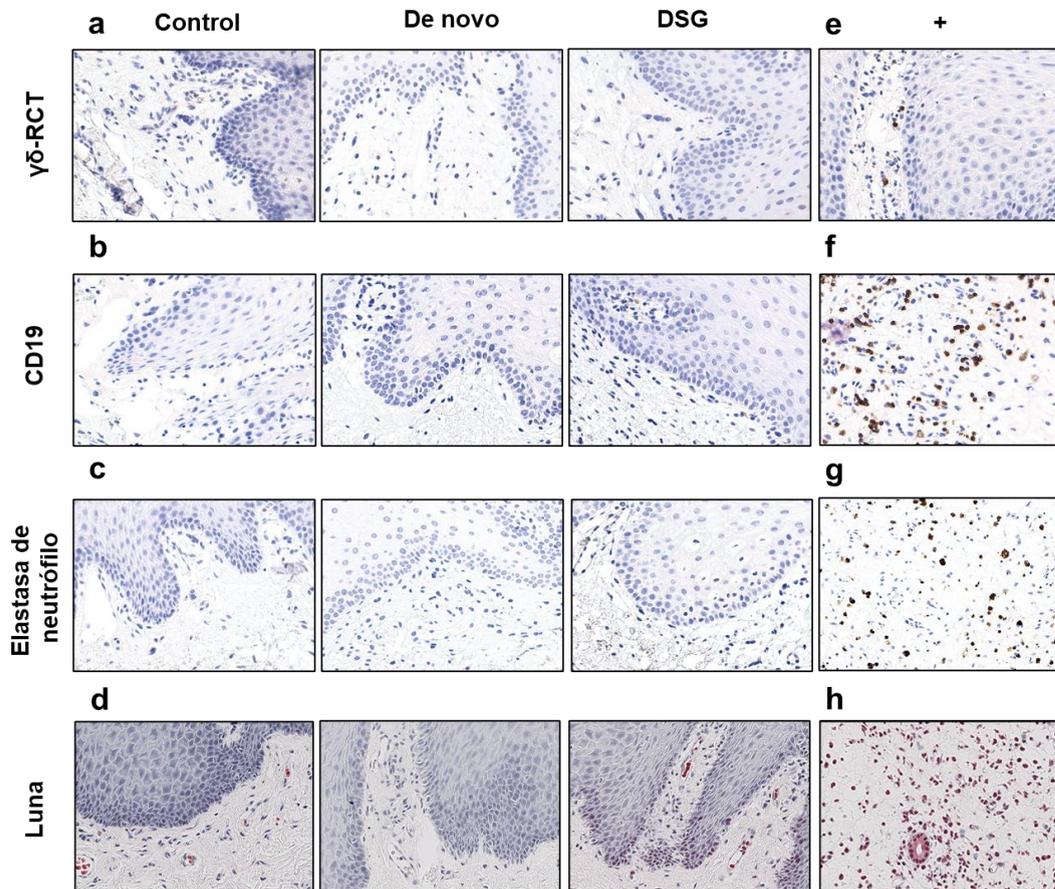


Figura 32. Histoquímica e inmunohistoquímica para células T $\gamma\delta$, linfocitos B, neutrófilos y eosinófilos en la mucosa oral de pacientes celíacos y sujetos control. Imágenes representativas para las tinciones frente a $\gamma\delta$ -RCT (a), CD19 (linfocitos b) (b), elastasa de neutrófilos (c) y luna (eosinófilos) (d). No aparece señal DAB en la mucosa oral para ninguno de los marcadores de linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos B o neutrófilos (a-c). En la tinción de luna el rosa característico aparece únicamente en los capilares sanguíneos, no se observan eosinófilos en el tejido (d). Mucosa oral de pacientes con dermatitis atópica como control positivo para los linfocitos T $\gamma\delta$ (e). Biopsias de pólipos nasales como control positivo para CD-19 (f), elastasa de neutrófilo (g) y eosinófilos (h). Todas las imágenes fueron capturadas a 150x aumentos.

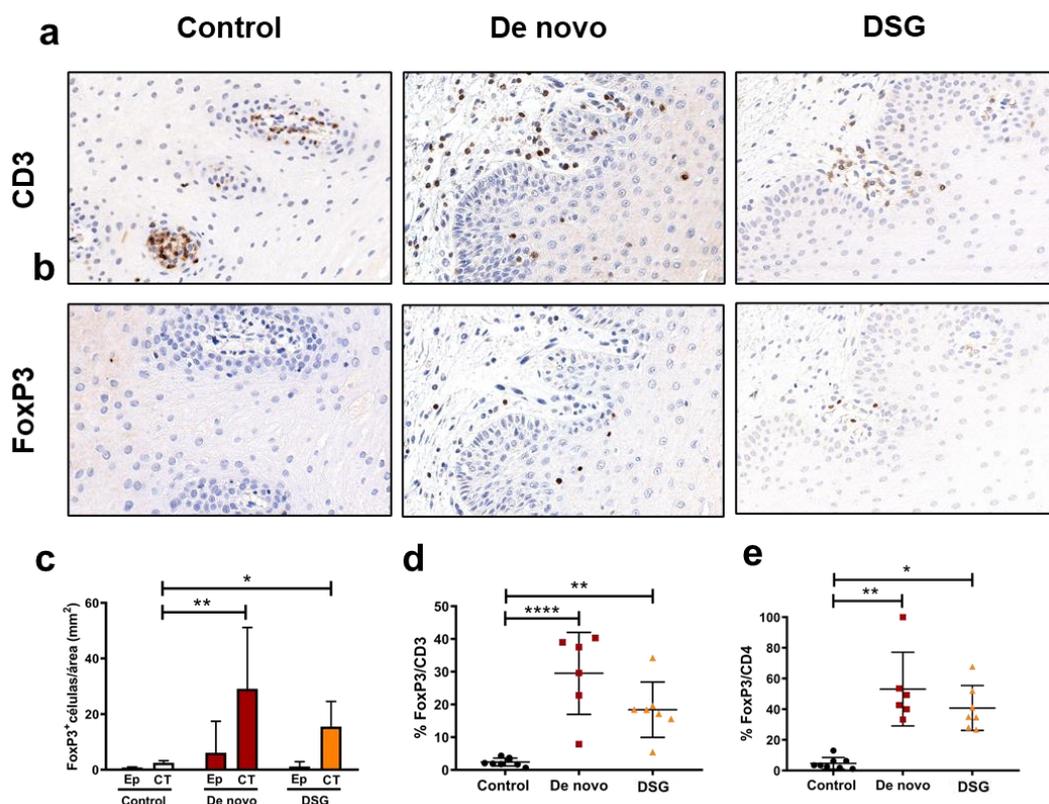


Figura 33. Cuantificación de células T reguladoras en la mucosa oral de pacientes celíacos y sujetos control. Imágenes representativas de la tinción para CD3 (a) y FoxP3 (b) en secciones de mucosa oral tratadas con EPFF para sujetos no celíacos (control) (n=8), y pacientes celíacos diagnosticados de novo (n=6) y en DSG (n=7). Contajes absolutos de células FoxP3+ en el tejido epitelial (Ep) y el tejido conjuntivo (CT) (c). La cuantificación se expresa como células contadas por área (mm²) total de mucosa. Porcentaje de FoxP3 en relación con el total de células CD3+ (d) o CD4+ (e) para el total de la mucosa. Imágenes tomadas a 200x aumentos. Los gráficos de dispersión expresan la media ± DE *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Los números absolutos de células FoxP3+ en toda la mucosa fueron significativamente mayores en el tejido conjuntivo (**Figura 33 c**) y en el total de la mucosa de ambos grupos de pacientes celíacos *de novo* diagnosticados (+11,54 células/mm², p < 0,001) y DSG (+9,00%, p < 0,05) comparado con el grupo control.

Sin embargo, los contajes absolutos no son representativos si no se relativizan frente al número total de linfocitos, por esta razón la población de Treg fue también evaluada con respecto al total de CD3+ y CD4+. El

ratio FoxP3+/CD4+ también estaba incrementado en ambos grupos de pacientes celíacos *de novo* diagnosticados (+11,00%, $p < 0,01$) y DSG (+9,00%, $p < 0,05$) con respecto al control (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. e). El ratio FoxP3+/CD3+ siguió un patrón similar al anterior, encontrándose también incrementado en el grupo *de novo* (+27,11 \pm 4,58%, $p < 0,0001$) y DSG (+16,01 \pm 4,58%, $p < 0,01$) con respecto a los controles (**Figura 33 d**). Según estos resultados, los números de células T reguladoras están aumentados en la mucosa oral de pacientes celíacos independientemente de la exposición a gluten.

4.3. Infiltrado células presentadoras de antígeno, linfocitos B, neutrófilos y eosinófilos.

Las muestras se tiñeron con anticuerpos frente a los marcadores de células presentadoras de antígenos CD11c y langerina. Como se había observado previamente en el estudio en alergia y según lo descrito en la literatura, la mayoría de las células CD11c+ se concentraron en el conjuntivo, mientras que la mayoría de las células langerina+ aparecieron preferentemente en el epitelio (**Figura 34 a, c**). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos para ninguna de las dos poblaciones celulares (**Figura 34 b, d**).

También se estudiaron otras poblaciones celulares minoritarias en la mucosa oral. Las tinciones anti-CD19, anti-elastasa de neutrófilo y la tinción de Luna revelaron la ausencia de linfocitos B, baja presencia de neutrófilos y ausencia de eosinófilos, respectivamente, en la mucosa bucal (**Figura 32 b-d**).

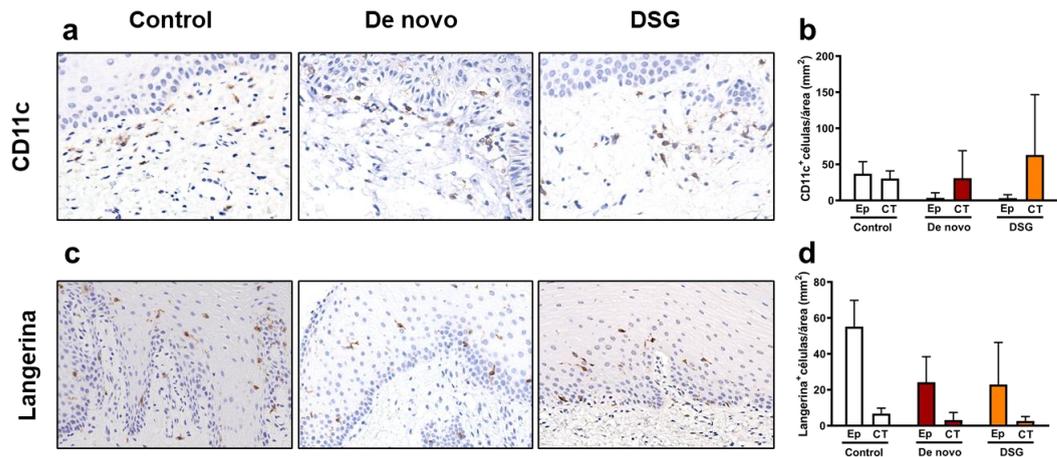


Figura 34. Cuantificación de las células presentadoras de antígeno (CPAs) en la mucosa oral de los pacientes celíacos y sujetos control. Imágenes representativas de la IHQ frente a (a) CD11c y (c) langerina en secciones de mucosa oral EPFF para los diferentes grupos experimentales. Contajes de CD11c (c) y langerina (d) en el epitelio (Ep) y lamina propia (CT) de la mucosa de los sujetos control (n=8), los pacientes celíacos *de novo* diagnosticados (n=6) y en DSG (n=7). La cuantificación se expresa como número de células por área total de mucosa (mm²). Las imágenes fueron capturadas a 200x aumentos. Los gráficos de dispersión muestran media ± DE.

5. Correlaciones entre infiltrado, daño tisular y anfirregulina

5.1. Correlación entre infiltrado y daño tisular.

Para determinar si el reclutamiento de infiltrado a la mucosa oral presentaba relación con el daño tisular, se evaluó la correlación entre ambos parámetros.

Se encontró una correlación positiva significativa entre la expresión de E-cadherina y langerina en el epitelio oral, es decir, a mayor daño en el epitelio (menor expresión de E-cadherina), menor número de células de Langerhans presentes en el epitelio ($r = +0,57$, $p < 0,01$) para todos los grupos experimentales (**Figura 35 a**). Al contrario, la E-cadherina se correlacionó negativamente con los contajes de células FoxP3+ ($r = -0,65$, $p < 0,01$), es decir, a mayor daño en el epitelio (menor expresión de E-cadherina), mayor número de células Treg infiltradas en la mucosa oral (**Figura 35 b**).

5.2. Correlación entre Treg y anfirregulina

Al examinar la expresión de ARNm en las células mononucleares de sangre periférica (población que incluye las Treg periféricas) se observó que el reclutamiento de Treg en la mucosa oral se correlacionaba positivamente con la expresión de anfirregulina en las CMSP, es decir, a mayor presencia de Treg en la mucosa oral, mayor era la expresión de anfirregulina en sangre periférica ($r = 0,61$, $p < 0,05$) (**Figura 35 c**).

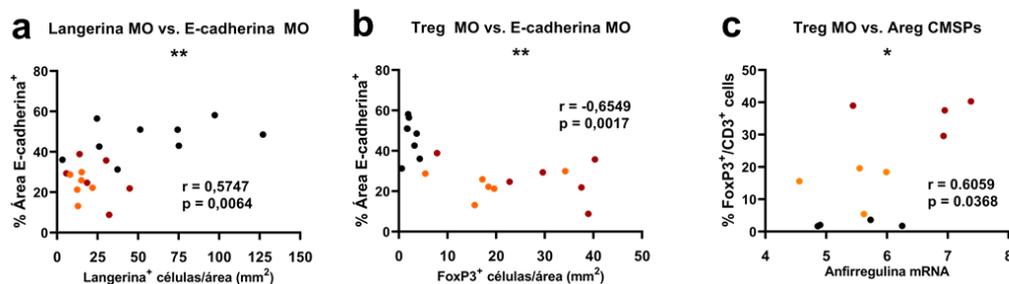


Figura 35. Correlaciones significativas entre el infiltrado, daño tisular y CMSPs en pacientes celíacos y sujetos control. Correlación de Spearman significativa entre la expresión de la proteína epitelial E-cadherina frente a la expresión Langerina (a) y frente a la frecuencia de células Treg FoxP3+ (b) en la mucosa oral (MO). Correlación de Spearman significativa entre la frecuencia de células Treg FoxP3+ en la mucosa oral y la expresión de anfirregulina (Areg) en CMSPs (c). Los puntos rojos representan los pacientes *de novo* diagnosticados, los puntos naranjas los pacientes celíacos en DSG y los puntos negros los sujetos no celíacos (control). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6. Expresión génica de marcadores asociados a EC en la mucosa oral

En las biopsias embebidas en RNALater®, cuyo ARN se extrajo para RT-cRCP, se estudió si los factores tradicionalmente asociados a los LIEs y a la inflamación característica de EC en el intestino también eran relevantes en la mucosa oral de los pacientes celíacos.

Se determinaron los niveles de IL15, IL15RA, IFN γ y perforina en las biopsias orales. En contra de lo esperado, todos estos transcritos tendieron a disminuir en los pacientes con EC al comparar con los controles (**Figura 36 a-d**), siendo este descenso estadísticamente significativo para IL-15 en

el grupo *de novo* diagnosticado (cambio relativo de ARNm $0,55 \pm 0,20$, $p < 0,05$) y en DSG (cambio relativo de $0,71 \pm 0,19$, $p < 0,01$) (**Figura 36 a**) y para la expresión de IFN- γ en los pacientes en DSG (cambio relativo de ARNm $1,51 \pm 0,55$, $p < 0,05$) al comparar con el grupo de sujetos control (**Figura 36 c**).

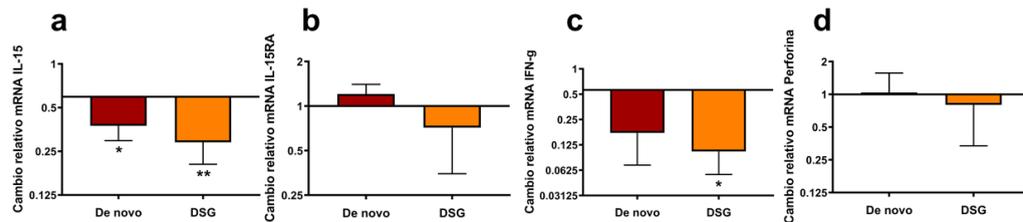


Figura 36. Expresión ARNm de marcadores de EC en la mucosa oral de pacientes celíacos. Cambio relativo en los niveles de ARNm en pacientes de novo diagnosticados (n=6) y en DSG (n=7) para IL-15 (**a**), IL-15R α (**b**), IFN γ (**c**) y perforina (**d**) con respecto al grupo control empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos fueron normalizados empleando dos genes de expresión constitutiva (GAPDH y β -actina). Los gráficos de barras muestran media \pm DE * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

7. Expresión génica de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral y a nivel sistémico

Para examinar posibles marcadores de remodelado se determinaron los niveles de alarminas epiteliales tanto en las biopsias de mucosa oral como a nivel sistémico en el plasma de los sujetos del estudio.

7.1. Expresión génica de marcadores de remodelado epitelial en la mucosa oral

En la mucosa oral no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de ninguna de las alarminas: IL-33, LPET o periostina (*POSTN*) entre ninguno de los grupos experimentales (**Figura 37 a-c**). Estos genes no se expresan diferencialmente a nivel local en la mucosa oral.

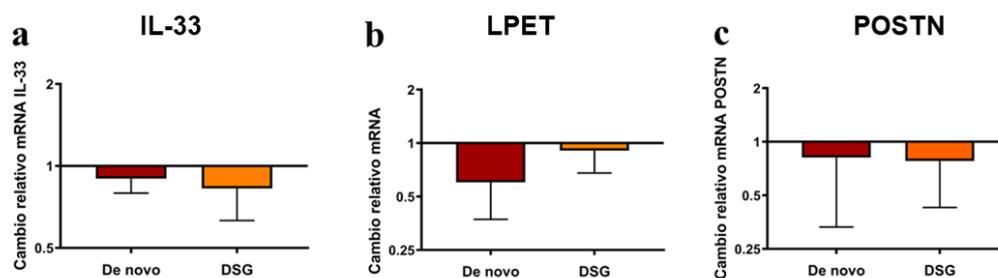


Figura 37. Expresión ARNm de marcadores de daño epitelial en la mucosa oral de pacientes celíacos. Cambio relativo en los niveles de ARNm en pacientes *de novo* diagnosticados (n=6) y en DSG (n=7) para IL-33 (a), LPET (b) y POSTN (c) con respecto al grupo control empleando el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los datos fueron normalizados empleando dos genes de expresión constitutiva (GAPDH y β -actina). Los gráficos de barras muestran media \pm DE.

7.2. Niveles sistémicos de citoquinas asociadas al remodelado epitelial

Al examinar los niveles plasmáticos mediante EILE sí se encontraron diferencias significativas.

Tanto los pacientes *de novo* diagnosticados ($+26,78 \pm 10,21$ pg/ml, $p < 0,05$) como los pacientes en DSG ($+27,53 \pm 9,30$ pg/ml, $p < 0,05$) mostraron un incremento en el nivel de IL-33 comparado con los controles no celíacos (**Figura 38 a**). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los dos grupos de pacientes celíacos.

Para las otras alarminas evaluadas, IL-25 o LPET, no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos experimentales, aunque se observó una tendencia al alza para los niveles plasmáticos de LPET en ambos grupos de pacientes celíacos comparado con el control ($p = 0,059$) (**Figura 38 b, c**).

También se determinaron los niveles de FAP, ya que como se ha discutido previamente, es capaz de inducir la liberación de IL-33. No se hallaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales ($p = 0,09$), aunque estos niveles de FAP tendieron a ser más elevados en el grupo *de novo* diagnosticado cuando se comparó con el

grupo en DGS ($p=0.09$) (Figura 38 d).

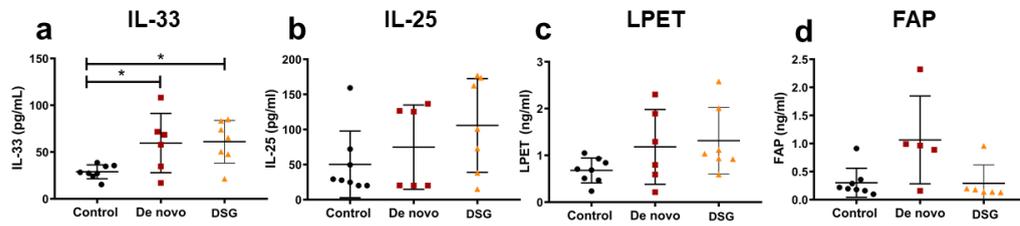


Figura 38. Niveles de alarminas epiteliales en plasma medidos por EILE en pacientes con EC y sujetos control. Niveles proteicos de IL-33 (a), IL-25 (b), LPET (c) y FAP (d) en el plasma de sujetos no celiacos ($n=8$), celiacos de novo diagnosticados ($n=6$) y pacientes en DSG ($n=7$). Los gráficos de dispersión se expresan como media \pm DE. * $p<0.05$.

Discusión

En esta tesis se describe la alteración de la barrera epitelial bucal en pacientes con alergia respiratoria grave a polen de olivo y a ácaros sin alergia alimentaria concomitante, y en pacientes celíacos. En ambas enfermedades el remodelado epitelial se produce en ausencia de un incremento notable del infiltrado inmune, exceptuando un aumento significativo de la población de células Treg. Al mismo tiempo, estos pacientes presentan altos niveles de alarminas epiteliales a nivel sistémico, las cuales podrían explicar el remodelado observado en la mucosa.

La alergia respiratoria es la más común a nivel mundial. Los estudios en Europa demuestran que en torno a un 30% de la población sufre de rinoconjuntivitis alérgica. De este porcentaje, el 20% de ellos padece además asma. Este grupo de enfermedades alérgicas está caracterizado por la respuesta inmune aberrante a aeroalérgenos inhalados (175). La prevalencia de los aeroalérgenos varía en diferentes regiones dependiendo del exposoma de cada zona. Los pacientes alérgicos al polen de gramíneas residentes en áreas de alta exposición están frecuentemente sensibilizados al pan-alérgeno profilina, el cual induce un síndrome de alergia oral, conocido como el síndrome polen-frutas (176). Estos pacientes presentan un importante remodelado de la mucosa oral (128) asociado a una huella metabólica y transcriptómica particular (177). Este remodelado podría ser consecuencia de la alergia respiratoria a gramíneas, y podría, por tanto, observarse en otro tipo de alergias respiratorias graves a otros tipos de aeroalérgenos como el polen de olivo o los ácaros.

Si el remodelado o alteración de la barrera epitelial es un proceso común, no sólo en enfermedades alérgicas, sino también en otros procesos inflamatorios (178–181), la mucosa oral podría experimentar remodelado en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la EC. La enfermedad celíaca se manifiesta como una enteropatía autoinmune crónica desencadenada por la ingesta de gluten. Como tal, la respuesta inmune en

la mucosa intestinal ha sido profundamente investigada (182,183). Sin embargo, es bien sabido que la EC puede presentarse en formas atípicas con manifestaciones extraintestinales, incluyendo aquellas que afectan a la mucosa oral (153,154). Sin embargo, la mayoría de los estudios que examinan la histopatología de la mucosa oral en pacientes celíacos no han obtenido resultados consensuados (155). De la misma forma que ocurre un daño en la mucosa del intestino (184), este remodelado se podría extender a otros tejidos.

Una barrera oral intacta y funcional es crucial para mantener la homeostasis ya que protege al sistema inmune de la mucosa oral de la exposición persistente a estímulos nocivos activadores de la respuesta inmune (90). En el presente estudio, hemos encontrado que la expresión de proteínas de las uniones intercelulares epiteliales, tales como la e-cadherina, la ocludina y la claudina-1, se encuentra disminuida en el epitelio bucal de los pacientes alérgicos y celíacos, incluso cuando los alérgicos no presentan alergia alimentaria concomitante y los celíacos mantienen al menos 1 año de tratamiento siguiendo una DSG (**Tabla 8**).

Este es el primer estudio que describe una mucosa oral alterada en pacientes con alergia respiratoria en ausencia de alergia alimentaria. Una barrera oral dañada podría ser indicativa de un daño sistémico de las barreras epiteliales y ser responsable de la progresión a alergia alimentaria observada en los pacientes con alergia respiratoria grave, cuando la mucosa oral afectada entra en contacto directo con un alérgeno alimentario (128). De hecho, en el modelo de alérgicos a gramíneas con alergia concomitante a profilinas, los pacientes con reacciones alérgicas graves presentaron basófilos reactivos a una concentración de alérgeno significativamente menor a la de aquellos con menor remodelado y reacciones alérgicas moderadas. Además, se observó una correlación significativa entre el descenso en la expresión de ocludina en el epitelio oral y el aumento de sensibilidad de los basófilos a profilina (128). Éste podría ser el caso para otras alergias alimentarias asociadas con sensibilizaciones respiratorias previas (síndrome polen-frutas: profilina, PR10 o PTLs) (185).

Los daños observados en la barrera oral de los pacientes celíacos podrían ser responsables de la aparición de las ya mencionadas manifestaciones extraintestinales en la cavidad oral, como las úlceras aftosas, incluso tras la DSG (186). El daño en la mucosa oral de pacientes en DSG ha sido anteriormente establecido (153,187). Se ha especulado que el remodelado de la mucosa en pacientes que siguen una DSG no es necesariamente consecuencia de la falta de adherencia a la dieta, sino una respuesta tardía consecuencia de una estimulación inmunológica crónica y de la generación de linfocitos T de memoria (187). Sin embargo, tras la evitación del gluten, los niveles de ARNm para ocludina y PPL (una proteína expresada en los desmosomas) (188) aparecen aumentados. Estos resultados sugieren que la eliminación del gluten de la dieta sí tiene un poder reparador en la mucosa oral.

En el caso de los pacientes alérgicos, también se estudió la **fibrosis** subepitelial del tejido oral, ya que la aparición de fibrosis ha sido previamente asociada a daño en el tejido oral y de la vía respiratoria (127,128). De la misma manera que ocurría en pacientes alérgicos graves a gramíneas (128), observamos un aumento de la deposición de fibras de colágeno en ambos grupos de pacientes alérgicos al polen de olivo y a ácaros (**Tabla 8**). Una afección de la barrera epitelial acompañada de una fibrosis subepitelial sugiere que se está produciendo un remodelado extensivo en los fenotipos de alergia grave asociada a olivo y a ácaros y que este remodelado se produce en ausencia de exposición local.

En la literatura, se ha descrito un aumento de la **angiogénesis** en la mucosa oral de pacientes con patologías inflamatorias (128,189). En contraste con lo observado en pacientes alérgicos graves a gramíneas y profilina (128), no se encontró un aumento significativo del FCEVa en los pacientes alérgicos a olivo y a ácaros a nivel local (**Tabla 8**); sin embargo, sí se encontró un aumento significativo de FCEVa a nivel sistémico. Además, al cuantificar la densidad de capilares sanguíneos en la mucosa, se observó un aumento del número de capilares en los pacientes alérgicos a ácaros (**Tabla 8**). La exploración de la angiogénesis en los pacientes

celiacos puede tener menor importancia. Esto es debido a que en estos pacientes se ha observado que la vasculatura de las mucosas se encuentra desorganizada (132), y es que aparecen en esta enfermedad determinadas proteínas como los anticuerpos anti-TG2 que son capaces de interrumpir la angiogénesis al afectar múltiples pasos del proceso angiogénico (132,133).

En esta tesis también se analizó el infiltrado inmune en la mucosa oral en todos los grupos. No encontramos un incremento significativo en el conteo absoluto de ninguno de los principales grupos de **linfocitos T o CPAs** ni en los pacientes alérgicos, ni en los pacientes celiacos (**Tabla 9**).

A diferencia de lo observado en los alérgicos a gramíneas con alergia alimentaria a profilina, en lugar de un incremento en las células CD11c+ (128), se observó un descenso en los conteos CD11c+ en los pacientes alérgicos a olivo. Además, en los pacientes alérgicos a ácaros se halló un descenso en los conteos CD4+. Los pacientes sensibilizados a profilina presentan una exposición local continua a profilina en la mucosa oral debida a la infesta de alimentos vegetales (161), la cual podría ser responsable de los cambios observados en el infiltrado inflamatorio y de la co-localización CPA-CD4 observada en estos pacientes (128). Sin embargo, en el caso de los pacientes alérgicos a olivo y a ácaros no se produce una exposición local, o esta se produce de manera esporádica en el caso de los pacientes alérgicos a ácaros. La exposición a estos aeroalérgenos se produce por vía respiratoria, donde se localizarán preferentemente estos tipos celulares (190).

En pacientes celiacos, aunque se ha demostrado que la mucosa oral de estos pacientes es capaz de reaccionar a la provocación con gliadina incrementando el número de linfocitos (191), no hay estudios consensuados que caractericen los cambios en el infiltrado en la mucosa oral (153,155,160,192). El estudio llevado a cabo por Bardellini et al. describe un aumento en el número de CD3 en las papilas estromales de pacientes celiacos con enfermedad activa que disminuye tras evitar el gluten (153). Aunque nosotros no pudimos observar cambio en el conteo

absoluto de células, sí encontramos que la evitación del gluten, además de aumentar la producción de ocludina y PPL, reduce la abundancia relativa de linfocitos en el epitelio (**Tabla 9**). Esto podría contribuir a disminuir el avance del daño en el epitelio. Además, de acuerdo con lo observado por Lahteenoja et al. (187), nuestro estudio ha ayudado a confirmar que la mayoría de los LIEs encontrados en el epitelio oral carecen del RCT $\gamma\delta$. Aunque sean importantes en la mucosa intestinal, este estudio descarta un papel relevante de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la patogénesis oral de la enfermedad celiaca. Sin embargo, la mucosa de la encía parece comportarse diferente, Krishnan S et al. (193) sí encontraron una alta presencia de linfocitos $\gamma\delta$ en la encía de un modelo de ratón de EP (193). Estas células, además, producían anfirregulina para garantizar la homeostasis tisular (193).

Aunque en los pacientes celíacos tampoco encontramos cambios en las **CPAs**, las células de Langerhans se correlacionaron inversamente con el daño epitelial. Este resultado apoya al ya descrito papel tolerogénico de las células de Langerhans en la mucosa oral (194).

Curiosamente, la población de **linfocitos T reguladores** estaba notablemente aumentada en la mucosa oral de los pacientes alérgicos a ácaros y de los pacientes celíacos (**Tabla 9**). En el caso de los pacientes alérgicos, Morita et al. han descrito que los mastocitos estimulados por IL-33 son capaces de aumentar la expansión de Treg en un modelo de ratón de alergia a papaína (118). En este modelo, la IL-2 producida por los mastocitos estimulados por IL-33 indujo la expansión de los linfocitos Treg suprimiendo la inflamación de la vía aérea estimulada por la papaína. Los linfocitos Treg contribuyen a la homeostasis tisular al promover procesos de cura y reparación. Los estudios sobre Treg en pacientes celíacos han demostrado que pueden tener su función supresora dañada (195,196). La IL-15, una citoquina clave en la EC (197) parece tener un papel relevante en la supresión de las Treg (197–199). En la presente tesis, no encontramos un aumento de la expresión de IL-15 en la mucosa oral, pero si observamos que la cantidad de Treg en la mucosa oral se correlacionaba

inversamente con la expresión de E-cadherina, es decir, cuanta menor expresión de E-cadherina (señal de daño epitelial), mayor número de Treg en la mucosa. Por todo esto, la hipótesis planteada es que los linfocitos Treg observados en pacientes alérgicos a ácaros y celíacos tienen un fenotipo “reparador” y son reclutados para proteger frente a un mayor daño de la barrera y así mantener la integridad (119). De hecho, en pacientes celíacos, hemos descrito una correlación positiva entre el número de Treg y la expresión de anfirregulina, un factor reparador, en sangre periférica. La expresión de anfirregulina periférica ha sido previamente asociada a características reparadoras o de remodelado en otras enfermedades como la bronquiolitis vírica (200). Los linfocitos Th2 de memoria en las vías aéreas productoras de anfirregulina eran capaces de controlar la fibrosis de la vía respiratoria inducida por la estimulación inflamatoria crónica (201). Además, en modelos murinos de enfermedad de injerto contra huésped, se ha descrito que la anfirregulina restablece la integridad de la mucosa intestinal (202). En este estudio Holtan S et al. reclasificaron los pacientes dentro de los grupos de riesgo según sus niveles de anfirregulina circulante, así consiguieron refinar su asociación con el riesgo clínico (202). Nosotros proponemos que la anfirregulina circulante también puede ser útil en el diagnóstico de la EC y puede ayudar a establecer una clasificación alternativa al Marsh, que podría evitar la toma de una biopsia intestinal. Sin embargo, la determinación de anfirregulina y de los fenotipos Treg en la mucosa oral requieren mayor estudio para obtener conclusiones sólidas.

Moutsopoulos et al., han descrito a los **neutrófilos** como los “porteros” de la inmunidad oral. Pueden encontrarse en la cavidad oral con distintos niveles de activación y funcionalidad en función de la presencia de inflamación local. En pacientes con defectos en los neutrófilos, una respuesta IL-17/Th17 desregulada puede conducir a una inmunopatología (77). Sin embargo, aunque la infiltración de neutrófilos puede tener un papel muy importante en la encía, nosotros no encontramos presencia de neutrófilos extravasados en el tejido, ni en controles sanos, ni en los pacientes alérgicos, ni en los pacientes celíacos (**Tabla 9**). Apoyándonos

en éstos y en otros resultados (85), podemos concluir que su papel en la mucosa bucal es limitado. En cuanto a los **eosinófilos**, existe evidencia limitada de que residan en la cavidad oral (77,85), y nosotros tampoco encontramos presencia de éstos en ninguno de los grupos experimentales, ni siquiera en pacientes alérgicos donde la presencia de eosinófilos en las vías respiratorias es de notable importancia (203).

Las **células plasmáticas** han sido identificadas como las células mayoritarias que expresan ALH unido al gluten en el intestino de pacientes con enfermedad celiaca (204). Por esta razón nosotros investigamos si los linfocitos B eran abundantes en la mucosa oral de los pacientes celiacos. Sorprendentemente, nuestro estudio reveló ausencia de linfocitos B en la mucosa oral de cualquiera de los grupos estudiados.

Al tener acceso a **ARN de biopsias de mucosa oral** en el caso de los pacientes celiacos, fuimos capaces de determinar los niveles de distintos marcadores inflamatorios en el tejido oral. Una pregunta importante que quisimos contestar era si los mecanismos de inmunopatogénesis observados en la mucosa intestinal de los pacientes celiacos también aparecían en la mucosa oral de estos pacientes. Esto puede ser relevante ya que dos estudios han sido capaces de determinar la capacidad de la mucosa oral de los pacientes celiacos sin tratamiento para producir autoanticuerpos asociados a EC (205,206). En nuestro estudio, determinamos la expresión de algunos factores inflamatorios característicos de la fisiopatología de la enfermedad celiaca en el intestino, como IL-15, la subunidad alfa del receptor para interleucina 15 (IL-15R α), IFN γ o perforina, (51,197). Como ocurría con los linfocitos $\gamma\delta$, estos marcadores característicos de la enfermedad celiaca en el intestino no se vieron incrementados en la mucosa bucal. Sorprendentemente, la expresión de IL-15, IFN γ y perforina apareció disminuida. Por esta razón, concluimos que los mecanismos inmunopatológicos subyacentes en la mucosa oral no parecen ser equivalentes a los del intestino.

En los pacientes alérgicos se estudió también la expresión del receptor

FcεRI. Los mastocitos frecuentemente responden a concentraciones muy bajas de antígenos *in vivo*, por lo que el nivel de expresión del FcεRI en la superficie de estas células es un factor importante en la determinación de respuesta de estas células al antígeno (207). En el tejido conectivo, los mastocitos representaron el 100% de las células que expresaban FcεRI en el tejido conjuntivo de los pacientes sanos, pero en los pacientes alérgicos tanto a olivo como a ácaros otros tipos celulares también expresaban este receptor. Esto puede indicar que las CPAs expresan también este receptor. Tal y como se ha descrito en la literatura, la expresión de FcεRI en CPAs aunque inicialmente se pensó que tenía un papel pro-inflamatorio, parece ejercer un papel importante en la homeostasis inmune y la regulación (208,209).

Según todo lo observado, el remodelado epitelial se produce en ausencia de infiltrado inflamatorio celular, que es presumiblemente enviado a las mucosas respiratoria o intestinal. Por esta razón, nosotros hipotetizamos que los daños observados son consecuencia de una serie de cambios a nivel sistémico. De hecho, ya se ha especulado previamente que la desregulación inmune a nivel sistémico se puede reflejar en la función de las barreras (210), incluso en la barrera oral (90).

Los estudios sistémicos se llevaron a cabo en 107 sujetos en el caso de la alergia y 21 sujetos en el estudio de la EC. Estos estudios revelaron un incremento significativo en los niveles de distintas alarminas epiteliales tanto en los sujetos alérgicos graves como en los pacientes celíacos (**Tabla 10**).

En el estudio llevado a cabo por Rosace et al. (128), los pacientes alérgicos al polen de gramíneas con alergia concomitante a profilina mostraron niveles elevados de IL-33 en la mucosa oral. Cuando el epitelio está dañado, las células epiteliales liberan **IL-33**. Esta alarmina, a su vez, contribuye a un mayor daño de la barrera epitelial y activa las respuestas de las células linfoides innatas de tipo 2. Las citoquinas Th2, como IL-4 e IL-13, inducen un mayor deterioro de la función de barrera de las células

epiteliales del bronquio (211). En un estudio llevado a cabo por Sugita et al (211), la IL-33 parece ser un efector clave en la inducción de “fugas” epiteliales en el bronquio. Esta citoquina tiene la capacidad de dañar las proteínas de las uniones estrechas y es capaz de inducir la producción de IgE. En nuestro estudio de alergia, no pudimos determinar los niveles locales de IL-33 en la mucosa oral. En el estudio de EC, al determinar los niveles de esta alarmina, en contra de lo esperado, no observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales.

En los pacientes alérgicos a ácaros encontramos un incremento significativo en los niveles séricos de IL-25. La IL-25 es una proteína asociada al remodelado tisular (212). En un modelo murino de asma asociada a alergia a ácaros, la IL-25 se relacionó con la deposición subepitelial de colágeno, la hiperplasia del músculo liso y la hiperreactividad (213). Además, la IL-25 es capaz de actuar directamente en los fibroblastos humanos para inducir la secreción de colágeno (214). El reclutamiento de células progenitoras endoteliales y la neovascularización en el pulmón también es dependiente de IL-25, lo que demuestra que la IL-25 tiene un papel relevante en la angiogénesis *in vivo* (213).

En el caso de los pacientes alérgicos graves a olivo se halló elevada la concentración sérica de LPET con respecto a los pacientes alérgicos moderados. La LPET, al igual que la IL-25, juega un papel importante en la inflamación y el remodelado de varias enfermedades de la vía aérea (215–217). Atenuar la liberación de LPET contribuye a disminuir los efectos de retroalimentación entre la inflamación aérea alérgica y el daño epitelial (218). En este contexto, es relevante que la expresión de este marcador este asociada a la de otro marcador de remodelado en pacientes alérgicos, el FCT- β , especialmente en los pacientes alérgicos graves. Ambos son factores capaces de inducir remodelado (219,220) y, recientemente, se ha descrito una vía común para la generación de fibrosis por ambos factores (221). De hecho, disminuir la producción de LPET en el pulmón de ratones con asma asociada a ácaros atenúa el nivel del factor asociado a fibrosis

FCT- β 1 (215).

Además, los niveles de IL-25 y LPET en los pacientes alérgicos y, especialmente en los alérgicos graves, presentaron una correlación positiva: cuanto mayor es la expresión de IL-25, mayor es la expresión de LPET, lo cual indica que ambos se expresan en respuesta a la alergia para fomentar la respuesta Th2, pudiendo ejercer acciones sinérgicas (212) y, además, su expresión aumenta cuanto más grave es el paciente. La terapia frente a estas tres alarminas, por tanto, podría mejorar el pronóstico de la enfermedad (222).

En un estudio reciente llevado a cabo por Obeso et al. (177), también se ha descrito la asociación de distintos marcadores sistémicos de inflamación (niveles elevados de esfingosina 1 fosfato, síntesis de lipofosfolípidos, o la alteración de la función plaquetaria) a la gravedad del paciente alérgico. Todos estos resultados apoyan la teoría de que los cambios sistémicos pueden reflejar los estados de “fuga” epitelial descritos en el presente estudio.

El acceso a ARN de las biopsias de pacientes celíacos permitió determinar los niveles de alarminas epiteliales a nivel local, en la mucosa, los cuales no estaban elevados; sin embargo, sí se detectó un aumento notable de IL-33 y un incremento no significativo de FAP en el suero de estos pacientes. La inflamación sistémica asociada a la enfermedad celíaca puede ser, por tanto, responsable del remodelado local observado. El incremento de IL-33 ha sido descrito previamente en pacientes celíacos. Lopez-casado et al. (223) midieron los niveles séricos y determinaron la expresión intestinal de IL-33 y su receptor ST2 en pacientes con celiaquía activa, aunque no incluyeron pacientes en DSG. En este estudio se encontraron niveles aumentados de IL-33 y su receptor (la interleucina 1 tipo receptor 1) en el intestino y el suero de los pacientes, lo cual fue indicativo de un estado inflamatorio activo. Estos autores sugirieron, por tanto, que la IL-33 puede ser considerada como un biomarcador potencial para la enfermedad celíaca. En esta misma línea, Perez F et al. (224),

encontraron una expresión aumentada de IL-33 en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos. Estos resultados subrayan la potencial contribución de IL-33 en la exacerbación de la inflamación en la patología celíaca. La adherencia a la DSG no siempre es conseguida, y los niveles sistémicos de determinadas citoquinas como la IL-2 o la IL-8 se elevan de forma rápida y dramática ante una reexposición al gluten en estos pacientes (225). Una inflamación sistémica prolongada puede contribuir a las complicaciones a largo plazo de la EC (226).

Sin embargo, un cierto grado de remodelado de la mucosa oral puede ser clave en la IT para ganar acceso a las capas subepiteliales y al sistema inmune asociado a la mucosa subyacente (128,227). Durante el proceso de vacunación con IT se promueve el reclutamiento de linfocitos Treg CD4+, lo cual es responsable de la eficacia del tratamiento (228–230). Una barrera epitelial dañada y un incremento en el reclutamiento de linfocitos Treg hacen, por tanto, que la mucosa oral sea una potencial diana para la IT. De esta manera, la terapia para la EC podría beneficiarse del desarrollo de una IT, de la misma manera que la alergia se beneficia de la ITSL (230). El potencial de la mucosa oral como sistema de administración de fármacos es conocido (231) y se han empezado ensayos para el desarrollo de IT para EC (232,233).

Todos estos hallazgos subrayan la necesidad de comprender cómo los mediadores sistémicos derivados de una inflamación mantenida afectan a la integridad de las barreras, además, de la necesidad de investigar huellas metabolómicas y transcriptómicas comunes para estas patologías que puedan ser útiles en la identificación de nuevas dianas para prevenir la progresión alérgica o encontrar posibles tratamientos o diagnósticos en enfermedad celíaca.

Tabla 8. Resumen de los resultados para el remodelado epitelial, la fibrosis y la angiogénesis en la mucosa oral de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo.

	Alergia			Celiaquía	
	Profilina†	Olivo	HDM	De novo	DSG
Ocludina	-	--	--	=	=
Claudina	=	=	=	--	--
E-cadherina	-	-	-	--	--
Masson	+	+	++	Nd	Nd
FCEVa	++	=	=	Nd	Nd
Capilares	Nd	=	++	Nd	Nd*

† Alergia grave a polen de gramíneas con alergia alimentaria a profilina concomitante, Rosace et al. (128). * Aumentado en RT-cRCP con respecto a *de novo*.

Tabla 9. Resumen de los resultados para el infiltrado celular en la mucosa oral de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo control.

	Alergia			Celiaquía	
	Profilina†	Olivo	Ácaros	De novo	DSG
CD3	=	=	=	=	-*
CD4	=	=	-	=	--*
CD8	Nd	Nd	Nd	=	=
CD11c	+	-	=	=	=
Langerhans	Nd	=	=	=	=
Neutrófilos	Nd	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0
Eosinófilos	Nd	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0
FoxP3/CD3	=	=	++	++++	++
TM	=	=	=	Nd	Nd
FcERI/TM	Nd	+	+	Nd	Nd
Linfocito B	Nd	Nd	Nd	~0	~0
Linfocito $\gamma\delta$	Nd	Nd	Nd	~0	~0

† Alergia grave a polen de gramíneas con alergia alimentaria a profilina concomitante, Rosace et al. (128). *% situados preferentemente en el epitelio.

Tabla 10. Resumen de los resultados para el nivel de alarminas a nivel sistémico de los distintos grupos de pacientes alérgicos y celíacos comparados con su respectivo grupo control.

	Alergia			Celiaquía	
	Profilina [†]	Olivo	Ácaros	De novo	DSG
IL-33	+ ^a	=	=	+	+
IL-25	Nd	=	+	=	=
LPET	Nd	+*	=	=	=
FAP	Nd	=	=	= ^b	=

† Alergia grave a polen de gramíneas con alergia alimentaria a profilina concomitante, Rosace et al. (128). * Con respecto a los moderados. ^a A nivel local en la mucosa oral. ^b p-valor=0,056.

Conclusiones

- Alergia

1. La barrera epitelial oral está dañada en pacientes con alergia respiratoria grave a polen de olivo y a ácaros.
2. Los pacientes alérgicos de fenotipo grave al polen de olivo y a ácaros presentan un incremento en la fibrosis subepitelial del tejido oral.
3. Los pacientes alérgicos a ácaros presentan un incremento en el número de capilares sanguíneos en la lámina propia.
4. El remodelado observado en la mucosa oral ocurre en ausencia de alergia alimentaria e independientemente del alérgeno involucrado.
5. El daño observado en la mucosa oral de los pacientes alérgicos ocurre sin reclutamiento significativo de células inmunes.
6. Los neutrófilos y eosinófilos no tienen un papel relevante en la mucosa bucal, ni si quiera en los pacientes alérgicos.
7. En la lámina propia del tejido oral de los pacientes alérgicos, a parte de los mastocitos, otros tipos celulares también expresan el receptor FcεRI.
8. Los pacientes con alergia respiratoria grave a ácaros presentan una población de células Treg incrementada.
9. Los pacientes alérgicos graves al polen de olivo presentan niveles sistémicos incrementados de LPET.
10. Los pacientes alérgicos a ácaros presentan niveles sistémicos incrementados de IL-25.
11. Los niveles de IL-25 y LPET se correlacionan en los pacientes alérgicos, especialmente en los pacientes alérgicos graves.
12. Los pacientes alérgicos graves presentan niveles incrementados de FCEV-a en suero.

13. Los niveles de alarminas epiteliales se correlacionan positivamente entre ellas y con los niveles de otra citoquina asociada a remodelado en alergia, el FCT- β .

- Celiaquía

1. La barrera epitelial oral está dañada en pacientes con enfermedad celiaca.
2. El daño epitelial observado en la mucosa oral se mantiene incluso tras un año de tratamiento con DSG.
3. La evitación del gluten en la dieta tiene efectos reparadores, ya que disminuye la migración preferente de los linfocitos al epitelio, y aumenta la expresión de ARN de las uniones intercelulares.
4. El daño observado en la mucosa oral de los pacientes celíacos ocurre sin reclutamiento significativo de células inmunes.
5. Los mecanismos moleculares y celulares de la histopatología oral no son equivalentes a los del intestino.
6. Los pacientes con EC presentan una población de células Treg incrementada.
7. El incremento de células Treg en los pacientes celíacos es proporcional al daño en el epitelio, y se correlaciona positivamente con la presencia de anfirregulina periférica.
8. Los pacientes celíacos presentan niveles sistémicos incrementados de IL-33 en el plasma.

Bibliografía

1. Ring J. What Is Allergy. In: Global Atlas of Allergy EAACI; 2014. p. 2–3.
2. Van Ree R. Allergens - Structure and Function. In: Global Atlas of Allergy EAACI; 2014. p. 6–7.
3. Testera-Montes A, Salas M, Palomares F, Ariza A, Torres MJ, Rondón C, et al. Local Respiratory Allergy: From Rhinitis Phenotype to Disease Spectrum. *Front Immunol* (2021);12:691964. doi: 10.3389/fimmu.2021.691964
4. Pawankar RS, Sánchez-Borges M, Bonini S, Kaliner MA. The burden of allergic diseases. In: WAO White Book on Allergy World Allergy Organization; 2011. p. 27–73.
5. Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Eur Respir J* (2007);29(2):233–9. doi: 10.1183/09031936.00138606
6. Li S, Morita H, Sokolowska M, Tan G, Boonpiyathad T, Opitz L, et al. Gene expression signatures of circulating human type 1, 2, and 3 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol* (2019);143(6):2321–5. doi: 10.1016/j.jaci.2019.01.047
7. Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, Hara S, Yamamoto S, Shimizu S, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D2 and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis. *Allergy* (2019);74(12):2417–26. doi: 10.1111/all.13974
8. Akdis CA, Arkwright PD, Brügger M-C, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy* (2020);75(7):1582–605. doi: 10.1111/all.14318
9. 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.
10. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* (2008);454(7203):445–54. doi: 10.1038/nature07204
11. Draijer C, Peters-Golden M. Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep* (2017);17(2):12. doi: 10.1007/s11882-017-0681-6
12. Jiménez-Saiz R, Chu DK, Mandur TS, Walker TD, Gordon ME, Chaudhary R, et al. Lifelong memory responses perpetuate humoral TH2 immunity and anaphylaxis in food allergy. *J Allergy Clin Immunol* (2017);140(6):1604-1615.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2017.01.018
13. Kraft S, Kinet J-P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* (2007);7(5):365–78. doi: 10.1038/nri2072
14. Sokolowska M, Rovati GE, Diamant Z, Untertsmayr E, Schwarze J, Lukasik Z, et al. Current

- perspective on eicosanoids in asthma and allergic diseases: EAACI Task Force consensus report, part I. *Allergy* (2021);76(1):114–30. doi: 10.1111/all.14295
15. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* (2017);140(2):335–48. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.003
 16. Kay AB, Ali FR, Heaney LG, Benyahia F, Soh CPC, Renz H, et al. Airway expression of calcitonin gene-related peptide in T-cell peptide-induced late asthmatic reactions in atopics. *Allergy* (2007);62(5):495–503. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01342.x
 17. Samitas K, Carter A, Kariyawasam HH, Xanthou G. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy* (2018);73(5):993–1002. doi: 10.1111/all.13373
 18. Tan H-TT, Hagner S, Ruchti F, Radzikowska U, Tan G, Altunbulakli C, et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy* (2019);74(2):294–307. doi: 10.1111/all.13619
 19. Rodriguez-Coira J, Villaseñor A, Izquierdo E, Huang M, Barker-Tejeda TC, Radzikowska U, et al. The Importance of Metabolism for Immune Homeostasis in Allergic Diseases. *Front Immunol* (2021);12:692004. doi: 10.3389/fimmu.2021.692004
 20. Kleine-Tebbe J, Thilo J. Molecular Allergy Diagnostics In Clinical Practice. In: *Molecular Allergology EAACI*; 2016. p. 21–33.
 21. 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* (2014);133(1):130-8.e1-2. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.043
 22. Babaie D, Mesdaghi M, Nishino M, Mansouri M, Ebisawa M. Oral and Sublingual Immunotherapy: Potential Causes for Eosinophilic Gastrointestinal Disorders? *Int Arch Allergy Immunol* (2017);172(2):89–98. doi: 10.1159/000457796
 23. Ozdemir C, Yazı D, Gocmen I, Yesil O, Aydogan M, Semic-Jusufagic A, et al. Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* (2007);18(6):508–15. doi: 10.1111/j.1399-3038.2007.00549.x
 24. de Blay F, Barnig C, Kanny G, Purohit A, Leynadier F, Tunon de Lara JM, et al. Sublingual-swallow immunotherapy with standardized 3-grass pollen extract: a double-blind, placebo-controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* (2007);99(5):453–61. doi: 10.1016/s1081-1206(10)60571-6
 25. Calderón MA, Cox L, Casale TB, Moingeon P, Demoly P. Multiple-allergen and single-allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: looking at the published evidence. *J Allergy Clin Immunol* (2012);129(4):929–34. doi: 10.1016/j.jaci.2011.11.019

26. Pelaia C, Crimi C, Vatrella A, Tinello C, Terracciano R, Pelaia G. Molecular Targets for Biological Therapies of Severe Asthma. *Front Immunol* (2020);11:603312. doi: 10.3389/fimmu.2020.603312
27. From the American Association of Neurological Surgeons (AANS), American Society of Neuroradiology (ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe (CIRSE), Canadian Interventional Radiology Association (CIRA), Congress of Neurological and WSO (WSO), Sacks D, Baxter B, Campbell BC V, Carpenter JS, Cognard C, et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke* (2018);13(6):612–32. doi: 10.1177/1747493018778713
28. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald JM, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* (2008);31(1):143–78. doi: 10.1183/09031936.00138707
29. Asthma GI for. Global Straregy For Asthma Management And Prevention [Internet]. 2021. p. 1–217.
30. Barber D, Díaz-Perales A, Villalba M, Chivato T. Challenges for Allergy Diagnosis in Regions with Complex Pollen Exposures. *Curr Allergy Asthma Rep* (2015);15(2):496. doi: 10.1007/s11882-014-0496-7
31. 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* (2008);63(11):1550–8. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01807.x
32. Batanero E, Rodríguez R, Villalba M. Olive Pollen Allergens: An Insight into Clinical, Diagnostic and Therapeutic Concepts of Allergy. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention Elsevier Inc.*; 2021. p. 359–75. doi: 10.1016/B978-0-12-374420-3.00110-8
33. Palomares O, Swoboda I, Villalba M, Balic N, Spitzauer S, Rodríguez R, et al. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae. *Int Arch Allergy Immunol* (2006);141(2):110–8. doi: 10.1159/000094713
34. Skypala IJ, Bartra J, Ebo DG, Antje Faber M, Fernández-Rivas M, Gomez F, et al. The diagnosis and management of allergic reactions in patients sensitized to non-specific lipid transfer proteins. *Allergy* (2021);76(8):2433–46. doi: 10.1111/all.14797
35. Skypala IJ, Asero R, Barber D, Cecchi L, Diaz Perales A, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Non-specific lipid-transfer proteins: Allergen structure and function, cross-reactivity, sensitization, and epidemiology. *Clin Transl Allergy* (2021);11(3):e12010. doi: 10.1002/ctt2.12010
36. Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M, et al. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol* (2007);17 Suppl 1:11–6.

37. Huecas S, Villalba M, Rodríguez R. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J Biol Chem* (2001);276(30):27959–66. doi: 10.1074/jbc.M103041200
38. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol* (2015);136(1):38–48. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.012
39. World Health Organization. Dust mite allergens and asthma: a worldwide problem. International Workshop report. In: *Bulletin of the World Health Organization* 1988. p. 769–80.
40. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* (1999);104(1):123–33. doi: 10.1172/JCI5844
41. Reginald K, Chew FT. The major allergen Der p 2 is a cholesterol binding protein. *Sci Rep* (2019);9(1):1556. doi: 10.1038/s41598-018-38313-9
42. Barber D, Arias J, Boquete M, Cardona V, Carrillo T, Gala G, et al. Analysis of mite allergic patients in a diverse territory by improved diagnostic tools. *Clin Exp Allergy* (2012);42(7):1129–38. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.03993.x
43. Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, et al. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. *PLoS One* (2013);8(10):e78099. doi: 10.1371/journal.pone.0078099
44. López-Rodríguez JC, Manosalva J, Cabrera-García JD, Escribese MM, Villalba M, Barber D, et al. Human glutathione-S-transferase pi potentiates the cysteine-protease activity of the Der p 1 allergen from house dust mite through a cysteine redox mechanism. *Redox Biol* (2019);26:101256. doi: 10.1016/j.redox.2019.101256
45. López-Rodríguez JC, Rodríguez-Coira J, Benedé S, Barbas C, Barber D, Villalba MT, et al. Comparative metabolomics analysis of bronchial epithelium during barrier establishment after allergen exposure. *Clin Transl Allergy* (2021);11(7):e12051. doi: 10.1002/ctt2.12051
46. Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol* (2013);47(2):121–6. doi: 10.1097/MCG.0b013e31827a6f83
47. Collin P, Vilppula A, Luostarinen L, Holmes GKT, Kaukinen K. Review article: coeliac disease in later life must not be missed. *Aliment Pharmacol Ther* (2018);47(5):563–72. doi: 10.1111/apt.14490
48. Lebowitz B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *Lancet* (London, England) (2018);391(10115):70–81. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8
49. Feldman M, Friedman L, Brandt L. Celiac Disease. In: 11, editor. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease Elsevier*; 2020. p. 1736–55.

50. Dunne MR, Byrne G, Chirido FG, Feighery C. Coeliac Disease Pathogenesis: The Uncertainties of a Well-Known Immune Mediated Disorder. *Front Immunol* (2020);11:1374. doi: 10.3389/fimmu.2020.01374
51. Voisine J, Abadie V. Interplay Between Gluten, HLA, Innate and Adaptive Immunity Orchestrates the Development of Coeliac Disease. *Front Immunol* (2021);12:674313. doi: 10.3389/fimmu.2021.674313
52. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* (1997);3(7):797–801. doi: 10.1038/nm0797-797
53. Di Niro R, Mesin L, Zheng N-Y, Stammaes J, Morrissey M, Lee J-H, et al. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med* (2012);18(3):441–5. doi: 10.1038/nm.2656
54. Macho VMP, Coelho AS, Veloso E Silva DM, de Andrade DJC. Oral Manifestations in Pediatric Patients with Coeliac Disease - A Review Article. *Open Dent J* (2017);11:539–45. doi: 10.2174/1874210601711010539
55. Äärelä L, Nurminen S, Kivelä L, Huhtala H, Mäki M, Viitasalo A, et al. Prevalence and associated factors of abnormal liver values in children with celiac disease. *Dig Liver Dis* (2016);48(9):1023–9. doi: 10.1016/j.dld.2016.05.022
56. Pelkowski TD, Viera AJ. Celiac disease: diagnosis and management. *Am Fam Physician* (2014);89(2):99–105.
57. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS). Enfermedad celíaca. In: *Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca 1st ed.* Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2018. p. 27–63.
58. Wahab PJ, Meijer JWR, Mulder CJJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol* (2002);118(3):459–63. doi: 10.1309/EVXT-851X-WHLC-RLX9
59. Parzanese I, Qehajaj D, Patrinicola F, Aralica M, Chiriva-Internati M, Stifter S, et al. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol* (2017);8(2):27–38. doi: 10.4291/wjgp.v8.i2.27
60. Mooney PD, Wong SH, Johnston AJ, Kurien M, Avgerinos A, Sanders DS. Increased Detection of Celiac Disease With Measurement of Deamidated Gliadin Peptide Antibody Before Endoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2015);13(7):1278-1284.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2015.01.010
61. Nijeboer P, van Gils T, Reijm M, Ooijevaar R, Lissenberg-Witte BI, Bontkes HJ, et al. Gamma-Delta T Lymphocytes in the Diagnostic Approach of Coeliac Disease. *J Clin Gastroenterol* 53(5):e208–13. doi: 10.1097/MCG.0000000000001060

62. García-Porrero JA, Hurlé JM. Sección IV. Aparato Digestivo. In: Anatomía Humana 1st ed. McGraw Hill- Interamericana de España, S.A.U.; 2006. p. 323–9.
63. Young B, Heath JW. Tema 13: Tejidos orales. In: Wheater Histología Funcional 4th ed. Elsevier; 2008. p. 237–48.
64. Michael H. R, Wojciech P. Aparato digestivo I: cavidad oral y estructuras asociadas. In: Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular 5th ed. Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 518–61.
65. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* (2001);(29):7–15. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443
66. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Cavidad bucal y anexos. In: Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental 4th ed. Editorial Médica Panamericana; 2019. p. 87–100, 121–2.
67. Squier C, Brogden KA. Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function. Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function [Internet]. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2013. doi: 10.1002/9781118710470
68. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered Oral Mucosa: a Review of the Scientific Literature. *J Dent Res* (2007);86(2):115–24. doi: 10.1177/154405910708600203
69. Groeger S, Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol* (2019);10:208. doi: 10.3389/fimmu.2019.00208
70. Liu W, Cui Y, Wei J, Sun J, Zheng L, Xie J. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in oral development and oral diseases: a concise review of research progress. *Int J Oral Sci* (2020);12(1):17. doi: 10.1038/s41368-020-0086-6
71. Samiei M, Ahmadian E, Eftekhari A, Eghbal MA, Rezaie F, Vinken M. Cell junctions and oral health. *EXCLI J* (2019);18:317–30. doi: 10.17179/excli2019-1370
72. Wan H, Gadmor H, Brown L. Anchoring Junctions in the Oral Mucosa: Adherens Junctions and Desmosomes. In: Oral Mucosa in Health and Disease Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 31–51. doi: 10.1007/978-3-319-56065-6_3
73. Ruhrberg C, Hajibagheri MA, Parry DA, Watt FM. Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J Cell Biol* (1997);139(7):1835–49. doi: 10.1083/jcb.139.7.1835
74. Sonnenberg A, Liem RKH. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* (2007);313(10):2189–203. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.039
75. Ocampo ÓJV, Velásquez-Lopera MM. Inmunopatogenia del pénfigo vulgar y el pénfigo foliáceo. *Iatreia* (2011);24(3):272–86.
76. Sieben C, Machuca M, Broglia G, Massone A. Actualización en dermatosis autoinmunes en

- caninos caracterizadas por pústulas, vesículas y ampollas: anatomopatología y diagnóstico. *Rev Investig Vet del Perú* (2019);30(1):1–13.
77. Moutsopoulos NM, Konkel JE. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier. *Trends Immunol* (2018);39(4):276–87. doi: 10.1016/j.it.2017.08.005
 78. Novak N, Haberkost J, Bieber T, Allam J-P. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med* (2008);14(5):191–8. doi: 10.1016/j.molmed.2008.03.001
 79. Leoni G, Neumann P-A, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol* (2015);8(5):959–68. doi: 10.1038/mi.2015.63
 80. Berin MC, Sampson HA. Mucosal Immunology of Food Allergy. *Curr Biol* (2013);23(9):R389–400. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.043
 81. Ballón-Salcedo CE, Cacya-Apaza IL, Valdivia-Silva J. Inmunidad de la mucosa oral: Nuevas tendencias en investigación. *Dermatol Peru* (2019);29(1):22–30.
 82. Wu R-Q, Zhang D-F, Tu E, Chen Q-M, Chen W. The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci* (2014);6(3):125–32. doi: 10.1038/ijos.2014.48
 83. Sobkowiak MJ, Davanian H, Heymann R, Gibbs A, Emgård J, Dias J, et al. Tissue-resident MAIT cell populations in human oral mucosa exhibit an activated profile and produce IL-17. *Eur J Immunol* (2019);49(1):133–43. doi: 10.1002/eji.201847759
 84. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* (2001);85(2):162–9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778
 85. Williams DW, Greenwell-Wild T, Brenchley L, Dutzan N, Overmiller A, Sawaya AP, et al. Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. *Cell* (2021);184(15):4090-4104.e15. doi: 10.1016/j.cell.2021.05.013
 86. Allam J-P, Stojanovski G, Friedrichs N, Peng W, Bieber T, Wenzel J, et al. Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* (2008);63(6):720–7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01611.x
 87. Hovav A-H. Dendritic cells of the oral mucosa. *Mucosal Immunol* (2014);7(1):27–37. doi: 10.1038/mi.2013.42
 88. Kirchner FR, LeibundGut-Landmann S. Tissue-resident memory Th17 cells maintain stable fungal commensalism in the oral mucosa. *Mucosal Immunol* (2021);14(2):455–67. doi: 10.1038/s41385-020-0327-1
 89. Park J-Y, Chung H, DiPalma DT, Tai X, Park J-H. Immune quiescence in the oral mucosa is maintained by a uniquely large population of highly activated Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* (2018);11(4):1092–102. doi: 10.1038/s41385-018-0027-2
 90. Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. The oral mucosa: A barrier site participating in tissue-

- specific and systemic immunity. *Oral Dis* (2018);24(1–2):22–5. doi: 10.1111/odi.12729
91. Ewert P, Aguilera S, Alliende C, Kwon Y-J, Albornoz A, Molina C, et al. Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjögren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure. *Arthritis Rheum* (2010);62(5):1280–9. doi: 10.1002/art.27362
 92. Martin TA, Mansel RE, Jiang WG. Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int J Mol Med* (2010);26(5):723–34. doi: 10.3892/ijmm_00000519
 93. Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai MA, et al. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* (2008);113(11):3169–80. doi: 10.1002/cncr.23934
 94. Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* (2000);110(3 Pt 1):374–81. doi: 10.1097/00005537-200003000-00008
 95. Groeger SE, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol* 2000 (2015);69(1):46–67. doi: 10.1111/prd.12094
 96. Henriquez OA, Den Beste K, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A, Wise SK. House dust mite allergen Der p 1 effects on sinonasal epithelial tight junctions. *Int Forum Allergy Rhinol* (2013);3(8):630–5. doi: 10.1002/alr.21168
 97. Golebski K, Röschmann KIL, Toppila-Salmi S, Hammad H, Lambrecht BN, Renkonen R, et al. The multi-faceted role of allergen exposure to the local airway mucosa. *Allergy* (2013);68(2):152–60. doi: 10.1111/all.12080
 98. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat Rev Immunol* (2021); doi: 10.1038/s41577-021-00538-7
 99. Slifer ZM, Blikslager AT. The Integral Role of Tight Junction Proteins in the Repair of Injured Intestinal Epithelium. *Int J Mol Sci* (2020);21(3). doi: 10.3390/ijms21030972
 100. Hellings PW, Steelant B. Epithelial barriers in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2020);145(6):1499–509. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.010
 101. Wesemann DR, Nagler CR. The Microbiome, Timing, and Barrier Function in the Context of Allergic Disease. *Immunity* (2016);44(4):728–38. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.002
 102. Celebi Sözüner Z, Cevhertas L, Nadeau K, Akdis M, Akdis CA. Environmental factors in epithelial barrier dysfunction. *J Allergy Clin Immunol* (2020);145(6):1517–28. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.024
 103. Järvinen KM, Konstantinou GN, Pilapil M, Arrieta M-C, Noone S, Sampson HA, et al. Intestinal permeability in children with food allergy on specific elimination diets. *Pediatr Allergy Immunol* (2013);24(6):589–95. doi: 10.1111/pai.12106

104. Dupont C, Barau E, Molkhov P, Raynaud F, Barbet JP, Dehennin L. Food-Induced Alterations of Intestinal Permeability in Children with Cow's Milk-Sensitive Enteropathy and Atopic Dermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (1989);8(4):459–65. doi: 10.1097/00005176-198905000-00007
105. Andre C, Andre F, Colin L, Cavagna S. Measurement of intestinal permeability to mannitol and lactulose as a means of diagnosing food allergy and evaluating therapeutic effectiveness of disodium cromoglycate. *Ann Allergy* (1987);59(5 Pt 2):127–30.
106. Brough HA, Nadeau KC, Sindher SB, Alkotob SS, Chan S, Bahnson HT, et al. Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: What is the evidence and how can this be prevented? *Allergy* (2020);75(9):2185–205. doi: 10.1111/all.14304
107. Şenel S. An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *Int J Mol Sci* (2021);22(15). doi: 10.3390/ijms22157821
108. Steelant B, Farré R, Wawrzyniak P, Belmans J, Dekimpe E, Vanheel H, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *J Allergy Clin Immunol* (2016);137(4):1043-1053.e.5.
109. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* (2014);134(3):499–507. doi: 10.1016/j.jaci.2014.06.036
110. Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol* (2009);9(6):715–20. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.022
111. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* (2009);1788(4):864–71. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.027
112. van Deventer SJH. Anti-TNF antibody treatment of Crohn's disease. *Ann Rheum Dis* (1999);58(Supplement 1):i114–20. doi: 10.1136/ard.58.2008.i114
113. Abe A, Takano K, Kojima T, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, et al. Interferon-gamma increased epithelial barrier function via upregulating claudin-7 expression in human submandibular gland duct epithelium. *J Mol Histol* (2016);47(3):353–63. doi: 10.1007/s10735-016-9667-2
114. Mei M, Xiang R-L, Cong X, Zhang Y, Li J, Yi X, et al. Claudin-3 is required for modulation of paracellular permeability by TNF- α through ERK1/2/slug signaling axis in submandibular gland. *Cell Signal* (2015);27(10):1915–27. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.07.002
115. Baker OJ, Camden JM, Redman RS, Jones JE, Seye CI, Erb L, et al. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* (2008);295(5):C1191-201. doi: 10.1152/ajpcell.00144.2008
116. Roan F, Obata-Ninomiya K, Ziegler SF. Epithelial cell-derived cytokines: more than just

- signaling the alarm. *J Clin Invest* (2019);129(4):1441–51. doi: 10.1172/JCI124606
117. Gomez-Casado C, Villaseñor A, Rodriguez-Nogales A, Bueno JL, Barber D, Escribese MM. Understanding Platelets in Infectious and Allergic Lung Diseases. *Int J Mol Sci* (2019);20(7):1730. doi: 10.3390/ijms20071730
118. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity* (2015);43(1):175–86. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.021
119. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. “Repair” Treg Cells in Tissue Injury. *Cell Physiol Biochem* (2017);43(6):2155–69. doi: 10.1159/000484295
120. Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* (2012);3:71. doi: 10.3389/fimmu.2012.00071
121. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med* (2019);65:2–15. doi: 10.1016/j.mam.2018.06.003
122. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* (2012);18(7):1028–40. doi: 10.1038/nm.2807
123. López JH, Gutiérrez CJ, Téllez O, López MM. Remodelación de la vía aérea en asma. *Alergia, Asma e Inmunol Pediátricas* (2009);18(2):60–78.
124. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1990);3(5):507–11. doi: 10.1165/ajrcmb/3.5.507
125. Kou W, Hu G-H, Yao H-B, Wang X, Shen Y, Kang H-Y, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1 activation and expression in the tissue remodeling involved in chronic rhinosinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* (2012);74(3):172–8. doi: 10.1159/000338799
126. Hawinkels LJAC, Ten Dijke P. Exploring anti-TGF- β therapies in cancer and fibrosis. *Growth Factors* (2011);29(4):140–52. doi: 10.3109/08977194.2011.595411
127. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* (2009);124(2):253–9, 259.e1-2. doi: 10.1016/j.jaci.2009.04.013
128. Rosace D, Gomez-Casado C, Fernandez P, Perez-Gordo M, Dominguez M del C, 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. doi: 10.1016/j.jaci.2018.03.013

129. Owen MR, Alarcón T, Maini PK, Byrne HM. Angiogenesis and vascular remodelling in normal and cancerous tissues. *J Math Biol* (2009);58(4–5):689–721. doi: 10.1007/s00285-008-0213-z
130. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv wound care* (2014);3(10):647–61. doi: 10.1089/wound.2013.0517
131. Choi G-S, Park H-J, Hur G-Y, Choi S-J, Shin S-Y, Ye Y-M, et al. Vascular endothelial growth factor in allergen-induced nasal inflammation. *Clin Exp Allergy* (2009);39(5):655–61. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03216.x
132. Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Lindfors K. Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol* (2008);152(1):111–9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03600.x
133. Kalliokoski S, Sulic A-M, Korponay-Szabó IR, Szondy Z, Frias R, Perez MA, et al. Celiac Disease-Specific TG2-Targeted Autoantibodies Inhibit Angiogenesis Ex Vivo and In Vivo in Mice by Interfering with Endothelial Cell Dynamics. *PLoS One* (2013);8(6):e65887. doi: 10.1371/journal.pone.0065887
134. Chi AC, Neville BW, Krayner JW, Gonsalves WC. Oral manifestations of systemic disease. *Am Fam Physician* (2010);82(11):1381–8.
135. Saccucci M, Di Carlo G, Bossù M, Giovarruscio F, Salucci A, Polimeni A. Autoimmune Diseases and Their Manifestations on Oral Cavity: Diagnosis and Clinical Management. *J Immunol Res* (2018);2018:1–6. doi: 10.1155/2018/6061825
136. Gaddey HL. Oral manifestations of systemic disease. *Gen Dent* (2017);65(6):23–9.
137. Napeñas JJ, Brennan MT, Elad S. Oral Manifestations of Systemic Diseases. *Dermatol Clin* (2020);38(4):495–505. doi: 10.1016/j.det.2020.05.010
138. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* (2002);68(3):170–4.
139. Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital* (2011);31(6):347–57.
140. Jajam M, Bozzolo P, Niklander S. Oral manifestations of gastrointestinal disorders. *J Clin Exp Dent* (2017);9(10):e1242–8. doi: 10.4317/jced.54008
141. Mustafa MB, Porter SR, Smoller BR, Sitaru C. Oral mucosal manifestations of autoimmune skin diseases. *Autoimmun Rev* (2015);14(10):930–51. doi: 10.1016/j.autrev.2015.06.005
142. Porter SR, Mercadente V, Fedele S. Oral manifestations of systemic disease. *BDJ Team* (2018);5(1):18012. doi: 10.1038/bdjteam.2018.12
143. Santosh AR, Muddana K. Viral infections of oral cavity. *J Fam Med Prim Care* (2020);9(1):36.

doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_807_19

144. Rautemaa R, Lauhio A, Cullinan MP, Seymour GJ. Oral infections and systemic disease—an emerging problem in medicine. *Clin Microbiol Infect* (2007);13(11):1041–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01802.x
145. Dalmády S, Kemény L, Antal M, Gyulai R. Periodontitis: a newly identified comorbidity in psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* (2020);16(1):101–8. doi: 10.1080/1744666X.2019.1700113
146. Holmstrup P, Damgaard C, Olsen I, Klinge B, Flyvbjerg A, Nielsen CH, et al. Comorbidity of periodontal disease: two sides of the same coin? An introduction for the clinician. *J Oral Microbiol* (2017);9(1):1332710. doi: 10.1080/20002297.2017.1332710
147. Pentony P, Duquenne L, Dutton K, Mankia K, Gul H, Vital E, et al. The initiation of autoimmunity at epithelial surfaces: a focus on rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Discov Med* (2017);24(133):191–200.
148. Mikuls TR, Payne JB, Deane KD, Thiele GM. Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis? *J Allergy Clin Immunol* (2016);137(1):28–34. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.024
149. Papageorgiou SN, Hagner M, Nogueira AVB, Franke A, Jäger A, Deschner J. Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. *J Clin Periodontol* (2017);44(4):382–93. doi: 10.1111/jcpe.12698
150. Mejia LM. Oral Manifestations of Gastrointestinal Disorders. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* (2017);25(2):93–104. doi: 10.1016/j.cxom.2017.04.002
151. Mays JW, Sarmadi M, Moutsopoulos NM. Oral Manifestations of Systemic Autoimmune and Inflammatory Diseases: Diagnosis and Clinical Management. *J Evid Based Dent Pract* (2012);12(3):265–82. doi: 10.1016/S1532-3382(12)70051-9
152. Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, et al. Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Hum Immunol* (2010);71(1):50–7. doi: 10.1016/j.humimm.2009.09.351
153. Bardellini E, Amadori F, Ravelli A, Saleme M, Lonardi S, Villanacci V, et al. Histopathological findings in the oral mucosa of celiac patients. *Rev Esp Enferm Dig* (2014);106(2):86–91. doi: 10.4321/s1130-01082014000200003
154. Rodrigo L, Beteta-Gorriti V, Alvarez N, Gómez de Castro C, de Dios A, Palacios L, et al. Cutaneous and Mucosal Manifestations Associated with Celiac Disease. *Nutrients* (2018);10(7):800. doi: 10.3390/nu10070800
155. Bernardo D. Coeliac disease in the oral mucosa? *Rev Esp Enferm Dig* (2014);106(2):73–6. doi: 10.4321/s1130-01082014000200001
156. Leffler DA, Green PHR, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev*

Gastroenterol Hepatol (2015);12(10):561–71. doi: 10.1038/nrgastro.2015.131

157. Nardecchia S, Auricchio R, Discepolo V, Troncone R. Extra-Intestinal Manifestations of Coeliac Disease in Children: Clinical Features and Mechanisms. *Front Pediatr* (2019);7. doi: 10.3389/fped.2019.00056
158. Hernandez L, Green PH. Extraintestinal manifestations of celiac disease. *Curr Gastroenterol Rep* (2006);8(5):383–9. doi: 10.1007/s11894-006-0023-7
159. Yazdanbod A, Nemati R, Alamdari MI, Azami A, Maleki N. Prevalence of celiac disease in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Govaresh* (2014);18(4):244–9.
160. Compilato D, Campisi G, Pastore L, Carroccio A. The production of the oral mucosa of antiendomysial and anti-tissue-transglutaminase antibodies in patients with celiac disease: a review. *ScientificWorldJournal* (2010);10:2385–94. doi: 10.1100/tsw.2010.228
161. 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* (2014);69(12):1610–6. doi: 10.1111/all.12509
162. Barber Hernández D. Could Profilin Be a “Canary in a Coal Mine” of the Increasing Allergy Epidemic? *Int Arch Allergy Immunol* (2015);168(1):1–2. doi: 10.1159/000441564
163. 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* (2011);128(2):416–8. doi: 10.1016/j.jaci.2011.03.008
164. 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* (2009);39(11):1764–73. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03351.x
165. Asero R, Tripodi S, Dondi A, Di Rienzo Businco A, Sfika I, Bianchi A, et al. Prevalence and Clinical Relevance of IgE Sensitization to Profilin in Childhood: A Multicenter Study. *Int Arch Allergy Immunol* (2015);168(1):25–31. doi: 10.1159/000441222
166. Mastroianni C, Tripodi S, Caffarelli C, Perna S, Di Rienzo-Businco A, Sfika I, et al. Endotypes of pollen-food syndrome in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis: a molecular classification. *Allergy* (2016);71(8):1181–91. doi: 10.1111/all.12888
167. Santos A, Van Ree R. Profilins: Mimickers of Allergy or Relevant Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* (2011);155(3):191–204. doi: 10.1159/000321178
168. Elia C S A, Renata M E, Benito A S M, Vitorino M S, Maria G R. Oral epithelial changes in HIV-positive individuals. *Pathol Res Pract* (2013);209(7):399–403. doi: 10.1016/j.prp.2013.03.001
169. Dodani K, Anumala N, Avula H, Reddy K, Varre S, Kalakonda BB, et al. Periodontal findings in patients with oral submucous fibrosis and comet assay of affected gingival epithelial cells.

J Periodontol (2012);83(8):1038–47. doi: 10.1902/jop.2011.110352

170. Blanco C, Quiralte J, Castillo R, Delgado J, Arteaga C, Barber D, et al. Anaphylaxis after ingestion of wheat flour contaminated with mites. *J Allergy Clin Immunol* (1997);99(3):308–13. doi: 10.1016/s0091-6749(97)70047-2
171. 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* (2012);67(1):18–24. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x
172. Plaza Moral V, Comité Ejecutivo de GEMA. [GEMA(4.0). Guidelines for Asthma Management]. *Arch Bronconeumol* (2015);51 Suppl 1:2–54. doi: 10.1016/S0300-2896(15)32812-X
173. Zuber TJ. Punch biopsy of the skin. *Am Fam Physician* (2002);65(6):1155–8, 1161–2, 1164.
174. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001);25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
175. Cecchi L, D'Amato G, Annesi-Maesano I. External exposome and allergic respiratory and skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* (2018);141(3):846–57. doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.016
176. Landa-Pineda CM, Guidos-Fogelbach G, Marchat-Marchau L, López-Hidalgo M, Arroyo-Becerra A, Sandino Reyes-López CA. [Profilins: allergens with clinical relevance]. *Rev Alerg Mex* 60(3):129–43.
177. 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* (2018);73(11):2137–49. doi: 10.1111/all.13563
178. Uluçkan Ö, Wagner EF. Chronic systemic inflammation originating from epithelial tissues. *FEBS J* (2017);284(4):505–16. doi: 10.1111/febs.13904
179. Ganesan S, Sajjan US. Repair and Remodeling of airway epithelium after injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr Respir Care Rep* (2013);2(3). doi: 10.1007/s13665-013-0052-2
180. Lange S, Ramirez MI. Editorial: Tissue Remodeling in Health and Disease Caused by Bacteria, Parasites, Fungi, and Viruses. *Front Cell Infect Microbiol* (2021);11:642311. doi: 10.3389/fcimb.2021.642311
181. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2001);281(1):G216–28. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.1.G216
182. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* (2002);2(9):647–55. doi: 10.1038/nri885
183. Iversen R, Sollid LM. Autoimmunity provoked by foreign antigens. *Science* (80-)

- (2020);368(6487):132–3. doi: 10.1126/science.aay3037
184. Jauregi-Miguel A. The tight junction and the epithelial barrier in coeliac disease. *Int Rev Cell Mol Biol* (2021);358:105–32. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.09.010
 185. Katelaris CH. Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2010);10(3):246–51. doi: 10.1097/ACI.0b013e32833973fb
 186. Rashid M, Zarkadas M, Anca A, Limeback H. Oral manifestations of celiac disease: a clinical guide for dentists. *J Can Dent Assoc* (2011);77:b39.
 187. Lähteenoja H, Toivanen A, Viander M, Rähä I, Rantala I, Syrjänen S, et al. Increase in T-cell subsets of oral mucosa: a late immune response in patients with treated coeliac disease? *Scand J Immunol* (2000);52(6):602–8. doi: 10.1046/j.1365-3083.2000.00794.x
 188. Besnard V, Dagher R, Madjer T, Joannes A, Jaillet M, Kolb M, et al. Identification of periplakin as a major regulator of lung injury and repair in mice. *JCI Insight* (2018);3(5). doi: 10.1172/jci.insight.90163
 189. Ribatti D, Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med* (2009);13(9A):2822–33. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00810.x
 190. von Garnier C, Wikstrom ME, Zosky G, Turner DJ, Sly PD, Smith M, et al. Allergic airways disease develops after an increase in allergen capture and processing in the airway mucosa. *J Immunol* (2007);179(9):5748–59. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.5748
 191. Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Toivanen A, Syrjanen S. Local challenge of oral mucosa with gliadin in patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* (2000);120(1):38–45. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01177.x
 192. Campisi G, Compilato D, Iacono G, Maresi E, Di Liberto C, Di Marco V, et al. Histomorphology of healthy oral mucosa in untreated celiac patients: unexpected association with spongiosis. *J Oral Pathol Med* (2008);38(1):34–41. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00677.x
 193. Krishnan S, Prise IE, Wemyss K, Schenck LP, Bridgeman HM, McClure FA, et al. Amphiregulin-producing $\gamma\delta$ T cells are vital for safeguarding oral barrier immune homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* (2018);115(42):10738–43. doi: 10.1073/pnas.1802320115
 194. Upadhyay R, Jaitley S, Shekhar R, Agrawal P, Upadhyay J. Langerhans cells and their role in oral mucosal diseases. *N Am J Med Sci* (2013);5(9):505. doi: 10.4103/1947-2714.118923
 195. Cook L, Munier CML, Seddiki N, van Bockel D, Ontiveros N, Hardy MY, et al. Circulating gluten-specific FOXP3 + CD39 + regulatory T cells have impaired suppressive function in patients with celiac disease. *J Allergy Clin Immunol* (2017);140(6):1592-1603.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.015
 196. Granzotto M, dal Bo S, Quaglia S, Tommasini A, Piscianz E, Valencic E, et al. Regulatory T-Cell Function Is Impaired in Celiac Disease. *Dig Dis Sci* (2009);54(7):1513–9. doi: 10.1007/s10620-008-0501-x

197. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev* (2014);260(1):221–34. doi: 10.1111/imr.12191
198. Jabri B, Sollid LM. T Cells in Celiac Disease. *J Immunol* (2017);198(8):3005–14. doi: 10.4049/jimmunol.1601693
199. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinto G, Giardullo N, et al. IL-15 Interferes With Suppressive Activity of Intestinal Regulatory T Cells Expanded in Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* (2011);106(7):1308–17. doi: 10.1038/ajg.2011.80
200. Jones AC, Anderson D, Galbraith S, Fantino E, Gutierrez Cardenas D, Read JF, et al. Personalized Transcriptomics Reveals Heterogeneous Immunophenotypes in Children with Viral Bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* (2019);199(12):1537–49. doi: 10.1164/rccm.201804-0715OC
201. Hirahara K, Aoki A, Morimoto Y, Kiuchi M, Okano M, Nakayama T. The immunopathology of lung fibrosis: amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells control the airway fibrotic responses by inducing eosinophils to secrete osteopontin. *Semin Immunopathol* (2019);41(3):339–48. doi: 10.1007/s00281-019-00735-6
202. Holtan SG, DeFor TE, Panoskaltis-Mortari A, Khera N, Levine JE, Flowers MED, et al. Amphiregulin modifies the Minnesota Acute Graft-versus-Host Disease Risk Score: results from BMT CTN 0302/0802. *Blood Adv* (2018);2(15):1882–8. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017343
203. Walsh ER, Stokes K, August A. The role of eosinophils in allergic airway inflammation. *Discov Med* (2010);9(47):357–62.
204. Høydahl LS, Richter L, Frick R, Snir O, Gunnarsen KS, Landsverk OJB, et al. Plasma Cells Are the Most Abundant Gluten Peptide MHC-expressing Cells in Inflamed Intestinal Tissues From Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology* (2019);156(5):1428-1439.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.013
205. CARROCCIO A, CAMPISI G, IACONO G, IACONO OL, MARESI E, DI PRIMA L, et al. Oral mucosa of coeliac disease patients produces antiendomysial and antitransglutaminase antibodies: the diagnostic usefulness of an in vitro culture system. *Aliment Pharmacol Ther* (2007);25(12):1471–7. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03335.x
206. Vetrano S, Zampaletta U, Anania MC, Di Tola M, Sabbatella L, Passarelli F, et al. Detection of anti-endomysial and anti-tissue transglutaminase autoantibodies in media following culture of oral biopsies from patients with untreated coeliac disease. *Dig Liver Dis* (2007);39(10):911–6. doi: 10.1016/j.dld.2007.07.158
207. Rios EJ, Kalesnikoff J. FcεRI expression and dynamics on mast cells. *Methods Mol Biol* (2015);1220:239–55. doi: 10.1007/978-1-4939-1568-2_15
208. Shin J-S, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci* (2015);72(12):2349–60. doi: 10.1007/s00018-015-1870-x

209. Platzer B, Stout M, Fiebiger E. Functions of dendritic-cell-bound IgE in allergy. *Mol Immunol* (2015);68(2 Pt A):116–9. doi: 10.1016/j.molimm.2015.05.016
210. Schleimer RP, Berdnikovs S. Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* (2017);139(6):1752–61. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.010
211. Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Altunbulakli C, Morita H, Castro-Giner F, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* (2018);141(1):300-310.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.038
212. Hong H, Liao S, Chen F, Yang Q, Wang D-Y. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy* (2020);75(11):2794–804. doi: 10.1111/all.14526
213. Gregory LG, Jones CP, Walker SA, Sawant D, Gowers KHC, Campbell GA, et al. IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite. *Thorax* (2013);68(1):82–90. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-202003
214. Hams E, Armstrong ME, Barlow JL, Saunders SP, Schwartz C, Cooke G, et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014);111(1):367–72. doi: 10.1073/pnas.1315854111
215. Chen Z-G, Zhang T-T, Li H-T, Chen F-H, Zou X-L, Ji J-Z, et al. Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite. *PLoS One* (2013);8(1):e51268. doi: 10.1371/journal.pone.0051268
216. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* (2008);181(4):2790–8. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2790
217. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2015);15(1):98–103. doi: 10.1097/ACI.0000000000000133
218. Jain V, Raina S, Gheware AP, Singh R, Rehman R, Negi V, et al. Reduction in polyamine catabolism leads to spermine-mediated airway epithelial injury and induces asthma features. *Allergy* (2018);73(10):2033–45. doi: 10.1111/all.13472
219. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2011);44(2):127–33. doi: 10.1165/rcmb.2010-0027TR
220. Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* (2005);6(10):1047–53. doi: 10.1038/ni1247

221. Christmann RB. Another Piece in the Fibrotic Puzzle: TSLP as a Novel Ligand for Fibrocyte Activation. *J Invest Dermatol* (2016);136(2):360–2. doi: 10.1016/j.jid.2015.11.014
222. Vannella KM, Ramalingam TR, Borthwick LA, Barron L, Hart KM, Thompson RW, et al. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Sci Transl Med* (2016);8(337):337ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf1938
223. López-Casado M, Lorite P, Palomeque T, Torres M. Potential role of the IL-33/ST2 axis in celiac disease. *Cell Mol Immunol* (2017);14(3):285–92. doi: 10.1038/cmi.2015.85
224. Perez F, Ruera CN, Miculan E, Carasi P, Dubois-Camacho K, Garbi L, et al. IL-33 Alarmin and Its Active Proinflammatory Fragments Are Released in Small Intestine in Celiac Disease. *Front Immunol* (2020);11:581445. doi: 10.3389/fimmu.2020.581445
225. Goel G, Tye-Din JA, Qiao S-W, Russell AK, Mayassi T, Ciszewski C, et al. Cytokine release and gastrointestinal symptoms after gluten challenge in celiac disease. *Sci Adv* (2019);5(8):eaaw7756. doi: 10.1126/sciadv.aaw7756
226. Romero-Adrián TB. Celiac disease: Participation of Cytokines and Other Factors in the Immune Response. *J Gastrointest Disord Liver Funct* (2016);1(1):1–6. doi: 10.15436/2471-0601.15.005
227. Rybakovsky E, Valenzano MC, Deis R, DiGuilio KM, Thomas S, Mullin JM. Improvement of Human-Oral-Epithelial-Barrier Function and of Tight Junctions by Micronutrients. *J Agric Food Chem* (2017);65(50):10950–8. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04203
228. Verhoef A, Alexander C, Kay AB, Larché M. T Cell Epitope Immunotherapy Induces a CD4+ T Cell Population with Regulatory Activity. Platts-Mills T, editor. *PLoS Med* (2005);2(3):e78. doi: 10.1371/journal.pmed.0020078
229. Tanaka Y, Fukumoto S, Sugawara S. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells by sublingual immunotherapy. *J Oral Biosci* (2019);61(2):73–7. doi: 10.1016/j.job.2019.02.001
230. 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* (2019);74(2):349–60. doi: 10.1111/all.13553
231. Montenegro-Nicolini M, Morales JO. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech* (2017);18(1):3–14. doi: 10.1208/s12249-016-0525-z
232. Sollid LM, Khosla C. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med* (2011);269(6):604–13. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x
233. Di Sabatino A, Lenti M V., Corazza GR, Gianfrani C. Vaccine Immunotherapy for Celiac Disease. *Front Med* (2018);5. doi: 10.3389/fmed.2018.00187

Listado de publicaciones científicas

Sanchez-Solares J, Delgado-Dolset MI, Mera-Berriatua L, Hormias-Martin G, Cumplido JA, Saiz V, et al. Respiratory allergies with no associated food allergy disrupt oral mucosa integrity. *Allergy* (2019);74(11):2261–5. doi: 10.1111/all.13860.

Sanchez-Solares J, Sanchez L, Pablo-Torres C, Diaz-Fernandez C, Sørensen P, Barber D, et al. Celiac Disease Causes Epithelial Disruption and Regulatory T Cell Recruitment in the Oral Mucosa. *Front Immunol* (2021);12:623805. doi: 10.3389/fimmu.2021.623805.

Gomez-Casado C, **Sanchez-Solares J**, Izquierdo E, Díaz-Perales A, Barber D, Escribese MM. Oral Mucosa as a Potential Site for Diagnosis and Treatment of Allergic and Autoimmune Diseases. *Foods* (Basel, Switzerland) (2021);10(5). doi: 10.3390/foods10050970.

Delgado-Dolset MI, Obeso D, **Sánchez-Solares J**, Mera-Berriatua L, Fernández P, Barbas C, et al. Understanding Systemic and Local Inflammation Induced by Nasal Polyposis: Role of the Allergic Phenotype. *Front Mol Biosci* (2021);8:662792. doi: 10.3389/fmolb.2021.662792.

TESIS DOCTORAL

Javier Sánchez Solares

2021